



HAL
open science

Etude des bases moléculaires à l'origine des troubles cardiaques des patients atteints de dystrophies myotoniques

Fernande Freyermuth

► **To cite this version:**

Fernande Freyermuth. Etude des bases moléculaires à l'origine des troubles cardiaques des patients atteints de dystrophies myotoniques. Rhumatologie et système ostéo-articulaire. Université de Strasbourg, 2013. Français. NNT : 2013STRAJ058 . tel-01205818

HAL Id: tel-01205818

<https://theses.hal.science/tel-01205818>

Submitted on 28 Sep 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.

ÉCOLE DOCTORALE 414
CNRS UMR 7104 - Inserm U 964

THÈSE présentée par :

Fernande FREYERMUTH

Soutenue le : **27 septembre 2013**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline / Spécialité : Sciences du Vivant / Aspects Moléculaires et Cellulaires de la
Biologie

**Etudes des bases moléculaires à l'origine des
troubles cardiaques des patients atteints de
Dystrophies Myotoniques**

THÈSE dirigée par :

Monsieur CHARLET-BERGUERAND Nicolas

Docteur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Monsieur BASSEZ Guillaume

Docteur, Hôpital Mondor de Paris

Monsieur SERGEANT Nicolas

Docteur, Université de Lille

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Monsieur WESTHOF Eric

Professeur, Université de Strasbourg

Madame GOURDON Geneviève

Docteur, Hôpital Broussais de Paris

Monsieur FURLING Denis

Docteur, Institut de Myologie de Paris

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le **Professeur Eric Westhof, le Dr Guillaume Bassez, le Dr Nicolas Sergeant, le Dr Denis Furling, le Dr Geneviève Gourdon, et le Dr Cécile Martinat**, de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs, examinateurs et invités de mon jury de thèse.

Je tiens également à remercier le **Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, l'Université de Strasbourg et l'Association Française des Myopathies (AFM-Téléthon)** pour avoir soutenu ce travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement et à témoigner toute ma reconnaissance à mon directeur de thèse, le **Dr Nicolas Charlet**. Chef, merci de m'avoir accueillie dans ton équipe, de m'avoir donné la chance de travailler dans d'excellentes conditions, et d'avoir largement contribué à ma formation scientifique. Merci également pour ta disponibilité, ton enthousiasme toujours au rendez-vous, et pour toutes nos discussions scientifiques rythmées par l'éternel « appel de la caféine »... Je te remercie aussi pour tous les congrès auxquels j'ai pu assister, qui ont pimenté ma vie de doctorante... Je tiens également à te remercier de m'avoir communiqué ta passion pour les « repeats ».
« to make a long story short », merci.

Merci à toute l'**équipe Charlet** pour ces années passées ensemble,

Merci à toi, « ma » **Chantal**, que dis-je ! Merci à toi mon Dr Sellier, pour tous tes conseils, tout ce que tu m'as appris, et tout le temps que tu m'as consacré... Travailler avec toi fut un plaisir... Merci à toi ma « Lucienne », pour tous nos cafés, tous nos repas, et ton soutien à tous les niveaux... Et parce que le compte ne serait pas bon, si je ne remerciais pas ma « Thérèse » ! Merci à toi ma Thérèse pour tous ces congrès passés ensemble, toutes ces « streets » foulées et tous nos fou-rires... enfin, merci pour ton amitié si précieuse... et comme tu le dis si bien : « ça ne se trouve pas sous le sabot d'un cheval » !

Merci à toi **Mich Mich** (Michel), pour tes conseils, ton enthousiasme et ton humour... Merci également pour toutes tes attentions qui m'émerveillent tous les jours un peu plus ! Acquisition de taille, humour sans égal, gants L à ta taille ! ☺

Travailler avec vous m'a beaucoup appris... Merci à **Marie-Christine** (alias M.C.), **Pauline** (alias le Panda), **Angéline** (alias Angie) et **Pierre** pour vos conseils, votre gentillesse et votre bonne humeur.

Je souhaiterais remercier chaleureusement tout le corps professoral de l'**Université de Lorraine** pour m'avoir accompagnée avec efficacité durant mes études supérieures.

Je remercie le **Professeur Benndorf** pour l'accueil au sein de son équipe.

Merci au **Professeur Thomas Zimmer** pour l'accueil au sein de son équipe, sa disponibilité et sa gentillesse... Ich bedanke mir bei Ihnen für Ihre Aufnahme, Ihre Verfügbarkeit und Ihre Freundlichkeit...

Merci à **Thomas L.** et **Gunter** pour leur accueil à Jena et leur gentillesse...

Je tiens à remercier le **Dr James Stévenin** pour ses conseils depuis mon premier jour au laboratoire... James, merci pour votre disponibilité, votre écoute et nos nombreuses discussions.

Je remercie les membres du groupe de « **Génétique Humaine** » pour les nombreuses réunions enrichissantes qui ont facilité les échanges scientifiques.

Je tiens à remercier tous les membres du **consortium DM France** pour les réunions, les échanges et les congrès passés ensemble...

Je tiens à remercier le **Dr Joern Pütz**, pour son enthousiasme, ses conseils et les bons moments passés ensemble dans l'enseignement.

Je remercie aussi le **Dr Fabrice Michel, Hussein, Ismail**, pour les excellents « TP » et pour nos discussions si improbables.

Merci au duo de choc : **Pascal** et **Jean-Marie**...Merci à toi Pascal pour ta bonne humeur, ta gentillesse et ton sex appeal... ☺ Merci à Jean-Marie pour ton humour, ta gentillesse !

Merci à mon **Stéphane**, celui qui était toujours prêt à me tenir compagnie à la paillasse radioac' avant son départ à l'ICS ! Merci pour tes petites et grandes histoires, merci pour ton rire, et tous ces moments passés ensemble !

Merci au **Dr Deryckère** pour nos collaborations si efficaces et pour votre gentillesse...

Merci à tous les membres des plateformes de l'IGBMC :

Merci aux membres de la plateforme biopuces et séquençage : Merci à **Bernard, Violaine, Christelle, Murielle, Fabrice**, et **Cathy** ... pour nos collaborations et votre bonne humeur !

Merci au service de culture cellulaire, au service informatique toujours prêt à régler nos petits soucis « d'ordinateurs » et à discuter autour d'un café.

Merci également à **Sylviane, Maïté**, et **Evelyne** pour leur sourire, leur gentillesse et leur efficacité...

Merci à **Isabelle** (Dr Behm-Ansmant), de m'avoir enseigné la rigueur scientifique dès mon premier stage en laboratoire, et de m'avoir donné l'envie de faire de la « Recherche » ...

Merci à **Audrey, Nathalie** et **Natacha** pour tous leurs conseils...

Je ne vous oublie pas les anciens et les nouveaux fraîchement arrivés! **Wassim, Laura, Claire, Nicolas G, Cécile, Julie, Mélanie, Adrien R., Eric F., Hervé M.** et **David B.** merci pour votre bonne humeur et votre gentillesse !

Merci aux voisins du Nord, le labo de Maria-Elena Torres-Padilla : **Maria-Elena** et **Ana** pour leur gentillesse ! ☺

Céline, merci pour votre bonne humeur matinale, votre gentillesse et votre humour !

Merci aux voisins du Sud, le labo de Bertrand Séraphin : **Maria, Vladimir** et **Valerio** pour votre humour et vos rires sans égal !

Merci au **Dr Jivkov** (Ivo) et au **Dr Beucher** (Anthony), pour avoir partagé un an de ma thèse (tous les soirs en rentrant du labo)... Merci pour votre écoute, pour vos conseils et pour m'avoir initiée au café... Pourrais-je enfin connaître les règles de la « Tentation » ?

Merci à toi **Magali** pour ta bonne humeur et ta joie de vivre !

Angèle, tellement de choses à t' rac' ! Que je ne saurais par où commencer... une collègue qui est devenue une amie très chère. Merci pour ton soutien, tes conseils et toutes nos soirées passées ensemble durant cette thèse.

Manu, ma poule ! Merci pour ton soutien et ton humour et tous ces bons moments !

Anne, merci pour toutes nos discussions pour le moins « non scientifiques » et pour ton amitié !

David U., merci pour ton écoute, ton humour et ton pas de danse !

Jérôme (Oui, Jérôme, c'est moi...), merci à toi pour ton soutien, ton humour et tous les bons moments que l'on a passés ensemble...

Je n'oublie pas mes amies « hors labo », un grand merci pour votre soutien :

Merci à « **ma Jul** ». Merci d'avoir toujours été là pour moi depuis notre rencontre... ton amitié m'est très précieuse.

Merci à la famille **Galparoli** pour leur gentillesse et leur soutien.

Merci à « **ma Sosotte** ». Merci pour ton écoute, ton amitié et la confiance que tu m'as donnée...

Merci à « **mon Elisa** » pour tout son soutien, sa générosité et son amitié.

Merci à la famille **Nicotra** pour son soutien et sa gentillesse.

Merci à **Arnaud G.**, pour m'avoir soutenu au début de ma thèse et m'avoir fait tant rire.

Merci à « **ma Latha** » (« **ma B.** »)... Je sais que tu n'aimes pas les déclarations... mais là, tu n'y couperas pas ! « Beaucoup de gens entrent et sortent de la vie d'une personne, mais seuls les vrais amis y laissent leur empreinte »...tu ne m'en as pas laissé une mais des milliers... Toujours là pour moi quand ça va et surtout quand ça ne va pas... Merci pour ton soutien.

Ricardo, je n'aurais pas assez d'une thèse pour te remercier... un proverbe latin dit que « qui trouve un ami, trouve un trésor... ». Tu es « le trésor » que j'ai eu la chance de trouver le premier jour de mes années universitaires... Chico, merci pour ton amitié sans faille, ton soutien de chaque instant et ta générosité sans égal... Merci pour toutes ces années que l'on a partagées...

Merci à **Minerva**, pour l'amour qu'elle transmet par ses « baklawa ».

Merci à **Laurent**. Merci pour ton humour, ta générosité et ton soutien.

Merci à **Christian C.** et **Christian H.**, d'avoir toujours été là pour moi ...

J'espère n'avoir oublié personne...

Le soutien de sa famille n'a pas de prix...

Merci à mon grand frère **Jean-Aimé**. Merci pour la confiance que tu m'as donnée, pour ton soutien et ta protection durant toutes ces années... Tu as souvent été les épaules qui m'ont porté...

Merci à ma grande sœur **Shirley**. Merci pour ton soutien, ta confiance et la motivation que tu m'as toujours donnée... J'ai tellement de chance de t'avoir dans ma vie.

Merci à **ma maman**. Merci pour ton soutien, ta force, et tout l'amour que tu me donnes... Merci d'avoir su garder l'équilibre de notre famille.

Papa, j'espère que tu es fier de moi... Merci pour le courage, la force et la persévérance que tu m'as transmis de là où tu veilles... Tu me manques...

*« C'est impossible » dit la fierté,
« C'est risqué » dit l'expérience,
« C'est sans issue » dit la raison,
« Mais essayons » murmure le cœur...*

*A mon père,
A ma mère,
A ma sœur
&
A mon frère*

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
ABREVIATIONS	6
LISTE DES FIGURES.....	9
LISTE DES TABLEAUX	11
CHAPITRE I : Les Dystrophies Myotoniques	12
1. Les maladies à expansions de nucléotides : perte ou gain de fonction ?.....	12
1.1. Les maladies à perte de fonction protéique : exemple, le syndrome de l’X Fragile.....	13
1.2. Les maladies à gain de fonction protéique : exemple, la maladie de Huntington	14
1.3. Les maladies à gain de fonction d’ARN.....	15
1.3.1. Le syndrome d’ataxie et de tremblement lié au chromosome X	15
1.3.2. Les ataxies spinocérébelleuses 8, 10, 12, 31 et 36.....	16
1.3.3. Les dystrophies myotoniques	19
2. Les dystrophies myotoniques : des chiffres et des lettres.....	19
2.1. Description des dystrophies myotoniques	20
2.1.1. Les différentes formes de dystrophie myotonique.....	20
2.1.2. Les symptômes des formes adultes des dystrophies myotoniques	22
2.1.3. Les symptômes cardiaques des dystrophies myotoniques	25
2.1.3.1. Généralités sur les propriétés cardiaques	25
2.1.3.2. Les symptômes cardiaques des patients DM	26
2.1.3.3. Différences cardiaques entre DM1 et DM2	28
2.2. Les mécanismes moléculaires à l’origine des dystrophies myotoniques.....	29
2.2.1. L’haploinsuffisance des gènes <i>DMPK</i> , <i>SIX5</i> et <i>DMWD</i>	29
2.2.2. Le gain de fonction de l’ARN muté.....	30
2.2.3. Le gain de fonction de la protéine CUGBP1	31
2.2.4. La perte de fonction des protéines MBNL.....	33
2.2.5. Les altérations de l’épissage alternatif.....	35
2.2.6. Autres mécanismes	40
2.3. Les stratégies thérapeutiques.....	42
2.3.1. Cibler les transcrits contenant l’expansion de répétitions CUG	42
2.3.2. Stabiliser l’expansion de CTG par un oligonucléotide antisens CAG.....	44
2.3.3. Rétablir la concentration normale des protéines MBNL1 et CUGBP1	44

CHAPITRE II : La maturation des miARNs et des ARNs messagers.....	46
1. Les miARNs : petits par leur taille, grands par leurs fonctions.....	46
1.1. Les fonctions des miARNs.....	46
1.1.1. Le complexe miRISC	47
1.1.2. L'inhibition de la traduction	48
1.1.3. La dégradation de l'ARNm	49
1.1.4. L'activation de la traduction.....	49
1.2. La biogenèse des miARNs	50
1.2.1. La localisation génique et la transcription	50
1.2.2. Le clivage par le complexe DROSHA-DGCR8	50
1.2.3. L'export du pré-miARN	51
1.2.4. Le clivage par DICER	52
1.2.5. Stabilité des miARNs matures.....	52
1.3. La régulation de la biogenèse des miARNs	53
1.3.1. Les protéines régulant la biogenèse des miARNs	53
1.3.2. LIN28 est un régulateur de la biogenèse des miARNs.....	54
1.3.3. L'édition des miARNs.....	55
2. Les ARNs messagers : un gène, plusieurs messages	56
2.1. L'épissage constitutif	57
2.1.1. Séquences nécessaires à l'identification des exons et des introns	57
2.1.2. Mécanisme général de la réaction d'épissage.....	58
2.1.3. Les différentes étapes d'assemblage de la machinerie d'épissage.....	58
2.2. L'épissage alternatif	59
2.2.1. Les différents types d'épissages alternatifs	60
2.2.2. Les éléments régulateurs en <i>cis</i>	60
2.2.3. Les éléments régulateurs en <i>trans</i>	62
2.2.3.1. Les protéines hnRNP	62
2.2.3.2. Les protéines SR	63
2.2.3.3. Les protéines régulatrices non SR et non hnRNP	65
CHAPITRE III : Les miARNs, SCN5A et le cœur.....	72
1. Le cœur a ses fonctions que les expansions ignorent.....	72
1.1. Les fonctions et régulations cardiaques.....	72
1.1.1. Structure du cœur.....	72

1.1.2. Les différents types de cellules cardiaques	73
1.1.2.1. Les cellules contractiles	73
1.1.2.2. Les cellules pacemaker	74
1.1.3. Activité électrique des cellules cardiaques	74
1.1.3.1. L'activité électrique des cellules contractiles	74
1.1.3.2. L'activité électrique des cellules pacemaker	75
1.1.4. La conduction cardiaque	76
2. Intervention musculée de 3 familles de miARNs cardiaques.....	76
2.1. La famille miR-1/miR206	76
2.1.1. Le rôle de miR-1 dans le développement cardiaque	77
2.1.2. Le rôle de miR-1 dans le fonctionnement cardiaque	78
2.2. La famille miR-133	79
2.3. La famille miR-208/miR-499	80
3. Le canal à sodium SCN5A/Na_v1.5 au cœur des troubles cardiaques.....	81
3.1. Généralités sur les canaux sodiques	81
3.1.1. La sous-unité alpha des canaux sodiques	81
3.1.2. Les sous-unités beta des canaux sodiques	85
3.1.3. Molécules bloquant les canaux sodiques	85
3.2. Caractéristiques du canal à sodium Na _v 1.5	86
3.2.1. Expression du canal à sodium Na _v 1.5.....	86
3.2.2. Les différents variants d'épissage de Na _v 1.5	87
3.2.3. Le variant d'épissage néonatal : Na _v 1.5e.....	88
3.2.4. Régulations de l'activité du canal à sodium Na _v 1.5	89
3.3. Les mutations de <i>SCN5A</i> à l'origine de symptômes cardiaques	92
OBJECTIFS DE LA THESE	95
RESULTATS	96
Publication 1: Mis-regulation of miR-1 processing is associated with heart defects in Myotonic Dystrophy	96
Publication 2 en préparation: Mis-regulation of alternative splicing of the cardiac sodium channel SCN5A is associated with cardiac conduction delay and arrhythmia in Myotonic Dystrophy	97
RESULTATS SUPPLEMENTAIRES.....	138

1. Vérification de l'altération de l'épissage alternatif de <i>cTNT</i> dans les échantillons de cœurs de patients DM.....	138
2. Analyse de l'expression de l'ARNm <i>SCN5A</i> dans les échantillons de cœurs de patients DM.....	138
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	139
1. Les causes et les conséquences de la dérégulation de miR-1 dans le cœur des patients DM.....	139
1. 1. Les causes de la dérégulation de miR-1	139
1.1.1. La régulation de la biogenèse de miR-1 par CUGBP1	140
1.1.2. La régulation de la biogenèse de miR-1 par LIN28 et TUT-4.....	140
1.1.3. La régulation de la biogenèse de miR-1 par MBNL1	143
1.1.4. Conservation de la régulation de la biogenèse de miR-1 par MBNL1	143
1.2. Conséquences de la diminution de miR-1 dans le cœur des patients DM.....	145
1.2.1. Conséquences physiologiques de la surexpression de la connexine 43.....	145
1.2.2. Conséquences physiologiques de la surexpression de Ca _v 1.2	146
1.2.3. Conséquences de la surexpression d'autres cibles de miR-1	147
1.3. Variation de miR-1 dans le muscle squelettique de patients DM1.....	148
1.4. miR-1 : une cible thérapeutique ?.....	149
2. Une multitude d'altérations d'épissage dans le cœur de patients DM.....	150
2.1. Découverte de nouvelles altérations d'épissage alternatif.....	150
2.2.1. Altérations des protéines de structure.....	151
2.2.2. Altérations des protéines de signalisation cellulaire.....	152
2.2.3. Altérations d'épissage des facteurs de transcription ou d'épissage	153
2.2.4. Régulation par MBNL1 ou CUGBP1 et retour aux isoformes fœtales	154
2.2. Causes et conséquences d'une dérégulation de l'épissage de <i>SCN5A</i>	155
2.2.1. L'épissage des exons 6A et 6B de <i>SCN5A</i> est régulé par MBNL1	155
2.2.2. Les propriétés de <i>SCN5A</i> différent selon l'exon 6A ou 6B	157
2.2.3. Conséquences de l'expression du canal <i>SCN5A</i> contenant l'exon 6A.....	158
2.2.4. Perspectives : génération de modèles animaux.....	159
CONCLUSION.....	161
ANNEXE 1.....	162
Publication 3: Sequestration of DROSHA and DGCR8 by expanded CGG RNA repeats alters microRNA processing in fragile X-associated tremor/ ataxia syndrome.....	162

ANNEXE 2	164
Publication 4 en préparation: RBFOX proteins chase MBNL1 from CCUG RNA aggregates and alleviate symptoms of myotonic dystrophy type 2.....	164
ANNEXE 3	206
Implication des protéines NOVA dans les ataxies spinocérébelleuses de type 10 et 31.....	206
ANNEXE 4	210
Implication de Tra2- β dans la maturation de miARNs spécifiques.	210
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	214

ABREVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribonucléique (DNA : DésoxyriboNucleic Acid)
ADNc	ADN complémentaire
AGO	ArGOnaute
ARN	Acide Ribonucléique (RNA : RiboNucleic Acid)
ARNi	ARN interférence
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
ASF/SF2	Alternative Splicing Factor 2/ Splicing Factor 2
BS	Brugada Syndrome
Ca ²⁺	Calcium
CACNA1C	Calcium ChaNnel Alpha 1 Cardiac
CCD	Cardiac Conduction Disease
CDM	Dystrophie Myotonique Congénitale
CELF	CUG-BP and ETR-3-Like Factor
Cl-	Chlore
CLCN1	ChLoride ChaNnel 1
cTNT	cardiac TropoNin T
CUGBP	CUG-Binding Protein
Cx	Connexine
Dapi	4',6'-diamidino-2-phénylindole
DCP	Decapping enzyme
DGCR8	DiGeorge syndrome Critical Region Protein 8
DM	Dystrophie Myotonique
DMPK	Dystrophia Myotonica Protein Kinase
DMWD	Dystrophia Myotonica WD repeat-containing protein
dsRBD	double strand RNA Binding Domain
eIF	Eukaryotic translation Initiator Factor
ETR	Elav-Type RNA-binding protein
Exp	Exportine
FMR	Fragile X Mental Retardation
FMRP	Fragile X Mental Retardation Protein
FXR	Fragile X Mental Retardation
FXS	Syndrome de l'X Fragile
FXTAS	Syndrome d'Ataxie et de Tremblements lié au chromosome X

GTP	Guanosine TriPhosphate
GW182	Glycine-Tryptophan protein of 182 kDa
HCN	Potassium/ sodium Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated channel
HDAC	Histone DeACetylase
hnRNP	heterogeneous nuclear RiboNucleoProteins
INSR	INSulin Receptor
K ⁺	Potassium
KCN	Potassium ChaNnel
kDa	kiloDalton
KSRP	KH-type Splicing Regulatory Protein
MAPT	Microtubule-Associated Protein TAU
MBNL	MuscleBliNd-Like
MHC	Myosin Heavy Chain
miARN	microARN
miRISC	miARN-RISC
Na ⁺	Sodium
Na _(v) 1.5	voltage-gated sodium channel type 1.5
PTB	Polypyrimidine Tract Binding protein
PABP	Poly(A) Binding Protein
PAN	PABP-dependent poly(A) Nuclease
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	potentiel Hydrogène
PKC	Protein Kinase C
Poly(A)	polyadenosine
Pré-miARN	miARN précurseur
Pri-miARN	miARN primaire
qRTPCR	Quantitative Real Time PCR
RIII	RNase de type III
RISC	RNA Induced Silencing Complex
RNase	ribonucléase
RRM	RNA Recognition Motif
SCA	SpinoCerebellar Ataxia
SCN	Sodium ChaNnel
shARN	Short hairpin ARN
siARN	Small Interfering ARN
SIX5	SIX homeobox 5

snARN	small nuclear ARN
TNNT2	TropoNiN T type 2 (cTNT)
TUTase	Terminal Uridyl Tranferase
UTR	UnTranslated Region (région non traduite)
UV	Ultra Violet
ZFN	Zinc Finger Nuclease
ZnF	Zinc Finger
ZNF9	ZiNc Finger protein 9
3' OH	3' hydroxyle

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Maladies génétiques dues à des expansions de répétitions de nucléotides.	12
Figure 2	Localisation génomique des expansions de nucléotides responsables des DM.	19
Figure 3	Photographies de patients atteints de la dystrophie myotonique de type 1.	20
Figure 4	Signes cliniques des patients atteints de DM.	21
Figure 5	Les atteintes cardiaques des patients atteints de DM.	26
Figure 6	Schéma du gène <i>DMPK</i> et de ses gènes adjacents.	29
Figure 7	Présence de foci nucléaires chez les patients DM1 et DM2.	29
Figure 8	Agrégats nucléaires d'expansions CUG et CCUG avec les protéines MBNL.	33
Figure 9	L'invalidation de MBNL1 chez la souris reproduit certains symptômes des DM.	33
Figure 10	Représentation schématique et structure de MBNL1.	34
Figure 11	L'invalidation de <i>Mbnl2</i> chez la souris reproduit certains symptômes neurologiques des patients DM1.	35
Figure 12	Représentation schématique des mécanismes moléculaires possibles impliqués dans les dystrophies myotoniques.	40
Figure 13	Inhibition de l'expression des gènes par le complexe miRISC.	48
Figure 14	Biogenèse des miARNs.	50
Figure 15	Régulations de la maturation des miARNs.	53
Figure 16	LIN28 bloque sélectivement la biogenèse des miARNs let-7.	54
Figure 17	Séquences consensus des sites d'épissage.	57
Figure 18	Les deux étapes de transestérification de la réaction d'épissage.	57
Figure 19	Assemblage des acteurs de la réaction d'épissage.	58
Figure 20	Les différents types d'épissage alternatif.	60
Figure 21	Organisation structurale des protéines hnRNP.	62
Figure 22	Organisation structurale des protéines SR.	63
Figure 23	Rôles des protéines SR dans la sélection des sites d'épissage.	64
Figure 24	Organisation structurale des protéines SR-like.	65
Figure 25	Modèle du fonctionnement de la contraction musculaire.	73
Figure 26	Illustration de l'activité électrique du cœur humain.	74
Figure 27	Séquence et expression tissulaire des miARNs miR-1/206 et miR-133.	76
Figure 28	Boucles de régulation des miARNs.	77
Figure 29	Fonction de miR-1 dans les muscles squelettique et cardiaque.	78
Figure 30	Fonction de miR-133 dans les muscles squelettique et cardiaque.	79
Figure 31	Localisation chromosomique, séquence et expression tissulaire des miARNs de la famille miR-208/499.	80
Figure 32	Fonction de miR-208 dans les muscles squelettique et cardiaque.	80
Figure 33	Structure de la sous-unité α du canal à sodium $Na_v1.5$.	81

Figure 34	Modèles moléculaires des mouvements des segments S4, détecteurs de voltage, du canal sodique Na _v 1.5.	83
Figure 35	Modèle des 3 états du canal à sodium.	84
Figure 36	Niveaux d'expression cardiaque de différentes isoformes Na _v 1 dans les cœurs de mammifères.	86
Figure 37	Différents variants d'épissage alternatif de <i>SCN5A</i> .	87
Figure 38	Les exons 6A et 6B mutuellement exclusifs de <i>SCN5A</i> .	89
Figure 39	Régulation de l'expression et du trafic intracellulaire du principal canal à sodium cardiaque Na _v 1.5.	90
Figure 40	Mutations de <i>SCN5A</i> associées au syndrome du QT long de type 3.	92
Figure 41	Mutations de <i>SCN5A</i> associées au syndrome de Brugada.	93
Figure 42	Altération de l'épissage de l'exon 5 de la Troponine T cardiaque dans les cœurs de patients DM1, DM2 et CDM.	138
Figure 43	Analyse de l'expression de <i>SCN5A</i> dans les échantillons de cœurs DM.	138
Figure 44	Niveau d'expression de miR-1 dans les échantillons de cœurs de patients DM.	140
Figure 45	Expression de pré-miR-1 et de miR-1 dans le cœur de souris <i>Mbnl1</i> ^{-/-} .	143
Figure 46	Expression de pré-miR-1 et miR-1 dans le muscle squelettique de patients DM.	148
Figure 47	Expression de miR-1 humain dans des souris <i>via</i> des virus AAV.	149
Figure 48	Epissage alternatif des exons 6A/6B de <i>Scn5a</i> dans des cœurs de souris <i>Mbnl1</i> ^{-/-} .	157
Figure 49	Transgène permettant l'expression de l'exon 6A de <i>Scn5a</i> au stade adulte dans un modèle animal.	160
Figure 50	Transgenèse par la stratégie Zinc Finger Nuclease.	160
Figure 51	Existence d'un ARN « antisens » et colocalisation des protéines NOVA avec cet ARN antisens dans le cerveau de patients atteints de SCA31.	208
Figure 52	NOVA-1 avec différentes expansions d'ARN l'origine de SCA10 et SCA31.	209
Figure 53	Expression des miARNs suite à la déplétion de Tra2-β dans les cellules HeLa.	211
Figure 54	Effet de Tra2-β sur la maturation de miR-98.	212
Figure 55	Interaction spécifique entre les protéines Tra2- β ou Lin28 et le pré-miR-98.	213
Figure 56	Analyse de l'expression des miARNs dont la boucle terminale contient le motif AGAA.	214
Figure 57	Compétitions entre Tra2-β et Lin28 pour la fixation du pré-miR-98.	214

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Modèles murins démontrant le gain de fonction de l'ARN muté dans les dystrophies myotoniques.	30
Tableau 2	Modèles murins surexprimant la protéine CUGBP1.	32
Tableau 3	Altérations de l'épissage alternatif mises en évidence chez les patients DM.	36
Tableau 4	Stratégies ciblant l'ARN contenant les longues répétitions CUG.	43
Tableau 5	Stratégies visant à libérer MBNL1 des expansions CUG.	44
Tableau 6	Les différentes sous-unités α du canal à sodium.	82
Tableau 7	Les différentes sous-unités β du canal à sodium.	85
Tableau 8	Toxines et insecticides liant et bloquant les canaux sodiques voltage-dépendant.	86
Tableau 9	Récapitulatif des protéines régulant l'expression ou l'activité de <i>SCN5A</i> .	91

INTRODUCTION

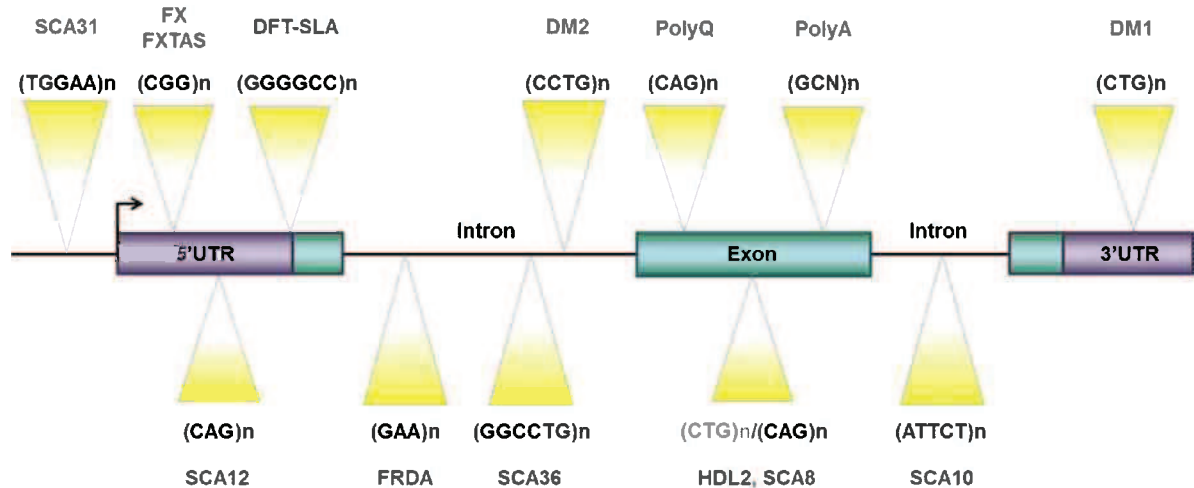


Figure 1 : Maladies génétiques dues à des expansions de répétitions de nucléotides.

Ces différentes maladies sont dues à des expansions de répétitions nucléotidiques dans différentes régions géniques : les régions non codantes (5'UTR ; introns ; 3'UTR) et les régions codantes (exons). FXTAS : syndrome d'ataxie et de tremblement lié au chromosome X ; FRDA : ataxie de Friedreich ; FX : syndrome de l'X fragile ; DM : dystrophie myotonique ; DFT-SLA : démence fronto-temporale associée à une sclérose latérale amyotrophique.

L'abréviation polyQ représente les maladies à expansion de nucléotides CAG donnant des polyglutamines (la chorée de Huntington, l'atrophie musculaire bulbaire (SBMA) et les ataxies spinocérébelleuses (SCA) de type 1, 2, 3, 6, 7 et 17). La maladie de Huntington de type 2 (HDL2) et l'ataxie spinocérébelleuse de type 8 (SCA8) sont dues à une expansion CTG transcrite en anti-sens donnant des ARNs CAG traduits en glutamines. L'abréviation polyA représente les maladies à expansion de nucléotides GCN codants pour des répétitions d'alanines (la dystrophie musculaire oculopharyngée (OPMD), la syndactylie de type 2 (SPDII), le syndrome pied-main-utérus (HFGS), le syndrome de Guttmacher, la dysplasie cléidocrânienne (CDD), l'holoprocéphalie, le syndrome d'Ondine, le retard mental lié à l'X avec déficit de l'hormone de croissance (XLMR+GHD) et le syndrome Blépharophimosis-ptosis-épicanthus inversus.

CHAPITRE I :

Les Dystrophies Myotoniques

1. Les maladies à expansions de nucléotides : perte ou gain de fonction ?

Les découvertes en 1991 d'une expansion de répétitions des nucléotides CAG dans le gène du récepteur aux androgènes responsable de l'amyotrophie bulbo-spinale liée à l'X par l'équipe du Professeur Fischbeck (Fischbeck *et al.*, 1991), puis de la présence d'une expansion des nucléotides CGG dans le gène *FMRI* responsable du syndrome de l'X fragile par les équipes de Jean-Louis Mandel, Ben Oostra et Steven Warren (Fu *et al.*, 1991 ; Oberlé *et al.*, 1991 ; Pieretti *et al.*, 1991 ; Verkerk *et al.*, 1991), ont permis d'établir une nouvelle catégorie de maladies génétiques chez l'homme : les maladies à expansions de nucléotides. La taille de ces répétitions varie selon les tissus, l'âge et la transmission aux descendants. Ces maladies sont donc caractérisées par des répétitions « instables et dynamiques ». Cette caractéristique a permis d'apporter une explication moléculaire aux variations d'expression et de sévérité observées entre différentes générations au sein d'une même famille. Ainsi, les familles porteuses de ces mutations connaissent un phénomène d'anticipation caractérisé par une diminution de l'âge de l'apparition des premiers symptômes et une augmentation de la sévérité.

A ce jour, pas moins de 28 maladies sont associées à des expansions de nucléotides, et de nombreux efforts de recherche ont permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine de ces pathologies (Orr and Zoghbi, 2007 ; La Sprada and Taylor, 2010). Ainsi, il existe trois types de maladies à expansions dont les mécanismes diffèrent selon la localisation des répétitions de nucléotides dans le gène muté (figure 1) :

- Une perte de fonction de la protéine codée par le gène muté (FXS, FRAXE, FRDA, etc.)
- Un gain de fonction dû à la production d'une protéine mutée (HD, SBMA, SCA3, etc.)
- Un gain de fonction dû à la production d'ARN muté (DM, FXTAS, SCA10, etc.)

1.1. Les maladies à perte de fonction protéique : exemple, le syndrome de l'X Fragile

Plusieurs maladies à perte de fonction protéique ont été décrites, telles que l'ataxie de Friedreich (FRDA) (Campuzano *et al.*, 1996), le syndrome FRAXE (Knight *et al.*, 1993) et le syndrome de l'X Fragile (Oberlé *et al.*, 1991), qui est présenté plus en détail ci-dessous.

Avec une prévalence de 1/4000 pour les garçons et de 1/8000 pour les filles, le syndrome de l'X Fragile (FXS) est la cause génétique la plus commune de retard mental chez l'enfant (Crawford *et al.*, 2001). Les symptômes de cette maladie consistent en un retard mental, des troubles du développement et de la parole, un comportement autistique, des mouvements stéréotypiques ainsi qu'une macro-orchidie. Le syndrome de l'X Fragile est dû le plus souvent à une expansion des nucléotides CGG dans la région 5'UTR du gène *FMRI* (Fragile X Mental Retardation 1) localisé sur le chromosome X (Fu *et al.*, 1991 ; Oberlé *et al.*, 1991 ; Verkerk *et al.*, 1991). En effet, chez les patients FXS, un nombre de répétitions CGG supérieur à 200 (CGG>200) conduit à une hyperméthylation du promoteur du gène *FMRI* au niveau des îlots CpG entraînant une perte de l'expression de la protéine FMRP. La diminution d'expression de FMRP conduit à la formation de dendrites et de synapses immatures et est considérée comme la cause du retard mental (Hirst *et al.*, 1995 ; Lugenbeel *et al.*, 1995). Plus rarement (2% des cas), le syndrome de l'X Fragile est dû à des mutations ponctuelles dans la région codante du gène *FMRI*, et ceci sans expansion des nucléotides CGG (De Boule *et al.*, 1993 ; Tarleton *et al.*, 2002).

Il est à noter que les individus porteurs de la « prémutation » du syndrome FXS, c'est à dire entre 50 et 200 répétitions CGG, peuvent développer une maladie neurodégénérative : le syndrome d'ataxie et de tremblement lié au chromosome X (FXTAS), qui sera détaillé dans la partie suivante de ce chapitre.

De nombreuses études ont été menées afin de trouver le rôle de la protéine FMRP. Cette protéine possède 2 domaines KH (hnRNP K Homology) et un domaine RGG (Arginine Glycine Glycine) liant des structures ARN spécifiques (Siomi *et al.*, 1993 ; Darnell *et al.*, 2001 ; Schaeffer *et al.*, 2001 ; Darnell *et al.*, 2005). Cette protéine multifonctionnelle serait impliquée dans le transport d'ARNm du cytoplasme aux épines dendritiques et régulerait ainsi localement la synthèse de protéines en réponse à des signaux de neurotransmetteurs (Eberhart *et al.*, 1996 ; Lagerbauer *et al.*, 2001 ; Villace *et al.*, 2004 ; Kim *et al.*, 2009). Les patients atteints de l'X Fragile montrent des anomalies de la morphologie des épines dendritiques (Rudelli *et al.*, 1985 ; Kaufmann *et al.*, 2000) qui sont retrouvées dans les souris invalidées

pour le gène *Fmr1* (Comery *et al.*, 1997). De nombreuses études sur les récepteurs neuronaux au glutamate dans ces souris ont permis de proposer un modèle selon lequel FMRP jouerait un rôle de régulateur négatif de l'expression de protéines au niveau des synapses suite à des stimuli passant par le récepteur du glutamate, mGluR5 (Bear *et al.*, 2004). Ce récepteur est responsable de la dépression à long terme (LTD : réduction de l'efficacité des synapses dépendante de l'activité de celles-ci durant un long intervalle de temps), qui nécessite une synthèse protéique *de novo* au niveau des synapses. L'absence de FMRP conduirait donc à une levée de répression de la synthèse protéique de ses ARNm cibles, conduisant à une activation constante de la LTD, une diminution de la force synaptique et à une dysmorphie des épines dendritiques chez les patients FXS (Bagni and Greenough, 2005).

1.2. Les maladies à gain de fonction protéique : exemple, la maladie de Huntington

Les maladies à gain de fonction protéique sont dues à des expansions de nucléotides CAG ou GCN localisées dans la région codante du gène muté, conduisant ainsi à l'expression de protéines mutées possédant des répétitions de glutamines (CAG) ou d'alanines (GCN). Ces protéines sont toxiques et forment des agrégats cellulaires entraînant pour les répétitions de glutamines (CAG) les maladies suivantes : la chorée de Huntington, l'atrophie musculaire bulbaire (SBMA) et les ataxies spinocérébelleuses de type 1, 2, 3, 6, 7, 8 et 17 (pour revue, Nelson, 2013). Les expansions GCN codant pour des répétitions d'alanines conduisent aux maladies suivantes : la dystrophie musculaire oculopharyngée (OPMD), la syndactylie de type 2 (SPDII), le syndrome pied-main-utérus (HFGS), le syndrome de Guttmacher, la dysplasie cléidocrânienne (CDD), l'holoprocéphalie, le syndrome d'Ondine, le retard mental lié à l'X avec déficit de l'hormone de croissance (XLMR+GHD) et le syndrome Blépharophimosis-ptosis-épicanthus inversus (pour revue, Amiel, 2004). On note ainsi que les expansions de glutamines conduisent le plus souvent à des maladies neurodégénératives alors que les expansions d'alanines sont souvent responsables de maladies développementales.

La chorée de Huntington (HD) est une maladie neurodégénérative héréditaire qui se traduit par une mort neuronale provoquant d'importants troubles moteurs et cognitifs. La maladie se développe chez des personnes âgées en moyenne de 40 à 50 ans avec une prévalence de 1 personne atteinte sur 15 000. Cette maladie est due à des expansions des nucléotides CAG (>40) dans le premier exon du gène *HTT* (aussi appelé *IT15*, Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). Ce gène code pour la protéine Huntingtine

(HTT) qui contient entre 6 et 34 glutamines chez les personnes non atteintes, et plus de 40 glutamines (polyQ) chez les patients atteints de chorée de Huntington.

Des modèles murins exprimant la protéine HTT mutée (Mangiarini *et al.*, 1996) ont confirmé la présence d'inclusions protéiques contenant la protéine Huntingtine ubiquitinylée et clivée principalement dans le noyau des neurones dégénérants (Davies *et al.*, 1997 ; DiFiglia *et al.*, 1997). Ces inclusions peuvent aussi être observées dans le cytoplasme. Ces agrégats de protéines HTT séquestrent des facteurs de transcription tels que CREB, NCOR, SIN3A, SP1, et p53, des protéines du protéasome et des protéines régulant l'endocytose (HIP1, HIP14, PACSIN, etc). L'agrégation de HTT entraîne ainsi une perte de la fonction de HTT et de ses interactants, conduisant à une mort neuronale (pour revue, Arrasate *et al.*, 2012).

1.3. Les maladies à gain de fonction d'ARN

Dans ce groupe, l'origine de la toxicité de ces répétitions s'avère être l'accumulation d'ARN muté contenant des expansions de nucléotides. Ainsi, les dystrophies myotoniques (DM), le syndrome d'ataxie et de tremblements lié au chromosome X (FXTAS) et les ataxies spinocérébelleuses de types 10 et 31 (SCA10 et 31) sont des maladies dues à l'expansion de nucléotides CTG (DM1), CCTG (DM2), CGG (FXTAS), ATTCT (SCA10) et TGGAA (SCA31), qui sont transcrites mais non traduites et s'accumulent dans le noyau des cellules sous forme d'agrégats d'ARN.

1.3.1. Le syndrome d'ataxie et de tremblement lié au chromosome X

Le syndrome d'ataxie et de tremblement lié au chromosome X (FXTAS) est une maladie neurodégénérative, touchant 1 individu sur 4000. Elle est due à un nombre intermédiaire (entre 50 et 200) de répétitions CGG situées dans la région 5'UTR du gène *FMRI* (Hagerman and Hagerman, 2001). FXTAS affecte principalement des hommes âgés de plus de 50 ans ; ceux-ci développent des tremblements intentionnels, une ataxie cérébelleuse (trouble de la coordination des mouvements), des symptômes parkinsoniens et une neuropathie périphérique sensitive (Jacquemont *et al.*, 2003). L'imagerie médicale montre que ces patients présentent une atrophie cérébrale ainsi que des lésions de la substance blanche, touchant plus spécifiquement le cervelet. Moins de 25% des femmes porteuses de la

prémuation présentent, quant à elles, une insuffisance ovarienne prématurée (FXPOI : « Fragile X-associated Primary Ovarian Insufficiency »).

Du fait de l'instabilité génétique des répétitions CGG, les patients FXTAS, porteurs de prémuation ($50 < \text{CGG} < 200$), peuvent donner naissance à des enfants atteints du syndrome de l'X Fragile ($\text{CGG} > 200$). Cependant le syndrome FXTAS se distingue du retard mental lié à l'X par des symptômes et des mécanismes moléculaires différents. En effet, chez les patients FXTAS, les expansions CGG ($50 < \text{CGG} < 200$) n'entraînent pas d'hyperméthylation du promoteur du gène *FMRI* ; l'ARNm *FMRI* est donc transcrit et l'expression de FMRP est inchangée ou légèrement réduite (Tassone *et al.*, 2000 ; Kenneson *et al.*, 2001).

Les neurones et les astrocytes de patients FXTAS présentent des inclusions intranucléaires positives en marquage ubiquitine (Greco *et al.*, 2002), et qui contiennent l'ARNm de *FMRI* muté (Tassone *et al.*, 2004). L'étude de modèles animaux montre que l'expression d'ARN contenant uniquement des répétitions CGG est suffisante pour reproduire les symptômes de cette maladie (Van Dam *et al.*, 2005 ; Hashem *et al.*, 2009). Dans des modèles de drosophile, ces transcrits s'accumulent sous forme d'agrégats qui recrutent différentes protéines liant l'ARN, telles que Pura, hnRNP A2/B1 et CUGBP1 (Tassone *et al.*, 2004 ; Iwahashi *et al.*, 2006 ; Jin *et al.*, 2007 ; Sofola *et al.*, 2007). En 2010, au sein de l'équipe, Chantal Sellier a montré que le facteur d'épissage SAM68 est séquestré chez les patients atteints de FXTAS, conduisant ainsi à une perte partielle de la fonction de cette protéine (Sellier *et al.*, 2010). Plus récemment, nous avons montré que le complexe DROSHA-DGCR8 est séquestré par les répétitions CGG *in vitro*, *in cellulo* et dans des coupes de cerveau de patients FXTAS. Cette séquestration empêche l'activité du complexe DROSHA-DGCR8 et inhibe donc la maturation des pri-miARNs en pré-miARNs, ce qui conduit à une diminution globale de l'expression des miARNs matures et à une mort neuronale (Sellier, Freyermuth *et al.*, 2013). Ces travaux, décrits dans l'annexe 1, nous ont permis de mieux caractériser les mécanismes moléculaires à l'origine du syndrome FXTAS.

1.3.2. Les ataxies spinocérébelleuses 8, 10, 12, 31 et 36

Les ataxies spinocérébelleuses (SCA) de type 8 et 12 sont causées par des expansions de nucléotides CTG et CAG situées dans des régions non codantes de leurs gènes hôtes. Toutefois, des études récentes montrent que SCA8 serait principalement causée par un transcrit antisens codant, contenant donc des répétitions CAG traduites en une protéine contenant des polyglutamines (Koob *et al.*, 1999 ; Moseley *et al.*, 2006). De même, il est

suspecté que les expansions de CAG, causes de l'ataxie spinocérébelleuse de type 12 (SCA12), sont dans une région codante du gène *PPP2R2B*, conduisant donc à l'expression d'une protéine toxique contenant des polyglutamines (Holmes *et al.*, 1999).

Au contraire, une expansion transcrite mais non traduite de répétitions des nucléotides ATTCT situés dans le gène *ATXN10* est responsable de l'ataxie spinocérébelleuse de type 10 (SCA10) (Zu *et al.*, 1999 ; Matsuura *et al.*, 2000). Enfin, deux nouvelles mutations responsables d'ataxies spinocérébelleuses ont été découvertes récemment dans des régions non codantes : une expansion de répétitions des nucléotides TGGAA sur le chromosome 16 entre les gènes *BEANI* et *TK2* est responsable de l'ataxie spinocérébelleuse de type 31 (SCA31), caractérisée comme une ataxie pure (Sato *et al.*, 2009). De même, une expansion des nucléotides GGCCTG située dans le premier intron du gène *NOP56* est responsable de l'ataxie spinocérébelleuse de type 36 associée à une dégénérescence des motoneurones (SCA36) (Kobayashi *et al.*, 2011 ; Ikeda *et al.*, 2012). Toutefois, dans le cas de SCA36, il est possible que les répétitions GGCCTG inhibent la transcription du gène *NOP56*, tout comme les répétitions CGG inhibent la transcription de *FMRI* dans le syndrome de l'X Fragile, ou les répétitions GGGGCC qui inhibent la transcription du gène *C9ORF72* et sont responsables d'une démence fronto-temporale associée à une sclérose latérale amyotrophique (DFT-SLA) (Xi *et al.*, 2013).

Ayant contribué à l'étude des mécanismes moléculaires à l'origine des ataxies spinocérébelleuses de types 10 et 31, je présenterai plus en détail ces deux ataxies.

L'ataxie spinocérébelleuse de type 10 (SCA10) a été décrite pour la première fois par Grewal *et al.*, en 1998. Cette maladie neurodégénérative représente la seconde cause d'ataxie cérébelleuse au Mexique et au Brésil. Toutefois, cette ataxie s'accompagne d'épilepsie dans les populations d'origine mexicaine, alors qu'elle est décrite comme une ataxie pure dans les familles d'origine brésilienne (Teive *et al.*, 2004 ; Teive *et al.*, 2012). Cette maladie est due à l'expansion des répétitions des nucléotides ATTCT (de 800 à 4500) dans l'intron 9 du gène *ATXN10* sur le chromosome 22 (Zu *et al.*, 1999 ; Matsuura *et al.*, 2000). Cette expansion est comprise entre 10 et 22 répétitions chez les personnes non atteintes, et entre 800 et 4500 répétitions chez les patients atteints de SCA10. De plus, les populations mexicaines et brésiennes se distinguent par une expansion de répétitions des nucléotides ATCCC situées à l'intérieur des expansions ATTCT. L'étude de modèles murins transgéniques montre que les répétitions AUUCU sur l'ARN recrutent et séquestrent le facteur d'épissage hnRNP K. Cette

séquestration conduit à une mort neuronale par apoptose (White *et al.*, 2010 ; White *et al.*, 2012). A l'exclusion de ces études, peu de travaux ont été menés sur les mécanismes moléculaires impliqués dans cette maladie.

L'ataxie spinocérébelleuse de type 31 (SCA31) est une maladie neurodégénérative caractérisée par une ataxie cérébelleuse progressive pure, touchant les cellules de Purkinje, et dont la moyenne d'âge d'apparition des symptômes est d'environ 60 ans (Owada *et al.*, 2005). Il s'agit de l'ataxie spinocérébelleuse la plus commune au Japon après SCA3 et SCA6. En 2005, cette ataxie a été associée à une variation SNP (« Single Nucleotide Polymorphism ») à la position -16C>T dans la partie 5'UTR du gène *PLEKHG4* sur le chromosome 16 (Ishikawa *et al.*, 2005). Des mutations de *PLEKHG4* sont responsables de SCA4 (Flanigan *et al.*, 1996). Cependant, et au contraire de SCA31, le phénotype de SCA4 est toujours accompagné d'une neuropathie axonale sensorielle et d'une absence du réflexe du tendon associée à une dégénérescence du cervelet et du tronc cérébral (Flanigan *et al.*, 1996 ; Hellenbroich *et al.*, 2006). Enfin, en 2009, une étude menée par l'équipe du Professeur Ishikawa sur 160 patients SCA31, 5 patients SCA4 et 430 personnes non atteintes de SCA, a permis de mettre en évidence la cause génétique de SCA31 qui n'est pas une altération de *PLEKHG4*, mais qui est une expansion de répétitions des nucléotides TGGAA de 2,5 à 3,8 kb située entre les gènes *TK2* (Thymidine Kinase 2) et *BEAN* (Brain Expressed, Associated with NEDD4) sur le chromosome 16 (Sato *et al.*, 2009). Il existe une corrélation inverse entre le nombre de répétitions et l'âge du début d'apparition des symptômes. Ces répétitions sont transcrites et s'accumulent dans le noyau des cellules de Purkinje des patients SCA31 (Sato *et al.*, 2009). De plus, des ARN portant des répétitions UGGAA lient les protéines SFRS1 et SFRS9 *in vitro*. Cependant, la séquestration de ces protéines chez les patients SCA31 n'a pas été démontrée, et les mécanismes moléculaires à l'origine de cette maladie sont encore mal caractérisés.

L'étude des mécanismes à l'origine de SCA10 et SCA31 m'ont permis de confirmer *in vitro* l'interaction entre un facteur d'épissage, NOVA, et les répétitions à l'origine de ces deux maladies. Ces données sont décrites dans l'annexe 3.

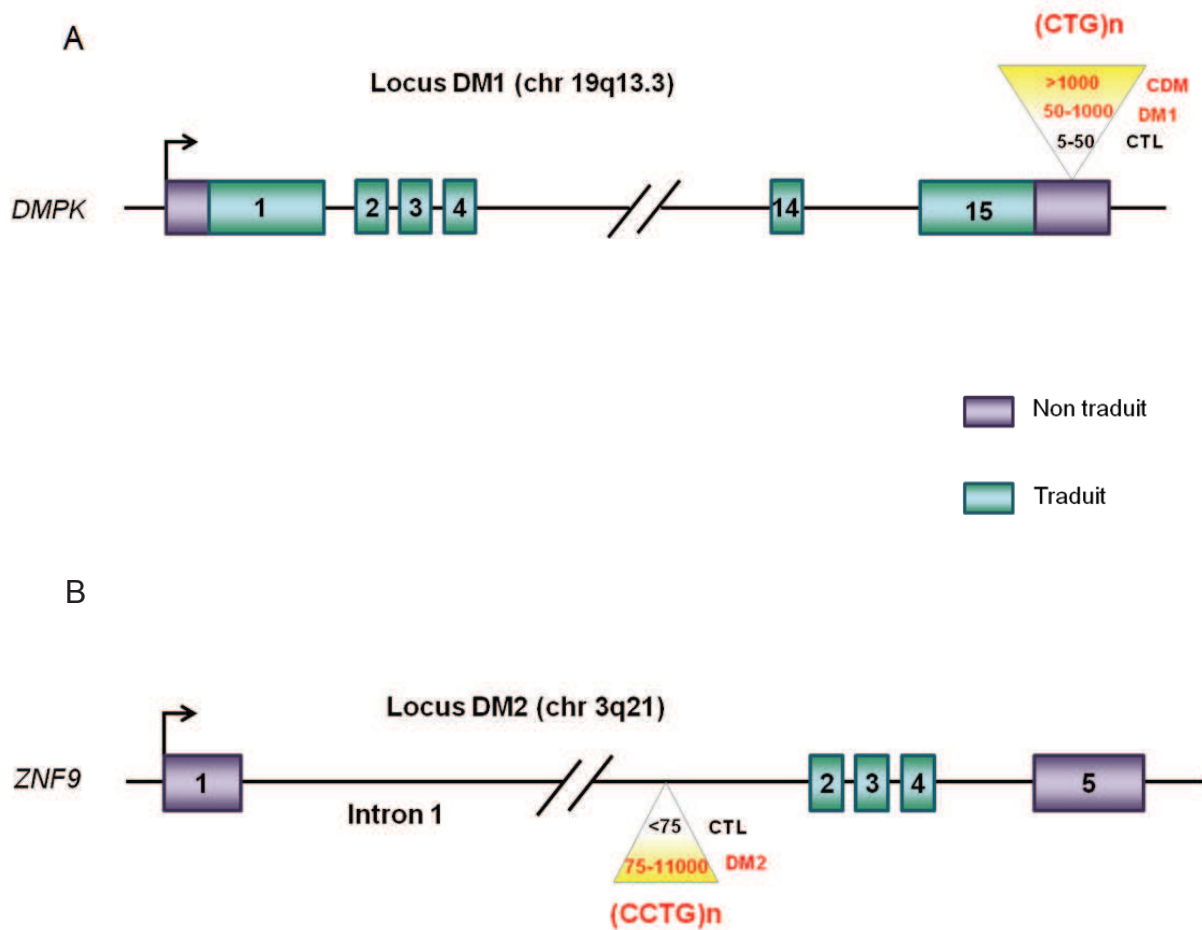


Figure 2 : Localisation génomique des expansions de nucléotides responsables des DM.

A. Les expansions de nucléotides CTG localisées dans la région 3'UTR du gène *DMPK* sont responsables de la dystrophie myotonique de type 1 (DM1) lorsqu'elles sont comprises entre 50 et 1000 répétitions, et de sa forme congénitale (CDM) lorsqu'elles sont supérieures à 1000 répétitions. Les exons du gène sont numérotés de 1 à 15.

B. Les expansions de nucléotides CCTG localisées dans le premier intron du gène *ZNF9* sont responsables de la dystrophie myotonique de type (DM2) lorsqu'elles dépassent 75 répétitions.

1.3.3. Les dystrophies myotoniques

La découverte en 1992 de la mutation à l'origine de la dystrophie myotonique (DM) de type 1, une expansion de répétitions des nucléotides CTG dans la région 3'UTR du gène *DMPK* (Brook *et al.*, 1992 ; Fu *et al.*, 1992 ; Harley *et al.*, 1992 ; Mahadevan *et al.*, 1992), a conduit à de nombreuses études aboutissant dans les années 2000 à l'identification d'un nouveau mécanisme pathologique, dit à « gain de fonction de l'ARN » (Philips *et al.*, 1998 ; Mankodi *et al.*, 2000 ; Seznec *et al.*, 2001). Les dystrophies myotoniques, étant le sujet principal de ma thèse, elles sont décrites plus en détail dans la partie qui suit.

2. Les dystrophies myotoniques : des chiffres et des lettres

Ces maladies sont les formes les plus communes des dystrophies musculaires avec une incidence d'un individu atteint sur 8500 (Harper, 1989). Les dystrophies myotoniques (DM) sont des maladies génétiques autosomales dominantes caractérisées par une faiblesse et une atrophie musculaire, une myotonie, une cataracte, une résistance à l'insuline, une diminution des IgG ainsi que par des troubles cardiaques et cognitifs. D'après le tableau clinique et la mutation responsable, on distingue deux types de DM. La dystrophie myotonique de type 1 (aussi appelée dystrophie de Steinert, DM1) et sa forme congénitale (CDM) sont dues à une expansion de répétitions des nucléotides CTG située dans la région 3'UTR de gène *DMPK* « Dystrophy Myotonic Protein Kinase » (Brook *et al.*, 1992 ; Fu *et al.*, 1992 ; Harley *et al.*, 1992 ; Mahadevan *et al.*, 1992). La dystrophie myotonique de type 2 (DM2), est due à une expansion de répétitions des nucléotides CCTG située dans le premier intron du gène *CNBP* (« Cellular Nucleic acid Binding Protein, »), aussi appelé *ZNF9* « ZiNc Finger 9 » (Liquori *et al.*, 2001) (figure 2).

Divers modèles cellulaires et murins ont montré que ces pathologies sont dues à l'accumulation de ces répétitions CUG et CCUG sous forme d'agrégats nucléaires d'ARNs pathogènes (Mankodi *et al.* 2000 ; Seznec *et al.*, 2001).

Ce chapitre s'articulera en 3 sous parties. J'aborderai dans un premier temps la description des symptômes des patients atteints de DM, puis les mécanismes moléculaires à l'origine de ces maladies et enfin les différentes stratégies thérapeutiques en cours d'étude.

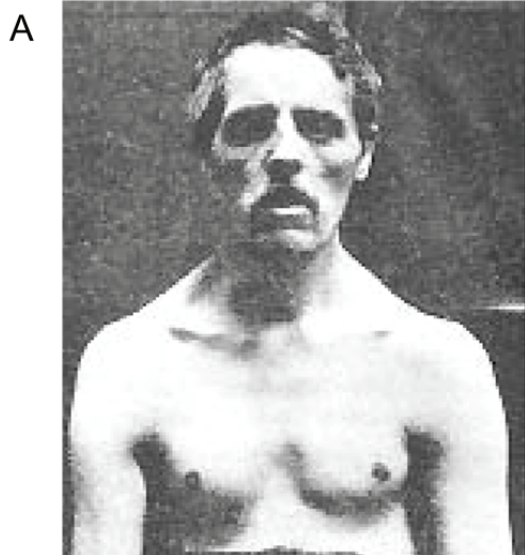


Figure 3 : Photographies de patients atteints de la dystrophie myotonique de type 1.

(D'après [www. Myotonic.org](http://www.Myotonic.org))

A. Première photographie d'un patient atteint de la forme adulte DM1, prise par le Professeur Steinert en 1909.

B. Nourrisson atteint de la forme congénitale de la DM1 (CDM).

C. Phénomène d'anticipation entre les générations mis en évidence par une famille atteinte de DM1.

2.1. Description des dystrophies myotoniques

C'est en 1909, que, de façon indépendante, Steinert (Steinert, 1909) et Batten & Gibb (Batten and Gibb, 1909) décrivent les atteintes musculaires caractéristiques de la dystrophie myotonique de type 1 (**figure 3A**) : c'est à dire une myotonie associée à un affaiblissement et à une atrophie musculaire. Par la suite, des études cliniques révélèrent le caractère multisystémique de la maladie, avec notamment l'observation d'atteintes au niveau de l'œil, du système endocrinien et nerveux (Greenfield, 1911 ; Curschmann, 1936 ; Rosman *et al.*, 1967).

D'un point de vue génétique, on distingue deux formes de dystrophies myotoniques : les dystrophies myotoniques de type 1 (DM1) et de type 2 (DM2).

2.1.1. Les différentes formes de dystrophie myotonique

La dystrophie myotonique est une maladie progressive qui se décline en plusieurs formes selon la sévérité et l'âge d'apparition des premiers symptômes.

- La forme congénitale (CDM)

La forme congénitale est la forme la plus sévère de dystrophie myotonique. Elle est associée à une transmission majoritairement maternelle (Harper, 2001), et se caractérise par de larges expansions des triplets CTG, dépassant les 1000 répétitions. La CDM touche les nourrissons qui présentent une hypotonie généralisée, une détresse respiratoire souvent fatale, une faiblesse des muscles de la face ainsi que des difficultés à s'alimenter souvent associées à des troubles de succion et de déglutition (**figure 3B**). Les fibres musculaires de ces nouveau-nés présentent des caractéristiques de retard de maturation (Sarnat and Silbert, 1976 ; Sahgal *et al.*, 1983 ; Farkas-Bargeton *et al.*, 1988 ; Furling *et al.*, 2001a ; Furling *et al.*, 2001b). De plus, les patients CDM présentent fréquemment un retard mental (O'Brien and Harper, 1984 ; Spranger *et al.*, 1997). Enfin, à la fin de l'enfance, ces patients développent la forme adulte de la DM1 avec l'apparition progressive de la myotonie, des troubles cardiaques et de la cataracte (Reardon *et al.*, 1993).

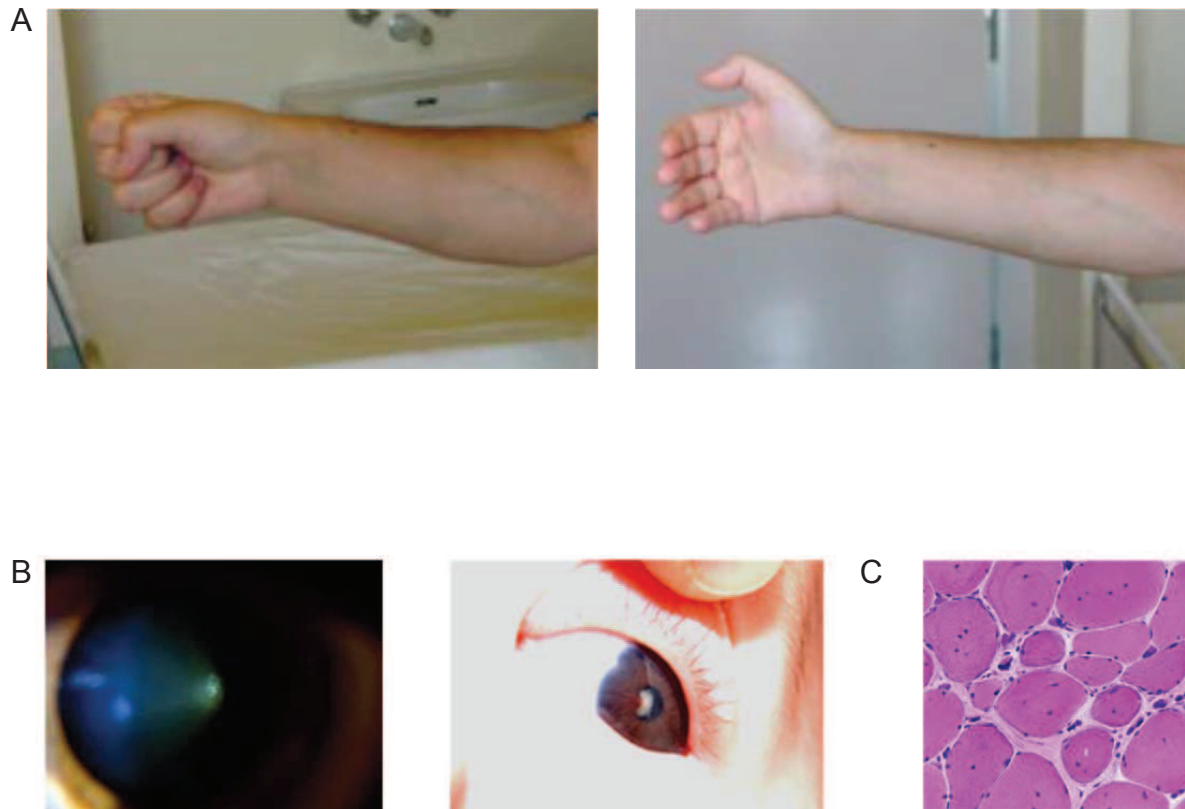


Figure 4 : Signes cliniques des patients atteints de DM.

A. Myotonie d'un patient DM1 : difficultés à relaxer un muscle squelettique après contraction (Pelargonio et al., 2002).

B. Cataracte dite en « arbre de Noël » caractéristique des patients DM. A gauche, photographie des opacités du cristallin iridescent d'un patient de 52 ans atteint de DM1. A droite, photographie de l'œil d'un nourrisson atteint de CDM.

(D'après <http://disorders.eyes.arizona.edu> et www.pediatricneuro.com)

C. Présence de noyaux centraux au niveau des fibres musculaires de patients DM1.

(D'après neuropathology-web.org)

- La forme infantile (DM1)

Les enfants atteints de cette forme présentent plusieurs centaines de répétitions CTG et développent une faiblesse musculaire ainsi qu'un retard intellectuel modéré avant l'âge de 10 ans. Cependant, ils ne montrent pas encore de myotonie ni de cataracte rendant ainsi plus difficile leur diagnostic (Turner and Hilton-Jones, 2010). De même que la forme CDM, ces enfants en grandissant développent la forme « classique » de la DM1, avec l'apparition de la myotonie, des troubles cardiaques et de la cataracte.

- La forme adulte (DM1)

Les patients atteints de la forme adulte, qui est la forme classique des dystrophies myotoniques, présentent entre 100 et 1000 répétitions CTG. Ils présentent une faiblesse musculaire, une myotonie (figure 4A), une cataracte (figure 4B), des troubles de la conduction cardiaque, des troubles du comportement et une résistance à l'insuline. Ces symptômes seront décrits plus en détail par la suite.

- La forme tardive (DM1)

Ces patients présentent entre 50 et 100 répétitions CTG. Les symptômes de ces patients sont plus discrets, et sont essentiellement représentés par une cataracte et une myotonie parfois asymptomatique. L'espérance de vie est normale chez ces patients (Machuca-Tzili *et al.*, 2005).

Il est intéressant de noter qu'il n'existe pas de séparation stricte concernant le nombre de répétitions entre individus non-atteints, adultes DM1, enfants DM1 et nouveau-nés CDM, mais ces différentes catégories peuvent être considérées comme un continuum avec un nombre de répétitions CTG plus élevé dans les formes les plus sévères. En effet, les individus non-atteints présentent entre 5 et 38 répétitions CTG, les formes tardives ou asymptomatiques présentent moins de 100 répétitions, les patients atteints de la forme adulte et infantile (DM1) présentent en moyenne entre 100 et 1000 répétitions, et les nouveau-nés atteints de la forme congénitale (CDM) présentent plus de 1000 répétitions (Harper, 1989 ; Ranum and Cooper, 2006). Toutefois, l'instabilité somatique des répétitions CTG ainsi que la pénétrance et la variabilité des symptômes empêchent l'établissement d'une corrélation stricte et précise entre le nombre de répétitions CTG et la sévérité de la maladie (Harper, 2001 ; Day *et al.*, 2005). En effet, un patient DM1 peut présenter quelques centaines de répétitions CTG dans ses cellules sanguines et plusieurs milliers dans le muscle squelettique ou cardiaque (Cleary *et al.*,

2010 ; Lopez Castel., 2011). Enfin, une aggravation de la maladie au cours des générations est observée chez les patients DM1 (figure 3C). Ce phénomène appelé « phénomène d'anticipation » est associé à une expansion du nombre de répétitions CTG lors de la transmission de l'allèle muté à l'enfant (Martorell *et al.*, 1998 ; Monckton and Caskey, 1995). Les phénomènes de contraction du nombre de répétitions ne surviendraient que plus rarement.

- La dystrophie myotonique de type 2 (DM2)

La dystrophie myotonique de type 2 a été découverte plus tardivement que la DM1. Elle représente 2% des patients atteints de DM avec une incidence d'un individu touché sur 20 000. Toutefois, cette incidence est probablement sous-estimée, ainsi une étude génétique sur une cohorte de 5535 patients a montré une incidence de la DM2 (1/1830) plus importante que celle de la DM1 (1/2760) en Finlande (Suominen *et al.*, 2011). La DM2 est due à une expansion de répétitions des tétra-nucléotides CCTG (de 75 à 11 000), localisée dans le premier intron du gène *CNBP (ZNF9)* codant pour la protéine CNBP (Ranum *et al.*, 1998 ; Day *et al.*, 1999 ; Ricker *et al.*, 1999 ; Liquori *et al.*, 2001). La taille moyenne de ces répétitions (environ 5000 CCTG) est supérieure à celle observée chez les patients DM1. Cependant et contrairement à la DM1, aucun cas de forme congénitale de DM2 n'a été décrit et aucune corrélation évidente entre la taille des répétitions CCTG et la sévérité ou l'âge d'apparition des premiers symptômes n'a été observée. De plus, le phénomène d'anticipation n'a pas été rapporté pour la DM2 et les mécanismes moléculaires pouvant expliquer une différence d'instabilité entre répétitions CTG et CCTG sont encore peu clairs. Enfin, l'apparition des symptômes est souvent plus tardive et moins prononcée que chez les patients DM1 (Moxley *et al.*, 2002). L'existence de ce paradoxe de moindre sévérité associée à des répétitions plus longues n'a pas encore été expliquée. L'étude des mécanismes à l'origine de ce paradoxe m'ont permis d'identifier *in vitro* l'interaction entre un facteur d'épissage, RBFOX, et les répétitions CCUG à l'origine de la DM2. Ces données sont décrites dans l'annexe 2.

2.1.2. Les symptômes des formes adultes des dystrophies myotoniques

Les patients atteints de DM présentent différents symptômes dont la sévérité peut varier suivant le patient ou le type de DM. Les symptômes les plus courants sont une myotonie (difficulté à relâcher un muscle après contraction), un affaiblissement des muscles de la face et des membres (distaux pour la DM1 ; proximaux pour la DM2) et une opacité du

crystallin (cataracte en « arbre de Noël »). Des troubles cardiaques, une résistance à l'insuline, des troubles de la vigilance et de la personnalité et une atrophie testiculaire ainsi qu'une calvitie frontale (chez les hommes) affectent aussi les patients DM1. Enfin, l'espérance de vie de ces patients est réduite, ainsi une étude canadienne qui a suivi pendant 10 ans un groupe de 367 patients DM1 a mis en évidence une mortalité 7,3 fois plus élevée chez les patients DM par rapport à des individus non atteints de même âge (Mathieu *et al.*, 1999).

- La myotonie

La myotonie est définie comme étant une lenteur anormale du relâchement musculaire à la suite d'une contraction volontaire ou provoquée. Elle affecte les muscles des mains des bras et de la langue de la majorité des patients DM1, mais est moins évidente chez les patients DM2 (Udd and Krahe, 2012).

La myotonie est causée par une réouverture des canaux sodiques musculaires conduisant à la production de plusieurs potentiels d'action après excitation, ce qui provoque une contraction musculaire involontaire, empêchant ainsi le muscle de se relâcher (Hudson *et al.*, 1995 ; Lehmann-Horn and Jurkat-Rott, 1999). Les myotonies congénitales sont classiquement dues à des mutations dans le gène du canal chlore musculaire (*CLCN1*, myotonie de Becker) ou à des mutations dans le gène du canal sodique musculaire (*SCN4A* ; Koch *et al.*, 1992 ; McClatchey *et al.*, 1992a ; McClatchey *et al.*, 1992b ; Hoffman *et al.*, 1995). Dans le cas des patients DM, la myotonie est due à une altération de l'épissage alternatif du canal chlore *CLCN1* conduisant à une perte d'expression de ce canal (Charlet *et al.*, 2002 ; Mankodi *et al.*, 2002). La prise en charge de la myotonie se fait essentiellement par l'utilisation de drogues anti-arythmiques, telle que le mexiletine, stabilisant les membranes et réduisant ainsi la myotonie chez les patients DM1 (Logigian *et al.*, 2010).

- La faiblesse musculaire

La faiblesse musculaire atteint environ 60% des patients DM, et touche principalement les muscles faciaux, temporaux, du cou ainsi que les muscles distaux des membres. Avec l'âge, l'atrophie s'étend aux quadriceps, aux muscles intercostaux et au diaphragme, ce qui conduit à une insuffisance respiratoire fatale, qui représente la première cause de décès des patients DM. Au contraire, chez les patients DM2, les muscles proximaux sont plus souvent touchés en premier, expliquant ainsi l'appellation initiale de la DM2 : dystrophie myotonique proximale (PROMM : PROximal Myotonic Myopathy ; Ricker *et al.*, 1995 ; Abbruzzese *et al.*, 1996 ; Meola *et al.*, 1996).

Sur le plan histologique, le muscle présente une atrophie des fibres de type 1 (fibres lentes) (DM1) ou de type 2 (fibres rapides) (DM2), une proportion importante de noyaux centraux, une faible régénération et une dégénérescence non spécifique des myofibres avec une altération des bandes Z et I (Schroder and Adam, 1968 ; Brooke and Engel, 1969).

Des mutations dans le gène de l'amphiphysine 2 (*BINI*) ont été mises en évidence chez des patients ayant des myopathies centronucléaires, dont les muscles squelettiques présentent un profil histopathologique (noyaux centraux en absence de régénération) similaire aux patients CDM (Nicot *et al.*, 2007 ; Toussaint *et al.*, 2007). Dans le cas des patients DM, la faiblesse musculaire pourrait être due à une altération de l'épissage alternatif des ARNm de *BINI*, *RYR1*, *SERCA (ATP2A1)* et *DHPR (CACNAIS)* conduisant à des défauts du couplage excitation-contraction des membranes musculaires (Kimura *et al.*, 2005 ; Fugier *et al.*, 2011 ; Tang *et al.*, 2012). Il est à noter que l'importance de l'épissage de *BINI* dans la faiblesse musculaire des patients DM est renforcée par la découverte récente d'une mutation conduisant à une perte d'inclusion de l'exon 11 de *BINI* chez des patients atteints de myopathie centronucléaire (Böhm *et al.*, 2013).

Enfin, les muscles lisses, et notamment les muscles du pharynx, de l'œsophage et du colon sont également touchés, et ceci peut-être plus fréquemment que les muscles striés (Ronblom *et al.*, 1996).

- L'atteinte du système nerveux

L'atteinte du système nerveux touche principalement les patients atteints de DM1. Ces patients développent des troubles neurologiques tels que des troubles du sommeil (hypersomnie, somnolence), des troubles des fonctions cognitives dont la mémoire immédiate et des troubles de l'humeur voire du comportement. Les patients DM2 sont plus rarement affectés par ces troubles.

Au niveau histologique, le cerveau des patients DM1 est caractérisé par des lésions gliales, des pertes neuronales et la présence de corps d'inclusion et de neurofibrilles issus de l'agrégation de la protéine TAU (*MAPT*) dans les neurones (Vermersch *et al.*, 1996). Il a aussi été montré que l'épissage alternatif des exons 2 et 3 de *MAPT* est altéré chez les patients DM1 (Sergeant *et al.*, 2001 ; Jiang *et al.*, 2004 ; Leroy *et al.*, 2006a).

- Les atteintes du système oculaire

La plupart des patients de plus de 40 ans présente une cataracte dite « en arbre de Noël ». Elle se manifeste par des opacités multicolores augmentant en nombre et en taille

(Harper, 1973). L'étude du cristallin de patients DM1 montre la présence d'inclusions lipidiques et de dépôts protéiques (Dark and Streeten, 1977 ; Abe *et al.*, 1999). Une dégénérescence de la rétine a également été décrite mais semble beaucoup plus rare.

- Les atteintes du système endocrinien

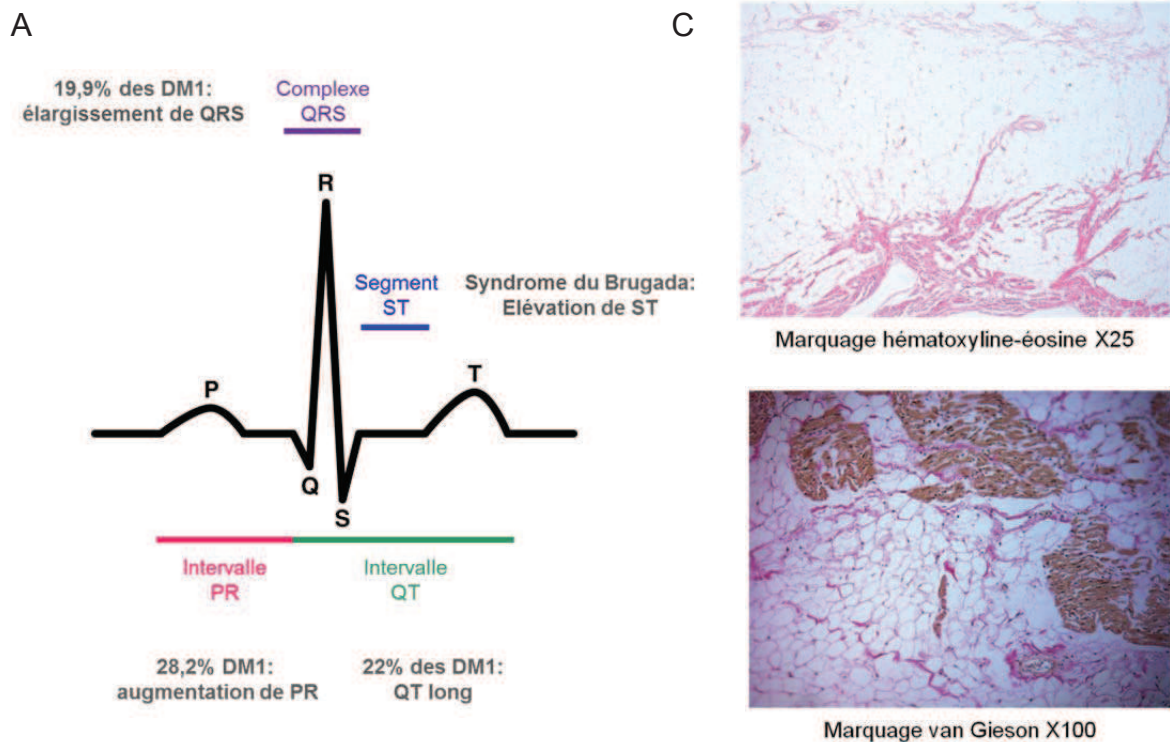
Le métabolisme de l'insuline est souvent altéré chez les patients DM ; en effet, les muscles squelettiques ne répondent pas correctement à des injections d'insuline (Moxley *et al.*, 1978 ; Moxley *et al.*, 1980 ; Moxley *et al.*, 1984). Cette résistance à l'insuline jouerait un rôle dans la survenue du diabète de type 2 chez les patients DM1 dont l'incidence est quatre fois plus importante que dans la population normale. Cette résistance à l'insuline pourrait s'expliquer par une altération de l'épissage alternatif de l'exon 11 de l'ARN pré-messager du récepteur à l'insuline (*INSR*) (Savkur *et al.*, 2001).

Le système immunitaire serait aussi affecté. En effet, les patients DM1 montrent une diminution de la quantité d'IgG par rapport à la population normale. De plus, les patients atteints de dystrophies myotoniques présentent une plus grande incidence de pilomatrixcarcinomes (tumeur localement agressive composée de cellules de la matrice de cheveux). Enfin, environ 75% des patients DM de sexe masculin présentent une atrophie testiculaire issue d'une dégénérescence des tubes séminifères sans conséquence sur la fécondité (Vazquez *et al.*, 1990) ainsi qu'une calvitie frontale. Les patientes DM de sexe féminin montrent, quant à elles, une tendance à une ménopause précoce.

2.1.3. Les symptômes cardiaques des dystrophies myotoniques

2.1.3.1. Généralités sur les propriétés cardiaques

Le cœur est un organe musculaire creux comportant 4 cavités : les oreillettes gauche et droite et les ventricules gauche et droit qui sont reliés par des valves. Le cœur est divisé en deux par un mur musculaire épais, le septum auriculo-ventriculaire, empêchant le sang de passer du cœur droit dit veineux au cœur gauche dit artériel. De façon ordonnée et séquentielle, l'ouverture et la fermeture de ces valves permettent un passage unidirectionnel du sang depuis les oreillettes vers les ventricules. L'expulsion du sang vers les organes ou les poumons se fait respectivement grâce aux valves aortique et pulmonaire. La systole, qui correspond à l'intervalle de temps entre la fermeture des valves auriculo-ventriculaires et la fermeture des valves aortique (cœur gauche) ou pulmonaire (cœur droit), est à l'origine du



B

Manifestations cardiaques	Description	% de patients DM1 touchés
Conduction cardiaque	blocage auriculo-ventriculaire	28,2
	élongation du QT > 440 ms	22
	élargissement QRS > 120 ms	19,9
	RBBB	4,4
	LBBB	5,7
Arythmie	tachycardie auriculaire	ND
	fibrillation auriculaire	5
	contraction prématurée des ventricules	14,6
	tachycardie ventriculaire	4,1
	fibrillation ventriculaire	ND
	syndrome de Brugada: élévation de ST	1,4
mort subite	0,56 / an	
Insuffisance cardiaque	prolapsus de la valve mitrale	ND
	ischémie cardiaque	ND

Figure 5 : Les atteintes cardiaques des patients atteints de DM.

A. Anomalies cardiaques observées par électrocardiogramme chez les patients DM.

B. Tableau des différents symptômes cardiaques observés chez les patients atteints de DM (d'après Petri et al., 2012). RBBB/LBBB (Right/ Left Bundle Branch Block : Bloc de branche droit/gauche).

C. Infiltration adipeuse dans le tissu cardiaque d'un patient DM1 : biopsie de ventricule droit d'un patient DM1 décédé d'une mort subite à l'âge de 11 ans (d'après Christensen et al., 2008).

pouls que l'on peut percevoir. La diastole, quant à elle, correspond à l'intervalle de temps entre la fermeture des valves aortique ou pulmonaire et la fermeture des valves auriculo-ventriculaires.

L'activité électrique du cœur peut être enregistrée grâce à une électrocardiographie et analysée sur l'électrocardiogramme (ECG) et elle se décompose ainsi (figure 5A) :

-L'onde P correspond à la contraction des oreillettes droite et gauche, c'est à dire à la dépolarisation de la membrane des cardiomyocytes composant les oreillettes.

-L'intervalle PR correspond au temps de la contraction et décontraction des oreillettes, c'est à dire à la transmission de l'influx électrique provenant du nœud sinusal des oreillettes vers les ventricules. Sur un électrocardiogramme, l'intervalle PR commence au début de l'onde P et s'arrête au démarrage de l'onde QRS. En d'autres termes, cet intervalle correspond à la conduction auriculo-ventriculaire.

-L'onde QRS correspond à la contraction des ventricules droit et gauche, c'est-à-dire, à la dépolarisation de la membrane des cardiomyocytes composant les ventricules. En effet, certaines cellules des ventricules sont spécialisées dans la conduction électrique des oreillettes aux ventricules : ce sont les cellules du faisceau de His débutant au nœud auriculo-ventriculaire se divisant en deux branches principales dans les parois des ventricules puis se ramifiant de la pointe du cœur dans l'ensemble des parois en réseau de Purkinje (fibres de Purkinje).

-L'onde T correspond à la relaxation des ventricules, c'est-à-dire, à la repolarisation des membranes des cardiomyocytes composant les ventricules.

-L'intervalle QT correspond à la contraction et relaxation ventriculaires (dépolarisation et repolarisation ventriculaire). Cet intervalle correspond au temps de systole et sa durée varie en fonction de la fréquence cardiaque. Quand la fréquence cardiaque augmente ou diminue, cet intervalle diminue ou augmente, respectivement.

2.1.3.2. Les symptômes cardiaques des patients DM

Plus de 80% des patients atteints de DM présentent des symptômes cardiaques, ces atteintes constituent la seconde cause de mortalité (30%) après l'atteinte respiratoire (40%) (Matthieu *et al.*, 1999). Les biopsies de patients DM1 montrent des changements non spécifiques du cœur tels qu'une fibrose interstitielle, une infiltration adipeuse et une légère hypertrophie des cardiomyocytes (Phillips and Harper, 1997). Ces atteintes cardiaques peuvent conduire à un dysfonctionnement progressif du ventricule gauche, une ischémie ou à

une arythmie cardiaque entraînant une mort soudaine. Chez les patients atteints de DM2, les défauts cardiaques sont similaires mais généralement moins marqués (Day *et al.*, 2003).

En conclusion, les manifestations cardiaques présentent chez les patients DM peuvent être classées en 3 groupes : les défauts de conduction cardiaque, les arythmies et les manifestations cardiaques autres.

- Les anomalies de la conduction cardiaque

Les défauts de conduction cardiaque touchent 40% des patients atteints de DM1 et conduisent fréquemment à l'implantation d'un pacemaker. Ces défauts de conduction entraînent des blocs auriculo-ventriculaires (BAV), et sont causés par un retard de la propagation de l'influx électrique le long du système de conduction. Ce retard reflète un défaut de la conduction auriculo-ventriculaire se traduisant sur l'ECG par une élongation de l'intervalle PR ($PR > 220$ ms) et/ou un défaut de la dépolarisation des ventricules se traduisant par un élargissement du complexe QRS ($QRS > 120$ ms) touchant respectivement 28,2% et 19,9% d'un groupe de 1828 patients DM1 (Petri *et al.*, 2012) (figure 5B).

Des études post-mortem ont montré que ces anomalies de conduction pourraient être la conséquence d'altérations non spécifiques telles que la fibrose interstitielle et l'infiltration de cellules adipeuses (figure 5C) (Pelargonio *et al.*, 2002 ; Miragoli *et al.*, 2007). Cependant, il n'est pas exclu que ces défauts de la conduction cardiaque puissent aussi être dus à des altérations spécifiques du faisceau de His ou des fibres de Purkinje dont la nature et les causes moléculaires et cellulaires restent à déterminer (Phillips and Harper, 1997 ; Babuty *et al.*, 1999 ; Groh *et al.*, 2008).

Enfin, pour les patients DM1, les anomalies de conduction cardiaque semblent progresser avec l'âge du patient et selon le nombre de répétitions CTG (Clarke *et al.*, 2001 ; Ha *et al.*, 2012). De même, pour les patients DM2, ces anomalies sont corrélées à l'âge du patient et à la sévérité des symptômes musculaires (Ha *et al.*, 2012).

- Les anomalies du rythme cardiaque

Des épisodes de tachycardie et de fibrillations auriculaires et/ou ventriculaires sont retrouvés chez au moins 25% des patients DM (Olofsson *et al.*, 1988). Ces arythmies peuvent conduire à une mort soudaine, qui peut être prévenue par l'implantation d'un défibrillateur (Pelargonio *et al.*, 2002 ; Groh *et al.*, 2008). Ces arythmies se traduisent par des prolongations de l'onde QT sur un ECG touchant 22% des DM1 (Petri *et al.*, 2012) reflétant un défaut de

dépolarisation et de repolarisation ventriculaires (Umeda *et al.*, 1999). Les mécanismes moléculaires responsables de ces arythmies sont encore peu connus.

Le syndrome de Brugada est une canalopathie caractérisée par un dysfonctionnement d'un canal ionique cardiaque (sodique, calcique ou potassique) et également par des altérations typiques sur l'électrocardiogramme, décrites pour la première fois par Osher et Wolff en 1953 et élucidées en 1991 par les frères Pedro et Josep Brugada. Plus précisément, cette maladie génétique rare est caractérisée par une élévation (déviation au dessus de la ligne de base) du segment ST associée à des anomalies de l'onde T au niveau des dérivations précordiales droites V1, V2 et V3 et à un aspect de bloc de branche droit à l'électrocardiogramme associés à un risque élevé d'arythmie ventriculaire pouvant entraîner syncope et mort subite, sur un cœur structurellement sain. La transmission se fait sur un mode autosomique dominant et la pénétrance est variable. La prévalence estimée est d'environ 1/1000 dans les pays asiatiques, probablement plus faible ailleurs. Bien que la probabilité d'avoir une mutation ne dépende pas du genre, le rapport homme : femme atteint est de 8-10 :1, ce qui suggère une influence hormonale (testostérone) non expliquée (Shimizu *et al.*, 2007). Il est intéressant de noter qu'une étude menée sur 500 électrocardiogrammes de patients DM1 a révélé que la prévalence du syndrome de Brugada est quatre-vingt fois plus élevée chez les patients DM1 que dans la population normale (Wahbi, Duboc poster G013 *Archives of Cardiovascular Diseases*, Volume 102, March, 2009, p. S66). Enfin, il a été reporté des patients DM2 présentant un ECG similaire à celui de patients atteints du syndrome de Brugada (Rudnik-Schöneborn *et al.*, 2010).

- Autres manifestations cardiaques

D'autres anomalies cardiaques ont été reportées chez les patients DM. Notamment, 25 à 40% des patients ont un prolapsus de la valve mitrale en raison d'un dysfonctionnement papillaire. Plus rarement, les patients DM1 présentent aussi des atteintes cardiaques ischémiques sous forme d'angine stable, instable ou d'infarctus du myocarde, et 1,8% des patients DM1 présentent des insuffisances cardiaques congestives (Bhakta *et al.*, 2004) (figure 5B).

2.1.3.3. Différences cardiaques entre DM1 et DM2

Les patients DM1 et DM2 ont une plus grande probabilité de présenter des anomalies cardiaques que la population générale, mais la prévalence est plus importante pour les patients

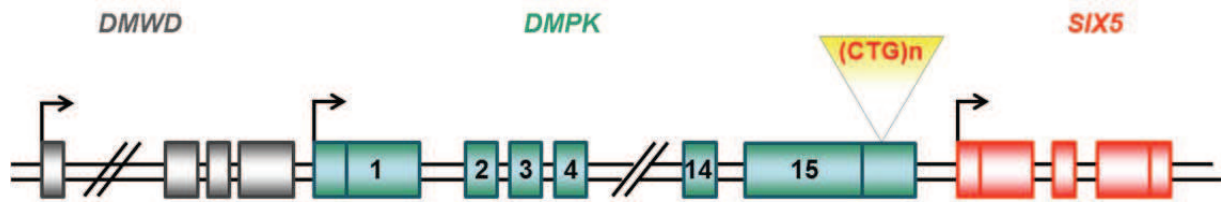


Figure 6 : Schéma du gène DMPK et de ses gènes adjacents.

Les flèches noires correspondent aux promoteurs des gènes.

DMWD : Dystrophia Myotonica WD repeat-containing protein; *DMPK* : Dystrophia Myotonica Protein Kinase ; *SIX5* : Sine oculis homeoboX 5.

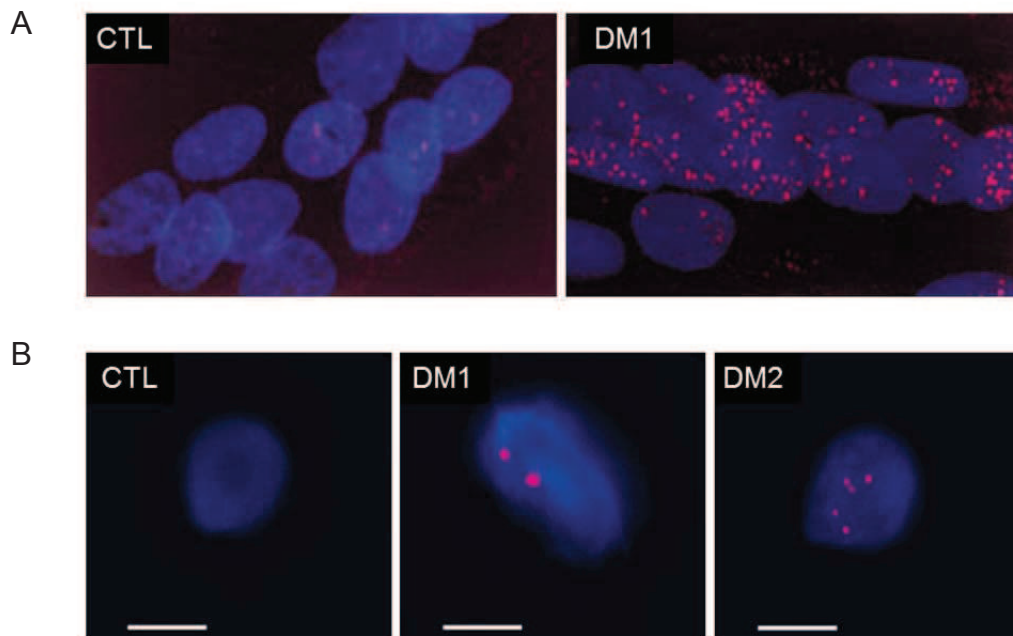


Figure 7 : Présence de foci nucléaires chez les patients DM1 et DM2.

A. Les foci contenant les expansions CUG dans les myoblastes DM1 (à droite) sont détectés par hybridation *in situ* avec un sonde CAG et sont absents dans les myoblastes contrôles (à gauche) (*Davis et al., 1997*).

B. Les foci contenant les expansions CUG ou CCUG sont détectés par hybridation *in situ* avec des sondes CAG et CAGG dans des coupes de muscles squelettiques DM1 et DM2 (à droite) et sont absents dans du muscle squelettique contrôle (à gauche) (*Liquori et al., 2001*).

DM1 que pour les patients DM2. En effet, une étude effectuée sur 38 patients DM2, 76 patients DM1 et 76 individus non atteints de DM, a mis en évidence que 62% des patients DM1, 40% des patients DM2 et 12% des individus non DM présentaient des défauts cardiaques (Wahbi *et al.*, 2009). Les patients DM2 ayant des anomalies cardiaques présentaient des défauts classiques de la DM avec des troubles de la conduction cardiaque (35,9%), un dysfonctionnement systolique du ventricule gauche (15,7%), et des arythmies ventriculaires (15,8%). Toutefois, la comparaison entre les anomalies cardiaques des patients DM1 par rapport à celles des patients DM2 a montré que l'élongation du segment PR sur l'ECG et les blocs auriculo-ventriculaires étaient plus importants chez les patients DM1 que chez les patients DM2 (Wahbi *et al.*, 2009). Cette fréquence et cette sévérité des troubles cardiaques plus faibles chez les patients DM2 par rapport aux patients DM1 ont été confirmées récemment. Ainsi l'étude de 104 patients DM2 et de 117 patients DM1 a mis en évidence que 10% des patients DM2 contre 31% des patients DM1 présentent un segment PR dépassant 200 ms ; de même, 6 patients DM2 contre 28 patients DM1 possèdent un pacemaker ou un défibrillateur cardiaque implantable (Sansone *et al.*, 2012).

2.2. Les mécanismes moléculaires à l'origine des dystrophies myotoniques

Depuis la découverte de la mutation à l'origine de la dystrophie myotonique de type 1, de nombreuses recherches ont été menées afin de comprendre comment des répétitions de trinuécléotides situées dans une région non codante pouvaient conduire aux symptômes des DM.

2.2.1. L'haploinsuffisance des gènes *DMPK*, *SIX5* et *DMWD*

L'expansion de répétitions des nucléotides CTG est localisée dans la partie 3'UTR du gène *DMPK*, lui-même situé entre les gènes *DMWD* et *SIX5* (DMAHP) (figure 6). Une des premières hypothèses émises a été que ces répétitions altèrent, par un effet *en cis*, le niveau d'expression des protéines *DMPK*, *SIX5* et *DMWD*.

En effet, les ARNm portant de longues répétitions CUG ne sont pas exportés du noyau et sont retenus sous forme d'agrégats nucléaires (Sabouri *et al.*, 1993 ; Davis *et al.*, 1997), conduisant ainsi à une diminution d'expression de 50% du gène *DMPK* (Fu *et al.*, 1992 ; Carango *et al.*, 1993 ; Maeda *et al.*, 1995 ; Davis *et al.*, 1997 ; Ueda *et al.*, 1999 ; Furling *et al.*, 2001) (figure 7A).

Equipe et Lignée	Promoteur	Répétitions	Tissus altérés	foci	CUGBP1	MBNL1	Symptômes	Références
C. Thornton HSALR	HSA	~250	muscles squelettiques adultes	nucléaires	pas d'augmentation	colocalisation avec foci CUG	myotonie et légère myopathie	<i>Mankodi et al., 2000</i>
T Cooper EPA960	CMV-Dox	~960 CTG interrompus par CTGGA tous les 20 CTG	coeur ou muscles squelettiques	nucléaires	augmentation	colocalisation avec foci CUG	cardiomyopathie, arythmies légère myotonie dystrophie musculaire	<i>Wang et al., 2007</i> <i>Orengo et al., 2008</i>
G. Gourdon DM300	DMPK humain	~300	coeur muscles squelettiques cerveau	nucléaires	pas d'augmentation	colocalisation avec foci CUG	myotonie	<i>Seznec et al., 2001</i>
DM550		~550		nucléaires	pas d'augmentation	colocalisation avec foci CUG	faiblesse musculaire	<i>Vignaud et al., 2010</i>
DMSXL		>700		nucléaires	pas d'augmentation	colocalisation avec foci CUG	taille réduite troubles comportementaux et de mémoire anxiété	<i>Gomez-Peirera et al., 2007</i> <i>Hernandez-Hernandez et al., 2013</i>
M. Mahadevan (CTG)5 DMPK 3'UTR	DMPK-Tet	5	coeur	non	augmentation dans muscle pas dans coeur	non	troubles cardiaques	<i>Mahadevan et al., 2006</i> <i>Yadava et al., 2008</i>
S. Reddy α-MHC-LacZ-CTG)400	α-MHC	~400	coeur adulte	cytoplasmiques	augmentation	colocalisation avec foci CUG	légers troubles cardiaques	<i>Dansithong et al., 2008</i>

Tableau 1: Modèles murins démontrant le gain de fonction de l'ARN muté dans les dystrophies myotoniques.

De plus, la présence de ces répétitions CTG conduit à l'hétérochromatinisation de l'ADN (Otten *et al.*, 1995 ; Steinbach *et al.*, 1998 ; Filippova *et al.*, 2001 ; Cho *et al.*, 2005), inhibant ainsi l'expression du gène *SIX5* situé en aval du gène *DMPK* (Klesert *et al.*, 1997 ; Thornton *et al.*, 1997 ; Gennarelli *et al.*, 1999 ; Korade-Mirnic *et al.*, 1999 ; Inukai *et al.*, 2000).

Enfin, une étude suggère que l'expression du gène *DMWD*, localisé en amont du gène *DMPK*, serait également diminuée chez les patients DM1 (Alwazzan *et al.*, 1999). Toutefois, cette altération de l'expression de *DMWD* n'a pas été confirmée (Frisch *et al.*, 2001).

L'ensemble de ces résultats suggèrerait donc un modèle, basé sur les maladies à perte de fonction, lié à une diminution de l'expression du gène *DMPK* par rétention de l'ARNm muté, et du gène *SIX5* par inhibition de sa transcription due à l'hétérochromatinisation de son promoteur.

2.2.2. Le gain de fonction de l'ARN muté

Ce modèle d'haploinsuffisance des gènes *DMPK* et *SIX5* fut contesté par une première étude montrant que l'expression de 200 CTG dans le contexte de la région 3'UTR du gène *DMPK* était suffisante pour induire une inhibition de la myogenèse de cellules C2C12 (Amack *et al.*, 1999). Puis, la génération de divers modèles animaux et la découverte de la mutation responsable de la DM2 ont permis alors de proposer un modèle de gain de fonction en *trans* de l'ARN muté. En effet, des souris invalidées pour le gène *Dmpk* (*Dmpk*^{-/-}) développent une myopathie légère, mais non caractéristique des dystrophies myotoniques (Berul *et al.*, 1999 ; Saba *et al.*, 1999 ; Berul *et al.*, 2000). De même, des souris invalidées pour le gène *Six5* (*Six5*^{-/-}) développent une cataracte sans les opacités iridescentes ni localisation postérieure typique des patients DM1 (Klesert *et al.*, 2000 ; Sarkar *et al.*, 2000). De plus, les souris hétérozygotes *Dmpk*^{+/-} ou *Six5*^{+/-}, mimant la situation des patients DM1, ne présentent pas ou très peu de phénotype. Au contraire, des souris transgéniques exprimant des expansions de répétitions CTG, soit dans le contexte du gène *DMPK*, soit dans le contexte du gène *HSA* (« human skeletal actin »), reproduisent certains symptômes des DM, notamment la myotonie (Mankodi *et al.*, 2000 ; Seznec *et al.*, 2001) (tableau 1). Enfin, à partir de 1996, des études génétiques ont indiqué qu'il existait un second locus (DM2/PROMM) pour les dystrophies myotoniques (Meola *et al.*, 1996 ; Ranum *et al.*, 1998 ; Day *et al.*, 1999 ; Ricker *et al.*, 1999). Ces travaux ont conduit l'équipe de Laura Ranum à identifier en 2001 la mutation responsable de la dystrophie myotonique de type 2 : une expansion de répétitions des

nucléotides CCTG dans le premier intron du gène *CNBP* (*ZNF9*) (Liquori *et al.*, 2001 ; **figure 7B**). La découverte que les patients DM2, qui présentent un phénotype quasi-similaire à celui des patients DM1, possèdent une expansion de nucléotides quasi-identique aux patients DM1, mais portée par un gène différent de *DMPK* ou de *SIX5*, a permis d'établir que l'ARN muté est bien responsable des symptômes des dystrophies myotoniques, et non l'haploinsuffisance du gène portant la mutation.

Enfin, des études ont été menées afin de connaître le rôle des protéines codées par les gènes *DMPK* et *ZNF9* portant respectivement les répétitions CTG et CCTG. En 1997, l'équipe de Wieringa a mis en évidence le rôle de *DMPK* dans l'homéostasie du calcium. Ainsi, l'absence de *DMPK* dans les myotubes de souris *Dmpk*^{-/-} conduirait à une augmentation du calcium intracellulaire et à des défauts de couplage d'excitation-contraction (Benders *et al.*, 1997). Plus récemment, la localisation de cette protéine a été étudiée. En effet, la protéine *DMPK* migre au niveau de l'enveloppe nucléaire des cardiomyocytes de rat au cours de la différenciation induite par le facteur LIF (« Leukemia Inhibitor Factor ») et au cours de la mitose de cellules C2C12 (Harmon *et al.*, 2008). Dans cette même étude, la déplétion de *Dmpk* empêche la différenciation des myoblastes C2C12 (Harmon *et al.*, 2008). Enfin, la surexpression ou la déplétion de *Dmpk* dans des cellules C2C12 perturbe l'intégrité de la membrane nucléaire (Harmon *et al.*, 2011). En ce qui concerne la protéine *ZNF9*, son expression est ubiquitaire et elle a été localisée au niveau des bandes I des sarcomères du muscle squelettique et au niveau des axones dans les neurones chez l'homme (Massa *et al.*, 2010). Ses fonctions sont encore inconnues.

2.2.3. Le gain de fonction de la protéine CUGBP1

La découverte de la présence de répétitions CTG ou CCTG qui sont transcrites en ARN CUG ou CCUG, mais qui ne sont pas traduites et s'accumulent dans le noyau sous forme d'agrégats d'ARN a conduit à l'hypothèse d'un mécanisme *en trans* reposant sur la séquestration de protéines spécifiques liant ces ARN mutés (Timchenko *et al.*, 1996b ; Roberts *et al.*, 1997 ; Philips *et al.*, 1998). Ainsi, en 1996, des expériences de liaison à de courts motifs CUG ont permis l'identification de la protéine CUGBP1 par l'équipe de Lubov Timchenko (Timchenko *et al.*, 1996 ; Timchenko *et al.*, 2001).

Cette protéine, appartenant à une famille de six paralogues (la famille CELF « CUGBP & ETR3-Like Family »), possède trois domaines de liaison à l'ARN de type RRM (« RNA Recognition Motif ») (Ladd *et al.*, 2001 ; Barreau *et al.*, 2006). Les fonctions de CUGBP1 sont multiples et dépendent de sa localisation subcellulaire. En effet, elle régule

l'épissage alternatif dans le noyau (Philips *et al.*, 1998), tandis qu'elle régule dans le cytoplasme l'initiation de la traduction (Timchenko *et al.*, 1999 ; Timchenko and Caskey, 1999 ; Timchenko *et al.*, 2002 ; Timchenko *et al.*, 2004 ; Timchenko *et al.*, 2005) et la stabilité d'ARNm spécifiques (Paillard *et al.*, 2003 ; Vlasova *et al.*, 2008).

Cependant, l'hypothèse selon laquelle CUGBP1 serait séquestrée par les longues répétitions CUG ou CCUG a été rejetée car aucune colocalisation de cette protéine avec les agrégats de répétitions CUG ou CCUG n'a été observée chez les patients DM1 ou DM2. De plus, il a été montré que la protéine CUGBP1 lie de façon préférentielle des séquences ARN de type UGU, la liaison de la CUGBP1 à des motifs ARN CUG étant faible et peu reproductible (Michalowski *et al.*, 1999 ; Takahashi *et al.*, 2000 ; Fardaei *et al.*, 2001 ; Ladd *et al.*, 2001 ; Mankodi *et al.*, 2001 ; Marquis *et al.*, 2006 ; Mori *et al.*, 2008 ; Tsuda *et al.*, 2009 ; Teplova *et al.*, 2010).

Bien que la protéine CUGBP1 ne semblait pas impliquée *via* des interactions avec des motifs ARN de type CUG ou CCUG, son rôle dans la DM a été reconsidéré quand une élévation de sa phosphorylation et de sa demi-vie a été observée dans des échantillons cardiaques de patients DM1 ainsi que dans certains modèles murins et cellulaires exprimant de longues répétitions CUG (Roberts *et al.*, 1997 ; Savkur *et al.*, 2001 ; Timchenko *et al.*, 2001 ; Wang *et al.*, 2007). En effet, selon un mécanisme encore mal connu, les répétitions CUG activeraient la protéine kinase C (PKC) qui phosphorylerait la CUGBP1, conduisant ainsi à une augmentation de sa stabilité et donc de sa quantité (Kuyumcu-Martinez *et al.*, 2007). Toutefois, les données au sujet de l'accumulation de CUGBP1 sont contradictoires. En effet, l'augmentation de la quantité de CUGBP1 est observée dans des échantillons de cœur d'un modèle murin exprimant 960 répétitions CUG interrompues (Wang *et al.*, 2007), mais pas dans un modèle exprimant 250 répétitions non interrompues (Lin *et al.*, 2006). Bien que ces données soient contradictoires, un consensus semble apparaître dans la littérature, et une augmentation modérée de la concentration de CUGBP1 chez les patients DM1 semble aujourd'hui admise. Cette augmentation est moins claire chez les patients DM2. En effet, une étude analysant des extraits protéiques totaux issus de cellules DM2 ne montre pas d'augmentation de la protéine CUGBP1 (Pelletier *et al.*, 2009), alors qu'une analyse utilisant des extraits cytoplasmiques issus de myoblastes de patients DM2 révèle une augmentation (Salisbury *et al.*, 2009). De même, une augmentation de la concentration de CUGBP1 serait observée dans un modèle murin DM2 exprimant une centaine de répétitions CCUG (Salisbury *et al.*, 2009), mais pas dans un autre modèle murin exprimant 300 répétitions CCUG (Laura Ranum, communication personnelle).

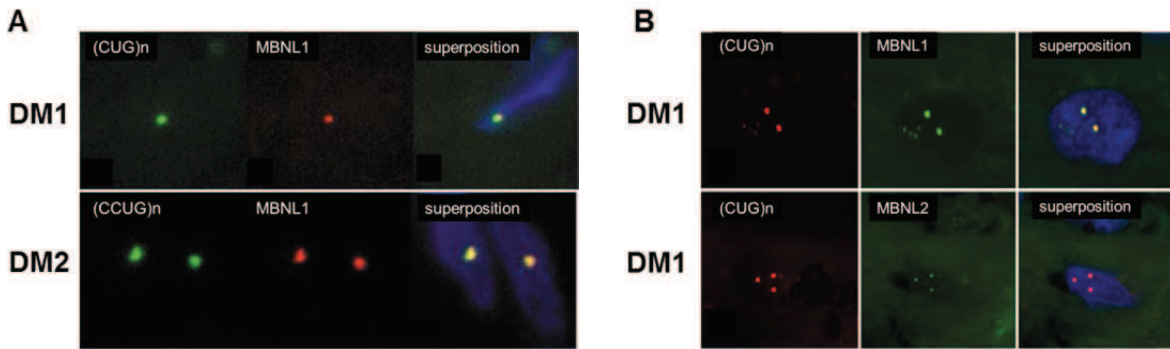


Figure 8 : Agrégats nucléaires des expansions CUG et CCUG avec les protéines MBNL.

A. Fibres musculaires de patients DM1 et DM2 présentant des foci contenant les expansions CUG ou CCUG (vert), détectées par hybridation *in situ*, et MBNL1 (rouge) détecté par immunofluorescence (Mankodi et al., 2001).

B. Biopsies cardiaques de patients DM1 présentant des foci contenant les expansions CUG ou CCUG (rouge), détectées par hybridation *in situ*, et MBNL1 et MBNL2 (vert) détectés par immunofluorescence (Mankodi et al., 2005).

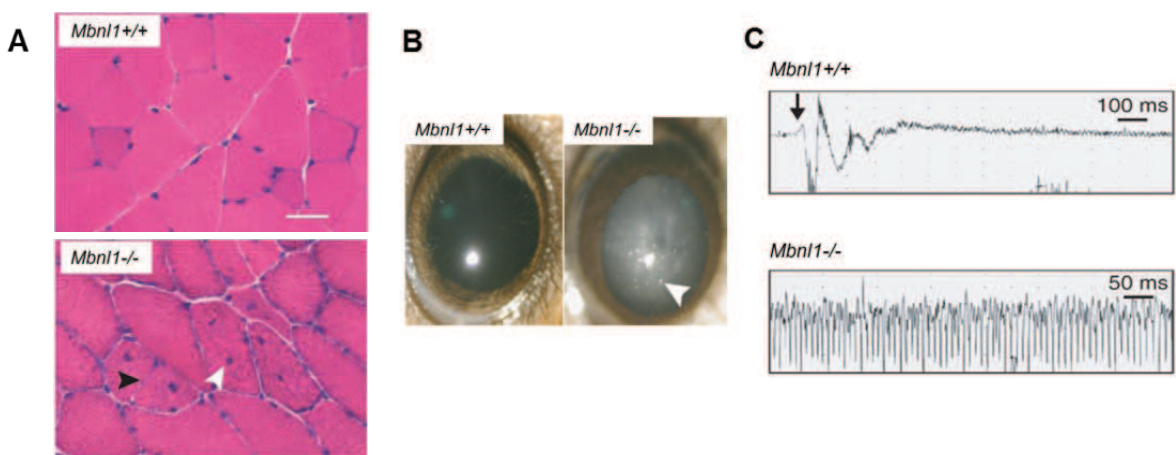


Figure 9 : L'inactivation de Mbn1 chez la souris reproduit certains symptômes des DM. (Kanadia et al., 2003).

A. Marquage à l'hématoxyline-éosine des coupes de muscle des souris *Mbn1*^{+/+} et *Mbn1*^{-/-}. Présence de noyaux centraux dans les myofibres des souris *Mbn1*^{-/-}. La flèche blanche indique un noyau central et la flèche noire indique une myofibre fractionnée.

B. Cataracte dite en « arbre de Noël » chez les souris *Mbn1*^{-/-}. La flèche blanche indique une opacité du cristallin.

C. Electromyographie du muscle quadriceps des souris *Mbn1*^{+/+} et *Mbn1*^{-/-}, montrant une myotonie chez les *Mbn1*^{-/-}.

Enfin, des modèles murins de surexpression de CUGBP1 reproduisent une partie des symptômes musculaires et cardiaques des patients DM1 (**tableau 2**) (Timchenko *et al.*, 2004 ; Ho *et al.*, 2005a ; Koshelev *et al.*, 2010 ; Ward *et al.*, 2010). De même, la surexpression de CUGBP1 *in cellulo* reproduit certaines altérations de l'épissage alternatif observées chez les patients DM1, telles que les inclusions de l'exon 5 de la troponine T cardiaque (*cTNT/TNNT2*), de l'exon 11 du récepteur à l'insuline *INSR*, de l'exon 6B de la beta-tropomyosine et la rétention de l'intron 2 du canal chlore *CLCN1* (Philips *et al.*, 1998 ; Savkur *et al.*, 2001 ; Charlet *et al.*, 2002 ; Ho *et al.*, 2005a ; Kalsotra *et al.*, 2008). Cependant, les épissages de l'exon F de *TNNT3*, de l'exon 11 de *BINI*, de l'exon 20 de *ATP2A1* (*SERCA*) ou encore de l'exon 7a de *CLCN1*, qui sont altérés chez les patients DM, ne sont pas régulés par CUGBP1. Ceci suggère qu'un ou plusieurs autres facteurs sont impliqués dans les DM.

2.2.4. La perte de fonction des protéines MBNL

En 2000, l'équipe de Maurice Swanson a découvert une nouvelle protéine grâce à des tests de liaison à des ARNs contenant de longues répétitions CUG. Cette protéine, nommée MBNL1 « Muscleblind like 1 », se lie spécifiquement aux ARNs contenant des répétitions CUG (Miller *et al.*, 2000). Puis, des expériences d'ARN-FISH couplées à une immunofluorescence ont montré que MBNL1 colocalise parfaitement avec les agrégats d'ARN CUG et CCUG chez les patients DM1 et DM2 (**figure 8**) (Fardaei *et al.*, 2001 ; Mankodi *et al.*, 2001 ; Cardani *et al.*, 2006 ; Holt *et al.*, 2009 ; Perdoni *et al.*, 2009). La séquestration de MBNL1 par les ARNs contenant les longues répétitions CUG et CCUG a été alors mise en évidence par des tests d'épissage et des expériences de FRAP (Dansithong *et al.*, 2005 ; Ho *et al.*, 2005 ; Hino *et al.*, 2007 ; Goers *et al.*, 2010). De plus, la génération de souris invalidées pour le gène *Mbnl1* (*Mbnl1*^{-/-}) reproduisant la plupart des symptômes musculaires et oculaires des DM, a confirmé le rôle important de la séquestration de MBNL1 dans la pathogénèse des DM (**figure 9**) (Kanadia *et al.*, 2003 ; Matynia *et al.*, 2010). Enfin, la surexpression de MBNL1 dans les muscles d'un modèle murin exprimant 200 répétitions CUG et mimant la DM (HSA^{LR}) permet de diminuer la myotonie (Kanadia *et al.*, 2006). La séquestration de MBNL1 par des ARNs contenant des répétitions CUG ou CCUG s'apparente donc à une perte de fonction de cette protéine, ce qui conduirait au phénotype des dystrophies myotoniques.

MBNL1 est une protéine d'environ 42 kDa régulant l'épissage alternatif d'ARNs pré-messagers spécifiques. Cette protéine appartient à une famille de trois membres : MBNL1,

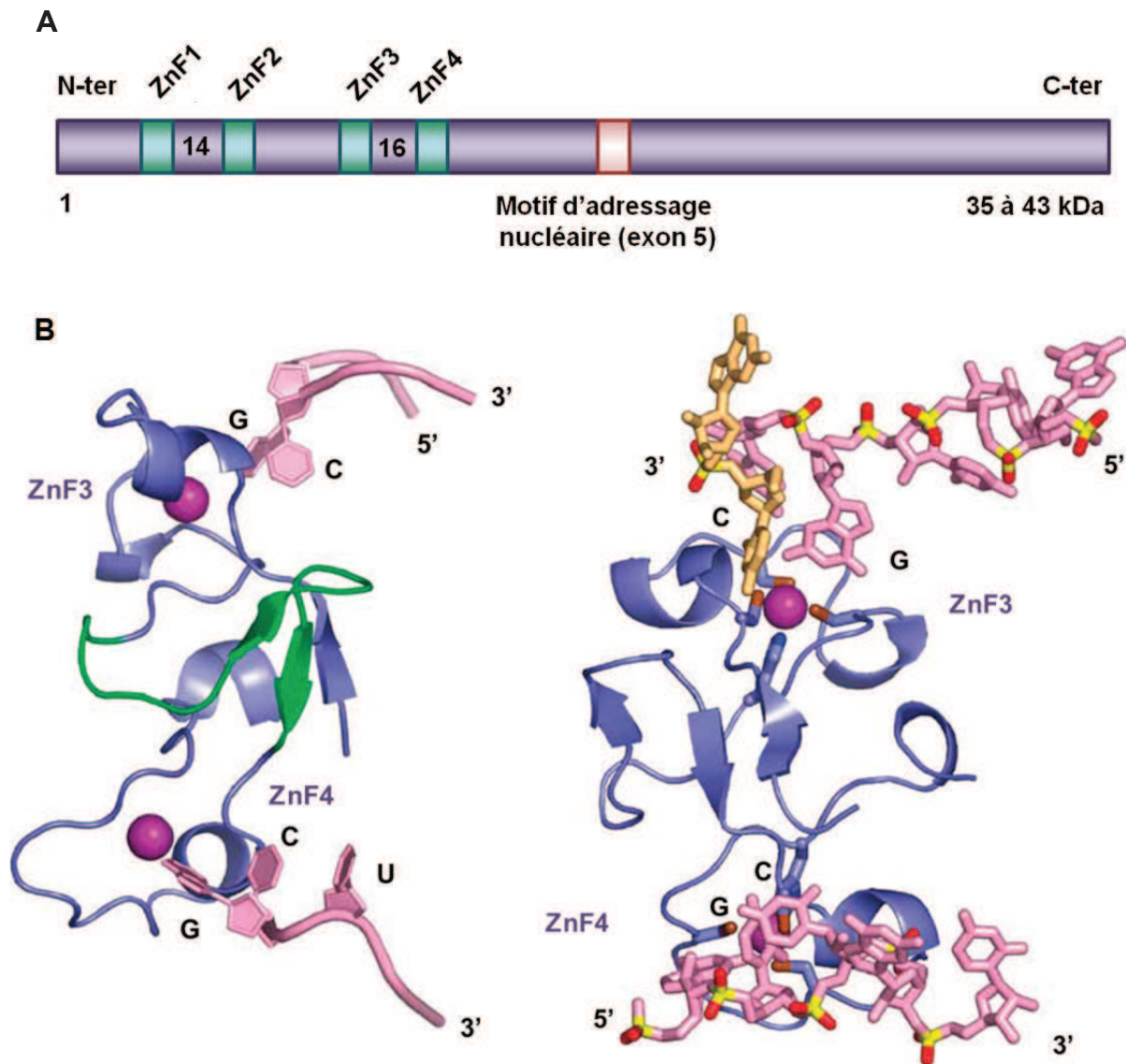


Figure 10 : Représentation schématique et structure de MBNL1.

A. Les quatre doigts de zinc (ZnF) présents à l'extrémité N-terminale sont représentés par des rectangles verts. Les chiffres 14 et 16 correspondent au nombre d'acides aminés séparant les doigts de zinc ZnF1 et ZnF2 et les doigts de zinc ZnF3 et ZnF4, respectivement. Le motif d'adressage nucléaire (NLS), codé par l'exon 5, est représenté par un rectangle rose et n'est présent que dans les isoformes 37, 38, 42 et 43 de MBNL1 (*Tran et al., 2011*).

B. Structure cristalline des domaines à doigts de zinc ZnF3 et ZnF4 de MBNL1 en complexe avec l'ARN r(CGCGUGU). Sur les deux représentations, ZnF3 et ZnF4 interagissent avec les ribonucléotides GC. Les atomes de zinc sont représentés par des boules roses, et les molécules d'ARN sont représentées en rose et orange (*Teplova and Patel, 2008*).

MBNL2 et MBNL3, dont les expressions sont régulées selon le type tissulaire et le stade de développement. Ainsi, MBNL1 est principalement exprimé dans les muscles squelettiques et cardiaque, MBNL2 est principalement exprimé dans le cerveau et le cœur, alors que MBNL3 est principalement exprimé dans le placenta et au stade embryonnaire (Fardaei *et al.*, 2002 ; Kanadia *et al.*, 2003). De plus, alors que l'expression de MBNL1 et MBNL2 augmente au cours du développement, celle de MBNL3 diminue (Kanadia *et al.*, 2003b). D'autre part, la localisation subcellulaire de MBNL1 est tout d'abord cytoplasmique puis devient majoritairement nucléaire au cours du développement du muscle squelettique (Lin *et al.*, 2006). Enfin, l'épissage alternatif de MBNL1 donne naissance à plusieurs isoformes de cette protéine comprises entre 35 et 43 kDa (Kino *et al.*, 2004). Ainsi, la région codée par l'exon 3, située entre les doigts de zinc Znf2 et Znf3, est importante pour la liaison de MBNL1 à l'ARN (Kino *et al.*, 2004), et la région codée par l'exon 5 semble être impliquée dans la localisation nucléaire de MBNL1 (figure 10A) (Lin *et al.*, 2006 ; Terenzi *et al.*, 2010 ; Fernandez-Costa *et al.*, 2010 ; Tran *et al.*, 2011). MBNL1 possède quatre domaines à doigts de zinc de type CCCH (3 cystéines et 1 histidine) dans son domaine N-terminal (Miller *et al.*, 2000). Chacun de ces doigts de zinc reconnaît un motif UGC (figure 10B) (Teplova and Patel, 2008), ainsi chaque molécule de MBNL1 peut reconnaître quatre motifs UGC. Ces motifs sont retrouvés dans les répétitions CUG ou CCUG des patients DM, et dans les ARNs pré-messagers dont l'épissage alternatif est régulé par MBNL1 (Ho *et al.*, 2004 ; Yuan *et al.*, 2007 ; Warf *et al.*, 2009a ; Goers *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2012). En conséquence, chez les patients DM, la séquestration de MBNL1 dans les agrégats de répétitions CUG ou CCUG conduit à une diminution de la concentration de protéine MBNL1 libre, conduisant à des altérations de l'épissage alternatif des transcrits régulés par MBNL1 (Ho *et al.*, 2004 ; Lin *et al.*, 2006 ; Warf and Berglund, 2007 ; Yuan *et al.*, 2007 ; Kino *et al.*, 2009 ; Fugier *et al.*, 2011). Enfin, plus de 80% des altérations d'épissage sont communes entre le modèle murin HSA^{LR} exprimant 200 répétitions CUG, et le modèle *Mbnl1*^{-/-} confirmant ainsi le rôle de la perte de fonction de MBNL1 dans la maladie (Du *et al.*, 2010).

Toutefois, des données récentes ont remis en question l'importance de MBNL1. En effet, le séquençage à haut débit d'ARN provenant de cerveau, de cœur et de muscle de souris *Mbnl1*^{-/-} montre que si plus d'une centaine d'évènements d'épissage alternatif sont altérés dans le muscle squelettique, très peu d'épissages sont altérés dans le cœur et le cerveau de ces souris (Wang *et al.*, 2012). Ces résultats ont été confirmés par une étude qui montre que les altérations d'épissage sont plus faibles dans le cerveau des souris *Mbnl1*^{-/-} que dans le cerveau de patients DM1, suggérant ainsi que d'autres facteurs pourraient réguler ces épissages

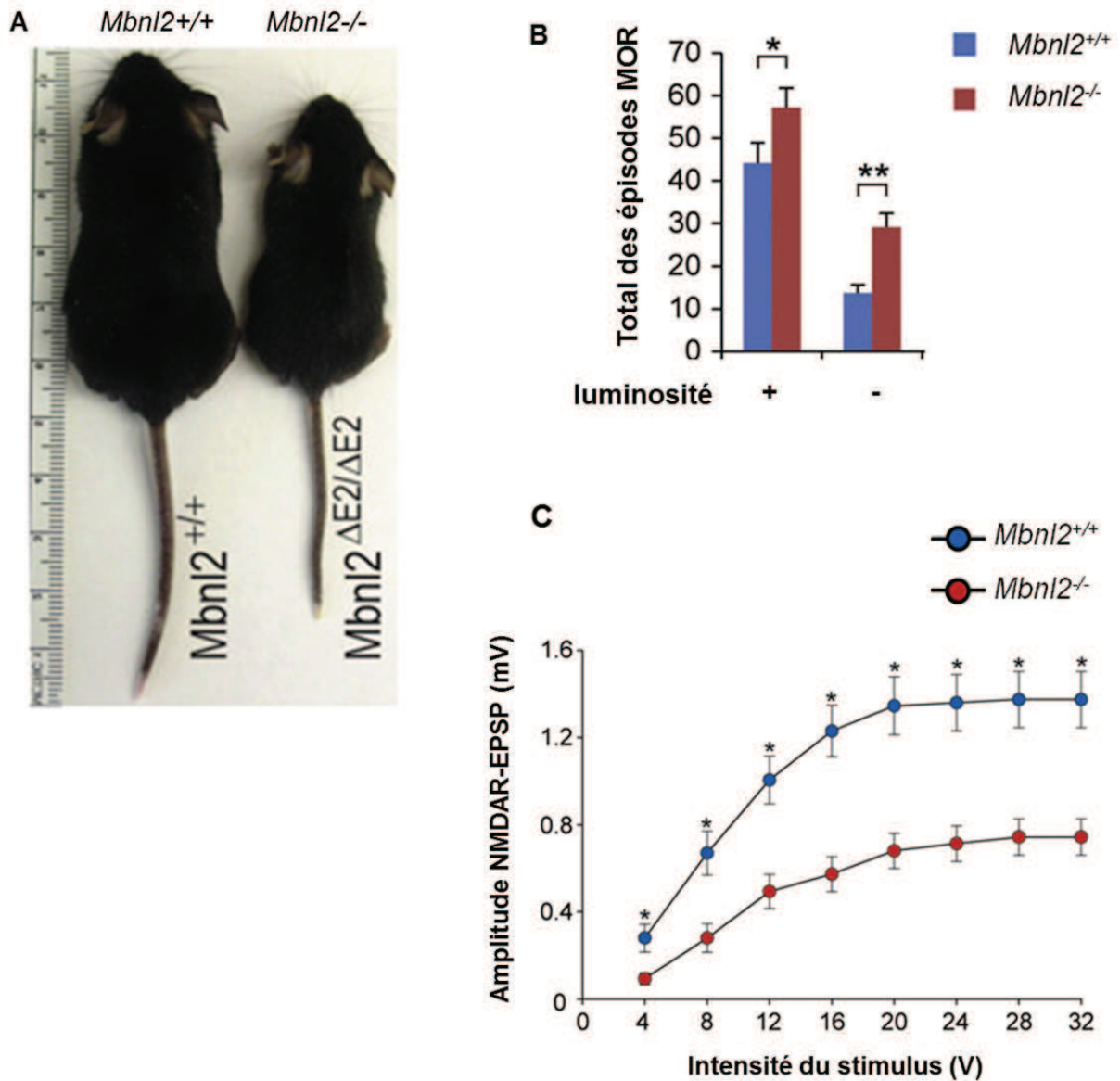


Figure 11: L'inactivation de *Mbnl2* chez la souris reproduit certains symptômes neurologiques des patients DMI.

(Charizanis et al., 2012).

A. Comparaison de la taille des souris. Les souris *Mbnl2*^{-/-} sont plus petites que les souris *Mbnl2*^{+/+}.

B. Analyse des troubles du sommeil. Le nombre de mouvements oculaires rapides (MOR) est plus important chez les souris *Mbnl2*^{-/-} que chez les souris *Mbnl2*^{+/+}.

C. Mesure de l'amplitude de potentiel post-synaptique excitateur (EPSP) dans les souris *Mbnl2*^{+/+} et les souris *Mbnl2*^{-/-}.

alternatifs (Suenaga *et al.*, 2012). Ces résultats sont à mettre en perspective avec la faible expression de MBNL1 dans le cerveau comparée à l'expression de son paralogue MBNL2. Ainsi, des souris invalidées pour le gène *Mbnl2* (*Mbnl2*^{-/-}) développent des altérations spécifiques de l'épissage de plus d'une centaine d'exons conduisant à une diminution de la transmission synaptique médiée par le récepteur NMDAR et à des altérations du système nerveux central tels que l'hypersomnie, les mouvements oculaires rapides (REM) et des déficits de la mémoire spatiale (figure 11) s'apparentant aux symptômes neuronaux des dystrophies myotoniques (Charizanis *et al.*, 2012).

Concernant le troisième membre de la famille MBNL, MBNL3, son expression est détectable chez l'embryon et dans les cellules satellites du muscle mais diminue au cours de la différenciation. Une première étude de la fonction de MBNL3 montre que sa surexpression entraîne l'activation de la différenciation de cellules C2C12 (Lee *et al.*, 2010). Plus récemment, l'équipe du Dr Swanson a montré que la déplétion de *Mbnl3* dans des myoblastes de souris (C2C12) entraîne un retard de leur différenciation (Poulos *et al.*, 2013). De même, des souris invalidées pour l'exon 2 de *Mbnl3* présentent une diminution de la capacité de régénération du muscle suite à une blessure (Poulos *et al.*, 2013). Ces études suggèrent que MBNL3 serait impliqué dans la différenciation des cellules satellites musculaires et pourrait donc être impliqué dans le retard de développement observé chez les nouveaux nés CDM. Toutefois, il est à noter que la perte de l'exon 2 de *Mbnl3* ne conduit pas à une perte totale de l'expression de ce gène et ne permet donc pas de conclure définitivement sur la fonction de MBNL3.

L'ensemble de ces études suggère donc pour les dystrophies myotoniques, un mécanisme dans lequel les expansions de répétitions CUG ou CCUG séquestrent les différents membres de la famille MBNL, principalement MBNL1 dans le muscle squelettique, MBNL2 dans le cerveau et peut être MBNL3 dans l'embryon, conduisant ainsi à des altérations spécifiques de l'épissage alternatif. Je vais décrire dans la partie suivante les conséquences cellulaires et/ou physiologiques de ces altérations de l'épissage.

2.2.5. Les altérations de l'épissage alternatif

En 1996, l'équipe du Professeur Delacourte a identifié la présence de différents variants de la protéine TAU dans le cerveau de patients DM, suggérant alors que des défauts d'épissage alternatif pouvaient être à l'origine des symptômes des patients DM (Vermersch *et al.*, 1996). Ces résultats ont été confirmés en 1998 par l'équipe de Thomas Cooper, qui a mis

Organe	Pré-ARNm	Dérégulation exon/intron	Inclusion/ exclusion	Références	
Cœur	Troponine T cardiaque (TNNT2/cTNT)	exon 5	inclusion	<i>Philipps et al., 1998</i>	
Muscle	Récepteur à l'insuline (INSR)	exon 11	exclusion	<i>Savkur et al., 2001</i>	
	Canal chlore (CLCN1)	intron 2	inclusion	<i>Charlet et al., 2002 & Mankodi et al., 2002</i>	
		exon 7	inclusion		
	Troponine T squelettique (TNNT3)	exon foetal	inclusion	<i>Kanadia et al., 2003</i>	
	Amphiphisine 2 (BIN1)	exon 11	exclusion	<i>Fugier et al., 2011</i>	
	Récepteur à la Ryanodine (RyR)	exon 70	exclusion	<i>Kimura et al., 2005</i>	
	Ca ²⁺ ATPase du réticulum endoplasmique/ sarcoplasmique 1 (SERCA1)	exon 22	exclusion		
	Ca ²⁺ ATPase du réticulum endoplasmique/ sarcoplasmique 2 (SERCA2)	intron 19	inclusion		
	LIM domain binding 3 (LDB3/ZASP/Cypher)	exon 11	inclusion		
	Titine (TTN)	Titine (TTN)	Zr4	inclusion	<i>Lin et al., 2006</i>
			Zr5	inclusion	
		Protéine d'ancrage affiliée à la nébuline (NRAP)	exon 12	inclusion	
		Calpaïne 3 (CAPN3)	exon 16	exclusion	
		Attractine-like 1 (ATRNL1,ALP)	exons 5a et 5b	inclusion	
		Protéine 1 contenant un domaine FH1/FH2 (FHOD1)	exon 11a	exclusion	
		Glutamine-fructose 6-phosphate transaminase 1 (GFPT1)	exon 10	exclusion	
		MBNL1	exon 7	inclusion	
		MBNL2	exon 7	inclusion	
		Facteur nucléaire 1	exon 123	inclusion	
		Histone-lysine N-méthyltransférase (SMYD1)	exon 39	inclusion	
exon 39			inclusion		
Protéine associée antigène 9	Protéine affiliée à la myotubularine1 (MTMR1)	exon 2.1	exclusion	<i>Buj-Bello et al., 2002 & Ho et al., 2005</i>	
		exon 2.3	exclusion		
Alpha-dystrobrevine (DTNA)	Alpha-dystrobrevine (DTNA)	exon 11a	inclusion	<i>Nakamori et al., 2008</i>	
		exon 12	inclusion		
Canal à Ca ²⁺ de type L Cav1.1 (CACNA1S/ DHP α S1)	exon 29	exclusion	<i>Tang et al., 2012</i>		
Chaîne lourde de la myosine non musculaire (MYH14)	exon 6	exclusion	<i>Rinaldi et al., 2011</i>		
Cerveau	Tau (MAPT)	exon 2	exclusion	<i>Sergeant et al., 2001</i>	
		exon 3	exclusion		
		exon 6 (6c/6d)	exclusion/inclusion		
	exon 10	exclusion	<i>Leroy et al., 2006</i>		
	Récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDAR1)	exon 5	inclusion	<i>Sergeant et al., 2001 & Jiang et al., 2004</i>	
	Protéine précurseur de l'amyloïde (APP)	exon 7	exclusion	<i>Jiang et al., 2004</i>	
	MBNL1	exon 5	inclusion	<i>Dhaenens et al., 2008</i>	
		exon 7	inclusion		
	TANC2	TANC2 CACNA1D CSNK1D KCNMA1 CLASP2 RZR2 ADD1 PPP1R12A ST3GAL3 LIMCH1	exon 22a	inclusion	<i>Charizanis et al., 2012</i>
			exon 12	exclusion	
exon 9			exclusion		
exon 25a			exclusion		
exons 23a 23b			inclusion		
exons 4; 5			exclusion		
exon 15			inclusion		
exon 16			inclusion		
exon 3			inclusion		
exon 10			exclusion		

Tableau 3 : Altérations de l'épissage alternatif mises en évidence chez les patients DM.

en évidence des altérations spécifiques de l'épissage alternatif de la troponine T cardiaque (*cTNT*, *TNNT2*) dans des échantillons de cœur de patients DM (Philips *et al.*, 1998). Suite à la découverte de la surexpression de CUGBP1 et à la séquestration de MBNL1, ces altérations sont apparues alors comme spécifiques, voire à l'origine, des symptômes des DM.

MBNL1 et CUGBP1 régulent l'épissage de transcrits soit indépendamment l'un de l'autre, soit de façon conjointe et antagoniste. Lors du développement cardiaque, l'expression de CUGBP1 diminue, tandis que celle de MBNL1 augmente (Lin *et al.*, 2006 ; Kalsotra *et al.*, 2008). Ainsi, la balance d'expression entre CUGBP1 et MBNL1 régule la transition des formes d'épissage fœtales aux formes adultes pour plusieurs régions d'ARNs pré-messagers telles que l'exon 11 de *INSR* ou l'exon 5 de *TNNT2* (*cTNT*). De plus, le profil d'épissage alternatif des patients DM semble mimer un retour à un épissage de type fœtal, ce qui est cohérent avec une séquestration et donc une diminution de MBNL1 libre chez ces patients.

Pour la suite de ce chapitre, j'ai choisi de présenter les différents défauts d'épissage alternatif selon les symptômes auxquels ils pourraient être associés.

- Les troubles neurologiques

Le cerveau des patients DM1 présente des agrégats de protéine TAU (*MAPT*) qui pourraient être associés à une exclusion des exons alternatifs 2 et 3 de son ARNm (Vermesch *et al.*, 1996 ; Sergeant *et al.*, 2001) (tableau 3). Ces altérations d'épissage sont retrouvées dans le cerveau de souris *Mbnl1*^{-/-} (Suenaga *et al.*, 2012), et MBNL1 régule directement l'inclusion des exons 2 et 3 de *MAPT* (Dhaenens *et al.*, 2008). Toutefois, la fonction des exons 2 et 3 de *MAPT* et leur rôle dans l'agrégation des protéines TAU dans le cerveau des patients DM sont encore mal connus. Il est à noter que les épissages des exons 6 et 10 sont aussi décrits comme altérés dans le cerveau des patients DM (Sergeant *et al.*, 2001 ; Leroy *et al.*, 2006b ; Dhaenens *et al.*, 2011). D'autre part, les épissages alternatifs de l'exon 4 de *Grin1* et de l'exon 7 de *APP* sont altérés dans le cerveau de patients DM1 et dans le cerveau de souris *Mbnl1*^{-/-}, suggérant ainsi que MBNL1 joue un rôle dans la régulation de ces épissages (Jiang *et al.*, 2004 ; Suenaga *et al.*, 2012). Cependant, le cerveau de patients DM1 présente des altérations d'épissage alternatif qui sont absentes du cerveau de souris *Mbnl1*^{-/-} suggérant qu'un autre facteur, notamment MBNL2, serait impliqué dans la neuropathologie des patients DM. En effet, l'épissage alternatif de l'exon 22 de *TANC2*, de l'exon 25a de *KCNMA1*, de l'exon 9 de *CSNK1D*, de l'exon 12 de *CACNA1D* et de l'exon 4/5 de *RYR2*, est altéré dans le cerveau de patients DM1 et dans le cerveau de souris *Mbnl2*^{-/-}, suggérant un rôle crucial de la séquestration de MBNL2 dans le cerveau des patients DM (Charizanis *et al.*, 2012). De plus,

des expériences de HIT-CLIP sur Mbnl2 montrent que 50% des cibles de Mbnl2 sont des régions 3'UTR d'ARNm, suggérant que MBNL2 pourrait aussi réguler la stabilité, la localisation ou la traduction d'ARNm spécifiques (Licatalosi *et al.*, 2008 ; Lloran *et al.*, 2010).

Plus récemment, l'étude du cerveau des souris transgéniques exprimant des longues expansions CTG (CTG>1000) dans le contexte du gène *DMPK* humain (DMXL5) a montré une dérégulation des protéines synaptiques et des dysfonctionnements synaptiques chez ces souris, se traduisant par des troubles comportementaux et des symptômes neurologiques semblables à ceux des patients DM1 (Hernandez-Hernandez *et al.*, 2013). En effet, ces souris transgéniques présentent une augmentation du niveau protéique d'une protéine G impliquée dans le trafic des vésicules, Rab3A, et une hyperphosphorylation de la synapsine I, une protéine impliquée dans l'ancrage des vésicules d'endocytose au cytosquelette. Rab3a et la synapsine I sont toutes deux impliquées dans la plasticité synaptique à court-terme et la libération de neurotransmetteurs (Rosahl *et al.*, 1993 ; D'Adamo *et al.*, 2004). Ces dérégulations sont retrouvées spécifiquement dans le cerveau des souris *Mbnl1*^{-/-} et dans le cerveau de patients DM1, suggérant ainsi une altération de la plasticité synaptique chez ces patients (Hernandez-Hernandez *et al.*, 2013).

Enfin, pour étudier les événements précoces à l'origine des symptômes neurologiques des patients DM, l'équipe du Dr Martinat a généré des motoneurones à partir de cellules souches embryonnaires (hESC : human Embryonic Stem Cell) provenant de patients DM. Ces travaux ont montré une diminution de l'expression des gènes *SLITRK2* et *SLITRK4* dans les neurones dérivés des cellules hESC DM1 (Marteyn *et al.*, 2011). *SLITRK2* et *SLITRK4* appartiennent à une famille de protéines impliquées dans la formation des neurites et des synapses, et la diminution d'expression de ces gènes conduit à une inhibition du développement des neurites chez la souris (Aruga and Mikoshiba, 2003). Ces résultats suggèrent donc que la voie des SLITRK pourrait contribuer aux symptômes neurologiques des patients CDM et DM (Marteyn *et al.*, 2011). Enfin, plus récemment, la dérégulation de la voie de signalisation mTOR, associée à une augmentation de l'autophagie et à une diminution de la prolifération, a été observée dans les motoneurones dérivés de hESC DM1. Ces résultats suggèrent l'implication de la voie mTOR, qui serait notamment régulée par MBNL1, dans la neuropathologie des patients DM1 (Denis *et al.*, 2013).

- Les troubles cardiaques

Une augmentation de l'inclusion de l'exon 5 de l'ARNm de la troponine T cardiaque (*TNNT2/cTNT*) a été observée dans le cœur de patients DM1 (Philips *et al.*, 1998). Cet exon, inclus uniquement dans le cœur fœtal, régule la sensibilité de la troponine T au calcium (Gomes *et al.*, 2004). Toutefois, cette altération ne semble pas pouvoir expliquer, à elle seule, les troubles de la conduction cardiaque des patients DM. En effet, des souris transgéniques exprimant *Tnnt2* contenant l'exon 5 (forme fœtale) au stade adulte ne reproduisent pas les altérations cardiaques des DM (Feng and Jin, 2010). L'épissage alternatif de cet exon est régulé à la fois par MBNL1 et CUGBP1. CUGBP1 se fixe en aval de l'exon 5 et stimule son inclusion alors que MBNL1 se lie en amont de l'exon et empêche la liaison d'U2AF65 sur la séquence de polypyrimidine située en aval de l'exon 5 entraînant son exclusion (Ho *et al.*, 2004 ; Warf *et al.*, 2007 ; Warf *et al.*, 2009a).

- La résistance à l'insuline

L'exon 11 de l'ARNm du récepteur à l'insuline (*INSR*) est exclu chez les patients atteints de DM1 et de DM2, reproduisant une situation de muscle fœtal (Savkur *et al.*, 2001 ; Savkur *et al.*, 2004). Cette altération entraîne une diminution de la réponse à l'insuline et pourrait contribuer à la résistance à l'insuline observée chez les patients DM (Savkur *et al.*, 2001 ; Savkur *et al.*, 2004 ; Sen *et al.*, 2009). MBNL1 et CUGBP1 régulent de façon antagoniste cet exon. Toutefois, des études de minigènes *in cellulo* montrent que la principale cause de l'altération de l'inclusion de cet exon chez les patients DM semble être liée à une perte de fonction de MBNL1 (Dansithong *et al.*, 2005 ; Sen *et al.*, 2010). Enfin, notons qu'aucune expérience de surexpression d'un récepteur *INSR* contenant l'exon 11 dans des cellules DM n'a été effectuée, laissant ainsi ouverte la possibilité que d'autres altérations soient impliquées dans la résistance à l'insuline. A ce sujet, l'inactivation de *DMPK* chez la souris conduit à une diminution de la translocation du transporteur au glucose GLUT4 induite par l'insuline et à une augmentation du glucose dans les cellules musculaires et cardiaques. Ceci entraîne une augmentation de l'insuline dans le sang s'apparentant à celle observée chez les patients DM (Llagostera *et al.*, 2007).

- La myotonie

La rétention anormale de l'intron 2 et des exons 6b et 7a dans l'ARNm du canal chlore musculaire (*CLCN1*) est à l'origine de la myotonie (Charlet *et al.*, 2002 ; Mankodi *et al.*, 2002). Ces insertions entraînent l'apparition de codons STOP prématurés dans cet ARN, conduisant à sa dégradation par le mécanisme de surveillance des ARNm (« Nonsense Mediated Decay »). L'absence de *CLCN1* provoque une myotonie par hypersensibilisation de la membrane musculaire aux potentiels d'action (Rudel *et al.*, 1989 ; Franke *et al.*, 1991 ; Iaizzo *et al.*, 1991). *CUGBP1* régule l'épissage de l'intron 2 (Charlet *et al.*, 2002), tandis que *MBNL1* régule l'inclusion de l'exon 7a (Kino *et al.*, 2009). Enfin, en 2007, l'équipe de Charles Thornton a montré que l'injection d'oligonucléotides rétablissant un épissage normal de *Clcn1* guérit la myotonie dans un modèle murin de DM, démontrant ainsi qu'une altération de l'épissage de *Clcn1* est causale de la myotonie observée dans ce modèle (Wheeler *et al.*, 2007). De plus, l'injection d'oligonucléotides antisens aux répétitions CUG dans le muscle squelettique de ces souris exprimant 250 répétitions CTG entraîne la libération de *MBNL1*, la correction des défauts d'épissage du canal chlore *Clcn1* et diminue la myotonie (Wheeler *et al.*, 2009 ; Wheeler *et al.*, 2012). De même, la surexpression de *MBNL1* dans le muscle squelettique de ces souris HSA^{LR} corrige les défauts d'épissage de *Clcn1* et diminue la myotonie (Kanadia *et al.*, 2006). Ces résultats démontrent ainsi que la séquestration de *MBNL1* par les expansions de répétitions CUG conduit à des altérations de l'épissage du canal chlore *CLCN1*, qui sont probablement la cause de la myotonie chez les patients DM.

- La faiblesse musculaire

L'exclusion anormale de l'exon 11 dans l'ARNm de l'Amphiphysine 2 (*BINI*) serait associée à la faiblesse musculaire. En effet, cet exon code pour un motif de liaison aux phosphoinositides (PtdIns3P et PtdIns5P) et son absence provoque des défauts de tubulation des membranes musculaires et une faiblesse musculaire dans un modèle murin (Fugier *et al.*, 2011). Il est à noter que des défauts similaires des tubules T sont observés dans des biopsies de muscles squelettiques de patients DM (Lee *et al.*, 2002a). De plus, des mutations du gène *BINI* sont responsables de dystrophies centronucléaires (CNM) (Nicot *et al.*, 2007), dont les caractéristiques histopathologiques sont proches de celles des patients CDM (Jungbluth *et al.*, 2008). Une étude récente renforce l'importance de l'épissage de *BINI* dans la faiblesse musculaire des patients DM. En effet une mutation du site 3' accepteur de l'exon 11 conduit à une perte d'inclusion de cet exon 11, ce qui provoque une myopathie centronucléaire (Böhm *et al.*, 2013). L'inclusion de l'exon 11 de *BINI* est régulée par *MBNL1*, et non par la

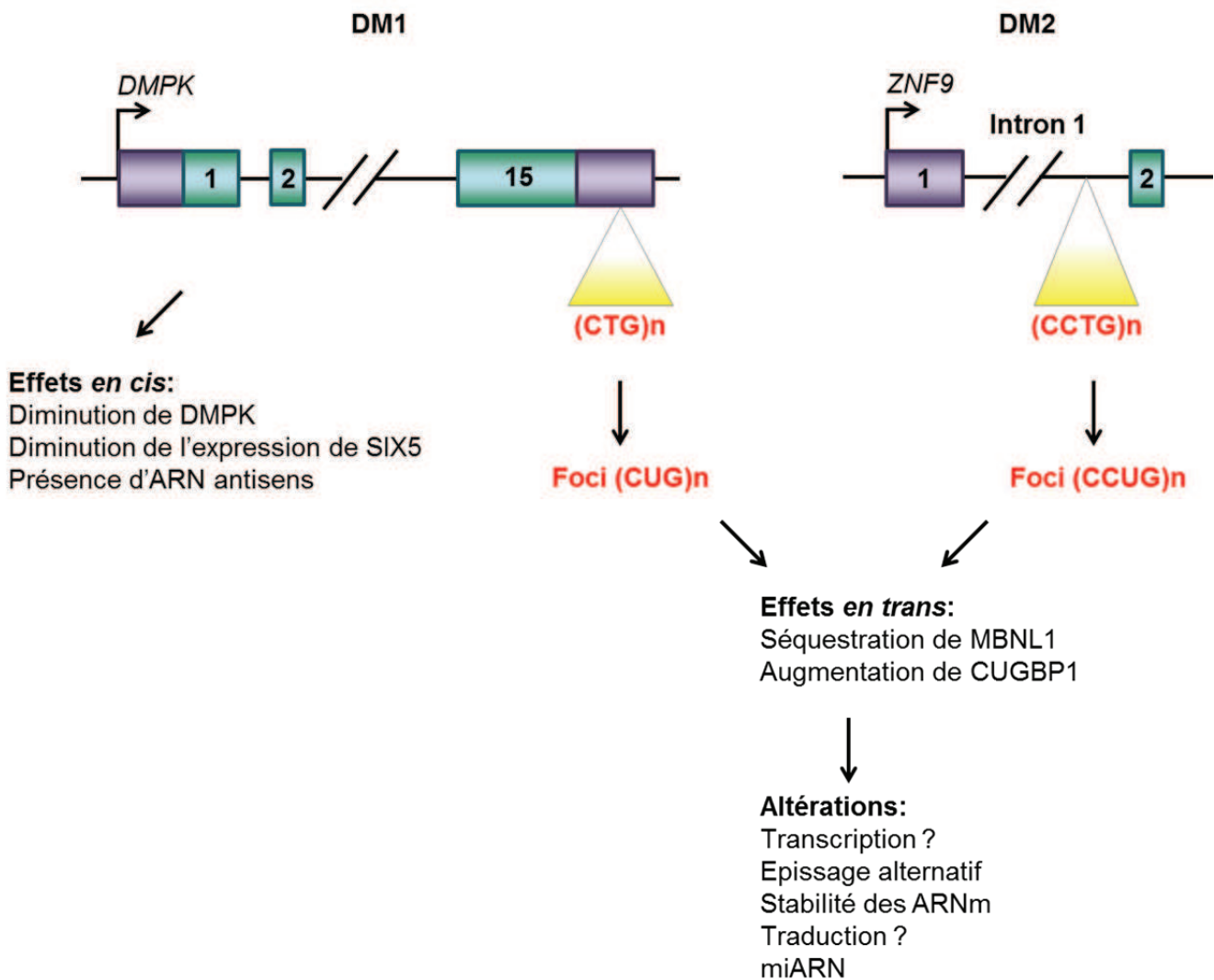


Figure 12 : Représentation des mécanismes moléculaires possibles impliqués dans les dystrophies myotoniques.

CUGBP1, suggérant ainsi que la séquestration de MBNL1 serait suffisante pour induire l'exclusion de cet exon chez les patients DM (Fugier *et al.*, 2011). Enfin, d'autres ARNm impliqués dans l'homéostasie calcique et le couplage excitation-contraction tels que *RYR1*, *DHPR (CACNA1S)*, *ATP2A1* et *ATP2A2 (SERCA1 et 2)* montrent des altérations d'épissage spécifiques qui pourraient participer à la faiblesse musculaire observée chez les patients DM (Kimura *et al.*, 2005 ; Tang *et al.*, 2012).

2.2.6. Autres mécanismes

- La dérégulation de la protéine CUGBP2

Bien que l'inactivation des gènes *Mbnl1* et/ou *Mbnl2* chez la souris conduit aux symptômes des DM, il n'est pas exclu que d'autres protéines soient aussi impliquées dans cette pathologie. Ainsi, l'expression de CUGBP2 (ETR3), un paralogue de CUGBP1, pourrait être altérée chez les patients DM (Goo and Cooper, 2009 ; Du *et al.*, 2010). Le mécanisme impliqué pourrait être, comme pour CUGBP1, une phosphorylation conduisant à une stabilisation de la protéine CUGBP2, mais ce mécanisme reste à démontrer.

- Les dérégulations transcriptionnelles

Des travaux effectués en 2004 ont proposé que des facteurs de transcription tels que SP1, STAT1 et STAT3 pourraient être séquestrés par les longues répétitions CUG, entraînant alors des altérations de la transcription, notamment du gène *CLCNI* (Ebraliidze *et al.*, 2004). Cependant, ces résultats ne sont pas supportés par les travaux de l'équipe de Charles Thornton qui n'a retrouvé aucune colocalisation de ces facteurs de transcription dans les agrégats d'ARN CUG (Jiang *et al.*, 2004).

Des altérations de l'expression de plusieurs gènes ont été observées dans des échantillons de muscle de patients DM (Botta *et al.*, 2007). De plus, l'analyse de l'expression des gènes dans le muscle squelettique de souris *Mbnl1*^{-/-} et de souris exprimant 250 répétitions CUG (HSA^{LR}) a montré une dérégulation d'un grand nombre de transcrits impliqués dans l'homéostasie et la signalisation du calcium (Osborne *et al.*, 2009 ; Du *et al.*, 2010). Toutefois, aucun motif consensus de facteur de transcription n'a été mis en évidence parmi ces gènes dérégulés, et le mécanisme conduisant à des altérations transcriptionnelles n'est toujours pas clair (figure 12) (Dansithong *et al.*, 2011). De plus, des études récentes montrent que MBNL1 pourrait réguler spécifiquement la stabilité des ARNm, suggérant ainsi que l'altération de l'expression de certains gènes ne serait pas liée à une altération de leur

transcription, mais liée à une altération de la stabilité de leurs ARNm (Masuda *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2012).

- Les dérégulations traductionnelles

Chez les patients DM, la stabilité augmentée de CUGBP1 conduit à des anomalies de la traduction (Timchenko and Caskey, 1999 ; Timchenko *et al.*, 2001 ; Timchenko *et al.*, 2002 ; Timchenko *et al.*, 2004 ; Timchenko *et al.*, 2005). Ainsi, une augmentation de l'expression de MEF2A (« Myocyte Enhancer Factor 2A ») et de p21, deux facteurs importants pour la régulation du cycle cellulaire et de la myogenèse, a été mise en évidence dans des cellules de patients DM1. Ces dérégulations contribueraient au défaut de différenciation des cellules musculaires DM1 (Iakova *et al.*, 2004 ; Timchenko *et al.*, 2004). Plus récemment, des études ont proposé que les répétitions CUG peuvent inhiber la traduction dans des cellules musculaires de patients DM1 et DM2, mais les mécanismes moléculaires ne sont pas clairs (Huichalaf *et al.*, 2009 ; Salisbury *et al.*, 2009 ; Huichalaf *et al.*, 2010).

- L'expression d'un ARN antisens

Il existe un ARN antisens aux répétitions CUG (Cho *et al.*, 2005 ; Huguet *et al.*, 2012). Cet ARN est détecté dans le cœur de souris DMSXL exprimant plus de 1000 répétitions CTG, ainsi que dans le cœur, les muscles squelettiques et les reins de patients DM1. Cependant, l'expression de cet ARN antisens est 2,5 à 100 fois plus faible que l'expression de *DMPK* (Huguet *et al.*, 2012). Cette transcription bidirectionnelle (CTG)*(CAG) aggraverait l'instabilité des répétitions, que ce soit dans le sens de l'expansion ou d'une contraction (Nakamori *et al.*, 2011). De plus, cet ARN antisens, contenant donc des expansions de répétitions CAG et bien que dépourvu de codon d'initiation de la traduction, donnerait naissance à de rares agrégats de polyglutamines chez les patients DM1 (Zu *et al.*, 2011). Ces résultats suggèrent que le gain de fonction d'ARN des répétitions CUG pourrait être associé à un gain de fonction protéique, ce qui augmenterait encore la complexité des mécanismes moléculaires à l'origine des DM.

- L'expression de petits ARNs CUG

Une étude a proposé que les répétitions CUG, structurées en épingle à cheveux, puissent être clivées par DICER en de petits ARNs CUG se comportant comme des ARNs interférents et régulant négativement l'expression de différents transcrits (Krol *et al.*, 2007). Toutefois, les répétitions CUG ne sont pas exportées dans le cytoplasme, lieu de localisation

cellulaire de DICER. Enfin, ces petits ARNs CUG n'ont pas été identifiés dans des modèles cellulaires de la DM (Denis Furling, communication personnelle).

2.3. Les stratégies thérapeutiques

Certains symptômes de la DM, tels que la myotonie, les troubles de la conduction cardiaque, la somnolence ou la cataracte peuvent être améliorés par des traitements, des appareillages ou des opérations spécifiques ; mais aucun traitement curatif n'existe. Cependant, la meilleure compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine des DM a permis de développer des stratégies thérapeutiques basées soit sur la dégradation des répétitions CUG ou CCUG, soit sur l'inhibition de la liaison de MBNL à ces répétitions.

Ainsi, plusieurs études ont montré que diminuer l'expression des répétitions CTG entraîne une diminution des symptômes des DM dans des modèles murins ou cellulaires de ces maladies (Mahadevan *et al.*, 2006 ; Yadava *et al.*, 2008 ; Mulders *et al.*, 2009 ; Wheeler *et al.*, 2009 ; François *et al.*, 2011 ; Wheeler *et al.*, 2012).

2.3.1. Cibler les transcrits contenant l'expansion de répétitions CUG

Afin de cibler l'ARN pathogène, plusieurs approches thérapeutiques se sont basées sur la complémentarité entre des acides nucléiques modifiés et l'ARN *DMPK* contenant les répétitions CTG. Les approches suivantes peuvent être citées :

- Réparer l'ARN muté par substitution de l'expansion par un nombre plus réduit de répétitions par trans-épissage (Chen *et al.*, 2009).
- Dégrader les transcrits *DMPK* sans tenir compte du nombre de répétitions. Cette approche entraîne malheureusement la perte de la protéine *DMPK*. Il est à noter que seul un léger phénotype est observé chez les souris invalidées pour le gène *Dmpk* (Berul *et al.*, 1999 ; Saba *et al.*, 1999 ; Berul *et al.*, 2000), suggérant ainsi que cette stratégie serait envisageable (Furling *et al.*, 2003 ; Langlois *et al.*, 2003 ; Krol *et al.*, 2007).
- Faciliter l'export des transcrits *DMPK* muté dans le cytoplasme. Cette stratégie utilise une séquence d'export virale de type WPRE (« Woodchick Post-transcriptional Regulator Element ») incluse dans un transcrit contenant les répétitions CUG (Mastroiannopoulos *et al.*, 2005). L'export de ces répétitions ne semble pas avoir d'effet pathogène (Dansithong *et al.*, 2008). Cependant, il reste à déterminer comment insérer cette séquence WPRE dans le locus *DMPK* chez les patients DM.

Stratégies	Modèles d'études	Résultats	Références
ARN antisens (CUG)13	Myoblastes de patients DM1 infectés par rétrovirus	Diminution de 80% de l'ARN <i>DMPK</i> muté Diminution de 50% de l'ARN <i>DMPK</i> normal	<i>Furling et al., 2003</i>
"hammerhead" ribozymes	Myoblastes de patients DM1	Diminution de 63% de l'ARN <i>DMPK</i> muté Diminution de 50% de l'ARN <i>DMPK</i> normal	<i>Langlois et al., 2003</i>
siARN (CAG)7	Fibroblastes de patients DM1	Diminution de l'ARN <i>DMPK</i> muté Peu de diminution de l'ARN <i>DMPK</i> normal	<i>Krol et al., 2007</i>
oligonucléotides antisens (AON) (CAG)7	Myoblastes et myotubes de patients DM1 modèles murins DM500 et HSA ^{LR}	100% de diminution de l'ARN <i>DMPK</i> muté Diminution des foci nucléaires Correction des défauts d'épissages	<i>Mulder et al., 2009a et 2009b</i>
hsnARN U7 (CAG)15	Myoblastes de patients DM1	Diminution de 80% de l'ARN <i>DMPK</i> muté Diminution du nombre de cellules ayant des foci nucléaires Correction des défauts des épissages	<i>François et al., 2011</i>
MOE (20 nucléotides) ciblant la séquence codante et la région 3'UTR de hACTA1 flanquant les répétitions CUG	Injection sous-cutanée des souris HSA ^{LR}	Diminution des foci nucléaires Libération de MBNL1 Correction des épissages Correction de la myotonie	<i>Wheeler et al., 2012</i>
MOE/PS (CAG)14 & 16	Injection intramusculaire de souris EpA960/HSA-Cre	Diminution de 50% de l'ARN <i>DMPK</i> muté Diminution de 40% du nombre de foci/noyau Faible correction des défauts épissages	<i>Lee et al., 2012</i>
2'O méthyl (CAG)7	Myoblastes de patients DM1 Myotubes de souris DM500	Diminution de 65-95% de l'ARN <i>DMPK</i> muté Diminution de 80% de l'ARN <i>hDMPK</i> muté	<i>Gonzalez-Barriga et al., 2013</i>
siARN (CAG)4 & (CAG)5	Injection intramusculaire suivie d'électroporation des souris HSA ^{LR}	Diminution de 70-80% de l'ARN muté Diminution des foci nucléaires Correction des épissages dépendant de MBNL1 Correction de la myotonie	<i>Sobczak et al., 2013</i>

Tableau 4 : Stratégies ciblant l'ARN contenant les longues répétitions CUG.

AON: Oligonucléotide antisens; MOE : 2'-O-méthoxyéthyle, PS : phosphorothioate ; LNA: Locked Nucleic Acid; hACTA1: transgène de l'actine humaine comportant 250 répétitions CTG dans la région 3'UTR, chez la souris HSA^{LR}.

- Eliminer sélectivement les ARNs contenant les expansions de répétitions CUG ou CCUG et conservant l'expression de l'allèle de *DMPK* contenant un nombre normal de répétitions CTG. Plusieurs stratégies ont été développées (tableau 4) :

- Ainsi, l'équipe du Dr Furling a développé un ARN complémentaire aux répétitions CUG inséré dans un snARN U7 artificiel. L'expression de cet ARN hU7-(CAG)_{15x} dans des cultures primaires de cellules musculaires de patients DM1 conduit à la dégradation de l'allèle *DMPK* contenant les longues répétitions CUG, et ceci sans modifier l'expression de l'allèle non muté (François *et al.*, 2011).

- De même, l'équipe de Rick Wansink a montré qu'un oligonucléotide (CAG)_{7X} modifié par des groupements 2'-O-méthyl-phosphorathioate diminue de 50% les transcrits *DMPK* mutés dans des modèles cellulaires de la DM1. De plus, l'injection de cet oligonucléotide dans le muscle de souris HSA^{LR} diminue la quantité de transcrits mutés et améliore l'épissage, prouvant le potentiel thérapeutique de cette approche (Mulders *et al.*, 2009). Cependant, les mécanismes moléculaires entraînant la diminution du transcrit muté restent encore mal compris.

- Toujours en 2009, l'équipe de Charles Thornton a mis au point un oligonucléotide CAG₂₅ de type morpholino qui inhibe la fixation de MBNL1 aux agrégats d'ARN CUG dans le modèle murin HSA^{LR} (Wheeler *et al.*, 2009). Toutefois, l'incorporation de cette molécule nécessite une injection intramusculaire suivie d'une électroporation *in vivo* du muscle de souris. C'est pourquoi, de nombreuses équipes travaillent sur des modifications chimiques de ces oligonucléotides pour obtenir une meilleure pénétration tissulaire.

- Ainsi, en 2012, l'équipe de Charles Thornton a généré des oligonucléotides antisens dirigés contre les régions codantes et 3'UTR du gène hACTA1 (des souris HSA^{LR}) flanquant les répétitions CUG. Ces oligonucléotides antisens sont modifiés par des groupements 2'-O-méthoxyéthyle à ses extrémités, mais conservant une partie centrale non modifiée. Ce type d'oligonucléotide (gapmère) permet une dégradation des ARN cibles par la RNase H. Cet oligonucléotide, injecté par voie sous-cutanée, dégrade l'ARN muté contenant les longues répétitions CUG, rétablit un épissage normal et guérit la myotonie dans un modèle murin (HSA^{LR}) de la DM1 (Wheeler *et al.*, 2012).

- De même, l'équipe de Thomas Cooper a utilisé des oligonucléotides antisens CAG contenant à la fois des modifications phosphorothioates et LNA (« Locked Nucleic Acid ») ou 2'-O-méthoxyéthyle qui induisent une dégradation de l'ARN toxique de façon RNase H dépendante dans des modèles souris (EpA960/HSA-Cre) (Lee *et al.*, 2012).

Stratégies	Modèles d'études	Résultats	Références
Morpholino CAG25	Injection intramusculaire suivie d'électroporation des souris HSA ^{LR}	Diminution des foci nucléaires Libération de MBNL1 Correction des épissages Correction de la myotonie	<i>Wheeler et al., 2009</i>
Pentamidine	Cellules HeLa et souris HSA ^{LR}	Diminution des foci Diminution de la liaison de MBNL1 Correction partielle des épissages	<i>Warf et al., 2009</i>
Molécules dérivés de kanamycine, néamines liés par des liaisons peptidiques	Myoblastes C2C12 et souris HSA ^{LR}	Diminution de la liaison de MBNL1/(C)CUG	<i>Lee et al., 2009a et 2009b</i> <i>Pushechnikov et al., 2009</i> <i>Gareiss et al., 2008</i> <i>Childs-Disney et al., 2012</i> <i>Haghighat Jahromi et al., 2013</i>
D amino-acide hexapeptide	Drosophile et souris HSA ^{LR}	Diminution des foci nucléaires Libération de MBNL1 Correction des épissages	<i>García-López et al., 2011</i>

Tableau 5 : Stratégies visant à libérer MBNL1 des expansions CUG.

- Enfin, d'autres oligonucléotides antisens du transcrit *DMPK* et portant différentes modifications chimiques (PS et 2'-O-méthyl ou morpholino phosphorodiamidate) ont été testés et diminuent la quantité d'ARNm *DMPK* muté indépendamment de l'action de la RNase H dans des cellules DM1 en culture (Gonzalez-Barriga *et al.*, 2013).

2.3.2. Stabiliser l'expansion de CTG par un oligonucléotide antisens CAG

L'instabilité des répétitions CTG dans le gène *DMPK* des patients atteints de DM1 est un évènement caractéristique dont les mécanismes moléculaires sont encore mal connus. Plusieurs études proposent que l'instabilité de ces répétitions pourrait être liée à la transcription bidirectionnelle et à la formation de « R loop » (Lin *et al.*, 2010 ; Nakamori *et al.*, 2011 ; Reddy *et al.*, 2011). Afin de stabiliser ces expansions et ainsi éviter l'aggravation de la maladie, Nakamori et ses collaborateurs ont utilisé un oligonucléotide antisens (CAG)_{6x} modifié par des phosphorothioates et LNA (« Locked Nucleic Acid ») augmentant la spécificité de l'hybridation pour les répétitions CTG et la résistance aux nucléases. La transfection et l'injection intramusculaire suivi d'électroporation *in vivo* de ces molécules supprime l'instabilité des répétitions CTG dans des cellules humaines et un modèle murin de DM (DMSXL) (Nakamori *et al.*, 2011).

2.3.3. Rétablir la concentration normale des protéines MBNL1 et CUGBP1

Une approche thérapeutique pourrait consister à libérer MBNL1 des longues répétitions CUG/CCUG afin de rendre MBNL1 à nouveau disponible dans la cellule (tableau 5). Cette approche a été validée en 2006 par la surexpression de MBNL1, *via* des virus de type AAV, dans des muscles de souris exprimant 250 répétitions CUG (HSA^{LR}). Cette surexpression de MBNL1 rétablit un épissage alternatif normal et diminue la myotonie, démontrant ainsi que MBNL1 constitue une « cible » thérapeutique (Kanadia *et al.*, 2006). Puis, en 2009, par un criblage de petites molécules, l'équipe de Andrew Berglund a montré que la pentamidine est capable de libérer et empêcher la liaison de MBNL1 aux répétitions CUG dans des cellules en culture et dans un modèle murin mimant la DM (HSA^{LR}) (Gareiss *et al.*, 2008 ; Warf *et al.*, 2009b). De même, l'étude structurale et biochimique de l'interaction entre MBNL1 et les répétitions CUG/CCUG a permis de mettre au point des molécules liant spécifiquement les répétitions CUG et CCUG. En effet, des molécules constituées d'un squelette peptidique qui affiche de multiples copies de bis-benzimidazole montrent une forte

affinité pour les répétitions CUG et diminuent les défauts associés à la DM1 dans des modèles de culture cellulaire (Lee *et al.*, 2009a). De même, un hexapeptide de type D-amino acide diminue la séquestration de MBNL1 et rétablit un phénotype normal dans des modèles drosophile de la DM1 (García-López *et al.*, 2011). Depuis, plusieurs molécules qui diminuent la liaison de MBNL1 aux répétitions CUG et rétablissent un épissage normal en culture cellulaire ont été identifiées (Gareiss *et al.*, 2008 ; Lee *et al.*, 2009b ; Pushechnikov *et al.*, 2009 ; Childs-Disney *et al.*, 2012a ; Childs-Disney *et al.*, 2012b ; Childs-Disney *et al.*, 2013 ; Haghghat *et al.*, 2013). Ces molécules sont particulièrement prometteuses mais leur toxicité, leur disponibilité, leur spécificité et leur efficacité dans des modèles animaux de la DM restent à définir.

On peut aussi citer plusieurs études ne visant pas spécifiquement MBNL1, mais recherchant des molécules qui peuvent rétablir un épissage normal dans des modèles cellulaires ou murins de la DM (O'Leary *et al.*, 2010 ; Oana *et al.*, 2013). Toutefois, ces approches ne visent qu'un nombre limité d'épissages alternatifs selon des mécanismes encore mal identifiés.

Enfin, la protéine CUGBP1 étant augmentée et hyperphosphorylée par la PKC dans des modèles de la DM, une étude a montré que l'inhibition de la PKC dans un modèle murin (EpA960/MCM-Cre) de la DM1 améliore le phénotype cardiaque de ces souris (Wang *et al.*, 2009).

CHAPITRE II :

La maturation des miARNs et des ARNs messagers

1. Les miARNs : petits par leur taille, grands par leurs fonctions

C'est en 1993 que l'équipe de Victor Ambros a identifié chez *C.elegans* un petit ARN non codant, *lin-4*, qui a conduit à la découverte d'une nouvelle famille d'ARNs, les micro-ARNs (miARNs). Ces ARNs sont capables d'inhiber l'expression d'un gène de manière post-transcriptionnelle en se fixant à leurs ARNm cibles. Ainsi, *lin-4* régule l'expression et la stabilité de l'ARNm *lin-14* en se fixant à sa région 3'UTR (Lee *et al.*, 1993 ; Wightman *et al.*, 1993). Depuis, il a été démontré que *lin-4* régulait aussi négativement *lin-28*, un gène impliqué dans le passage du stade L1 au stade L2 lors du développement larvaire du nématode *C.elegans* (Moss *et al.*, 1997). Puis en 2000, toujours chez le nématode, un second miARN, *let-7*, conservé dans la plupart des espèces a été identifié (Pasquinelli *et al.*, 2000 ; Reinhart *et al.*, 2000). Ces travaux fondateurs ont conduit à une série d'études démontrant que *lin-4* et *let-7* appartiennent à une famille plus large d'ARNs, les miARNs, qui sont hautement conservés et possèdent un rôle physiologique crucial dans la régulation de l'expression génique (Lagos-Quintana *et al.*, 2001; Lau *et al.*, 2001; Lee and Ambros, 2001).

1.1. Les fonctions des miARNs

Les miARNs sont de petits ARNs non codants d'environ 22 nucléotides présents dans la plupart des cellules eucaryotes. Ainsi, le génome humain compte plus de 1000 miARNs dont l'expression varie selon le type cellulaire et le stade de développement. Les miARNs sont capables de lier des séquences complémentaires situées dans la région 3'UTR de leurs gènes cibles entraînant la régulation de l'expression d'environ 60% des gènes humains (Lim *et al.*, 2003 ; Bartel *et al.*, 2004 ; Bentwich *et al.*, 2005 ; Bartel *et al.*, 2009 ; Friedman *et al.*, 2009).

1.1.1. Le complexe miRISC

Afin de réguler les gènes cibles, les miARNs sont incorporés à un complexe protéique appelé RISC (« RNA Induced Silencing Complex », Hammond *et al.*, 2001 ; Martinez *et al.*, 2002). Ce complexe miRISC est composé d'un miARN, d'une protéine de type Argonaute (AGO) et d'une protéine GW182 (TNRC6) (Eulalio *et al.*, 2008a ; Chekulaeva and Filipowicz, 2009).

Les protéines AGO contiennent trois domaines : un domaine PAZ à l'extrémité N-terminale, un domaine MID et un domaine PIWI. Les domaines PAZ et MID lient les extrémités 3' et 5' du miARN, tandis que le domaine PIWI d'AGO2 porte une activité endoribonucléase (Liu *et al.*, 2004 ; Meister *et al.*, 2005 ; Peters and Meister, 2007 ; Azuma-Mukai *et al.*, 2008 ; Landthaler *et al.*, 2008 ; Wu *et al.*, 2008 ; Jinek and Doudna, 2009). Chez les mammifères, quatre protéines AGO (AGO1 à AGO4) existent, et leurs expressions varient selon le type cellulaire et le stade de développement. Les protéines AGO1, AGO3 et AGO4 ont une fonction dans la répression traductionnelle du gène cible tandis que la protéine AGO2 est la seule à posséder une activité enzymatique de type RNase H-like (Liu *et al.*, 2004). Cette fonction d'endoribonucléase, qui ne peut être complétée par les autres protéines AGO, confère donc à AGO2 un rôle essentiel dans la dégradation des ARNm ciblés par le complexe miRISC.

Les protéines GW182 (TNRC6A, B et C) de 182 kDa contiennent des répétitions glycine-tryptophane (GW) qui interagissent avec les protéines AGO, un domaine PAM2 d'interaction avec la PABP (« poly(A)-binding protein ») et un domaine CIM d'interaction avec les complexes de déadénylation PAN2-PAN3 et CCR4-NOT. Cette famille de protéines GW182 est requise pour l'activité répressive du complexe miRISC (Eulalio *et al.*, 2009). En effet, la perte de GW182 change l'expression des ARNm de la même façon qu'une déplétion de la protéine AGO1 (Behm-Ansmant *et al.*, 2006). De plus l'interaction de GW182 avec AGO1 est essentielle à la répression et à la diminution des ARNm par les miARNs (Liu *et al.*, 2005 ; Jakymiw *et al.*, 2007 ; Eulalio *et al.*, 2008b). Enfin, leurs interactions avec les protéines PABP, PAN2-PAN3 et CCR4-NOT1, suggèrent que ces protéines GW182 recrutent les complexes de déadénylation conduisant à la dégradation de l'ARNm ciblé par le complexe miRISC (Behm-Ansmant *et al.*, 2006 ; Fabian *et al.*, 2009 ; Braun *et al.*, 2011 ; Huntzinger *et al.*, 2013).

Le détail de l'assemblage du miRISC n'est pas encore complètement établi mais pourrait être couplé à l'étape de clivage par DICER et à la sélection du brin mature du

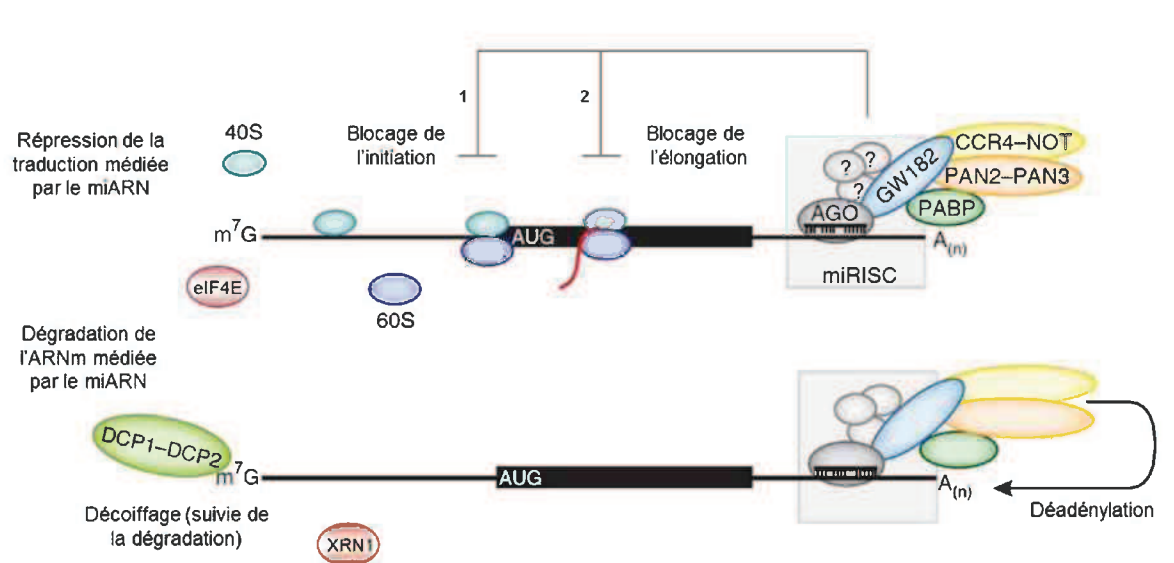


Figure 13 : Inhibition de l'expression des gènes par le complexe miRISC.

(adaptée de Fabian et al., 2012)

A. Inhibition de la traduction médiée par le miARN. Le complexe miRISC inhibe l'initiation de la traduction (1) en empêchant l'assemblage de la liaison de la sous-unité 60 S bloquant ainsi la formation du complexe ribosomal 80 S ou (2) l'élongation de la traduction.

B. La dégradation de l'ARNm médiée par le miARN. Le complexe miRISC interagit avec les complexes déadénylases CCR4-NOT et PAN2-PAN3 pour faciliter la déadénylation de la queue poly(A). Après déadénylation, la coiffe en 5' est enlevée par le complexe DCP1-DCP2, et la dégradation de l'ARNm s'effectue par la 5'-3' exonucléase XRN1.

40 S, 60 S : deux sous-unités ribosomales ; eIF4E : facteur d'initiation de la traduction ; m⁷G : coiffe ; (A)_n : queue poly-adénosine ; AUG : codon d'initiation de la traduction.

miARN. En effet, des études chez la drosophile ont montré qu'une endoribonucléase C3PO (« Component 3 Promoter of RISC ») composée de 6 sous-unités Translin et de 2 sous-unités catalytiques Trax, faciliterait l'activation du RISC de manière Mg^{2+} dépendante en supprimant le brin passager du duplex miARN (Liu *et al.*, 2009).

Le complexe miRISC est capable de se lier à l'ARNm cible et, selon le degré d'hybridation du miARN, conduit soit à l'inhibition de la traduction soit à la dégradation de l'ARNm (Eulalio *et al.*, 2008a ; Filipowicz *et al.*, 2008 ; Chekulaeva and Filipowicz, 2009). En effet, chez les animaux, l'hybridation partielle du miARN à son ARNm cible conduirait à l'inhibition de la traduction tandis que l'hybridation parfaite conduit à la dégradation de l'ARNm cible (Filipowicz *et al.*, 2008 ; Bartel *et al.*, 2009).

1.1.2. L'inhibition de la traduction

L'étude de l'action du miARN let-7 sur des gènes rapporteurs montre que ce miARN inhibe la traduction de la luciférase, sans altérer l'expression de l'ARNm (Humphreys *et al.*, 2005 ; Jinek and Doudna, 2009). Depuis, de nombreuses études ont confirmé ces résultats et ont précisé les étapes de la traduction pouvant être inhibées :

- Inhibition de l'initiation de la traduction.

Des études *in vitro* et *in cellulo* ont proposé que les miARNs empêchent la fonction et le recrutement du facteur de traduction eIF4E sur la coiffe de l'ARNm, ce qui conduit à la répression de l'initiation de la traduction. Dans ce modèle AGO2 lierait directement la coiffe, bloquant ainsi l'accès de celle-ci au facteur eIF4E (Kiriakidou *et al.*, 2007 ; Eulalio *et al.*, 2008b ; Zdanowicz *et al.*, 2009). Toutefois, ce modèle a été rapidement remis en question puis invalidé (Kinch *et al.*, 2009). Un second modèle a alors émergé dans lequel AGO2 interférerait avec la formation du complexe ribosomal 80 S, ceci en interagissant avec le facteur d'initiation eIF6 associé à la sous-unité 60 S du ribosome (Ceci *et al.*, 2003 ; Thermann *et al.*, 2007 ; Chendrimada *et al.*, 2007) (**figure 13A**).

- Inhibition de l'élongation de la traduction.

L'analyse de la sédimentation de polysomes a montré que le complexe miRISC est associé aux polysomes suggérant qu'il pourrait également inhiber l'élongation de la traduction (Kim *et al.*, 2004 ; Nelson *et al.*, 2004 ; Nottrott *et al.*, 2006 ; Maroney *et al.*, 2006 ; Vasudevan *et al.*, 2008 ; Ding *et al.*, 2009 ; Gu *et al.*, 2009).

Cependant, les travaux de Thermann et Hentze ont invalidé ce modèle en montrant que le complexe miRISC serait retrouvé dans des structures artéfactuelles appelées pseudo-polysomes (Thermann and Hentze, 2007).

1.1.3. La dégradation de l'ARNm

Il est maintenant clairement établi que les miARNs initient la dégradation des ARNm par le raccourcissement de la queue poly(A) grâce à deux complexes de déadénylation : PAN2-PAN3 et CAF1-CCR4-NOT (figure 13B) (Meyer *et al.*, 2004 ; Yamashita *et al.*, 2005 ; Chen *et al.*, 2009). En effet, une diminution de AGO2 bloque la déadénylation et la dégradation de l'ARNm. De plus, les protéines GW182 recrutent le complexe CCR4-NOT1 et peuvent interagir et recruter PAN3, conduisant ainsi à la déadénylation de l'ARNm (Behm-Ansmant *et al.*, 2006 ; Fabian *et al.*, 2009 ; Kuzuoglu-Öztürk *et al.*, 2012). Les protéines GW182 recrutent également les enzymes de clivage de la coiffe DCP1 et DCP2, ce qui entraîne la dégradation de l'ARNm de 5' en 3' par l'exonucléase cytoplasmique XRN1 (Coller and Parker, 2004 ; Liu *et al.*, 2005 ; Behm-Ansmant *et al.*, 2006).

Enfin, un modèle propose que l'inhibition de la traduction et la dégradation des ARNm soient couplées. En effet, en se liant à la protéine PABP, la protéine GW182 empêche celle-ci d'interagir avec le facteur d'initiation de la traduction eIF4G et donc diminue l'initiation de la traduction, simultanément, la protéine GW182 recrute les exonucléases CCR4-NOT1, ce qui conduit à la dégradation de l'ARNm (Zekri *et al.*, 2013).

1.1.4. L'activation de la traduction

Les miARNs sont connus pour se lier à la région 3'UTR de leurs ARNm cibles. De façon plus rare, ils sont aussi capables de reconnaître des séquences dans la région 5'UTR induisant une activation de la traduction (Kloosterman *et al.*, 2004 ; Easow *et al.*, 2007 ; Henke *et al.*, 2008 ; Orom *et al.*, 2008 ; Gu *et al.*, 2009 ; Rigoutsos, 2009). Enfin, un même miARN peut jouer le rôle d'activateur de la traduction en se liant en 5'UTR ou de répresseur de la traduction en se liant en 3'UTR de ses ARNm cibles (Bhattacharyya *et al.*, 2006 ; Jopling *et al.*, 2008 ; Kim *et al.*, 2009).

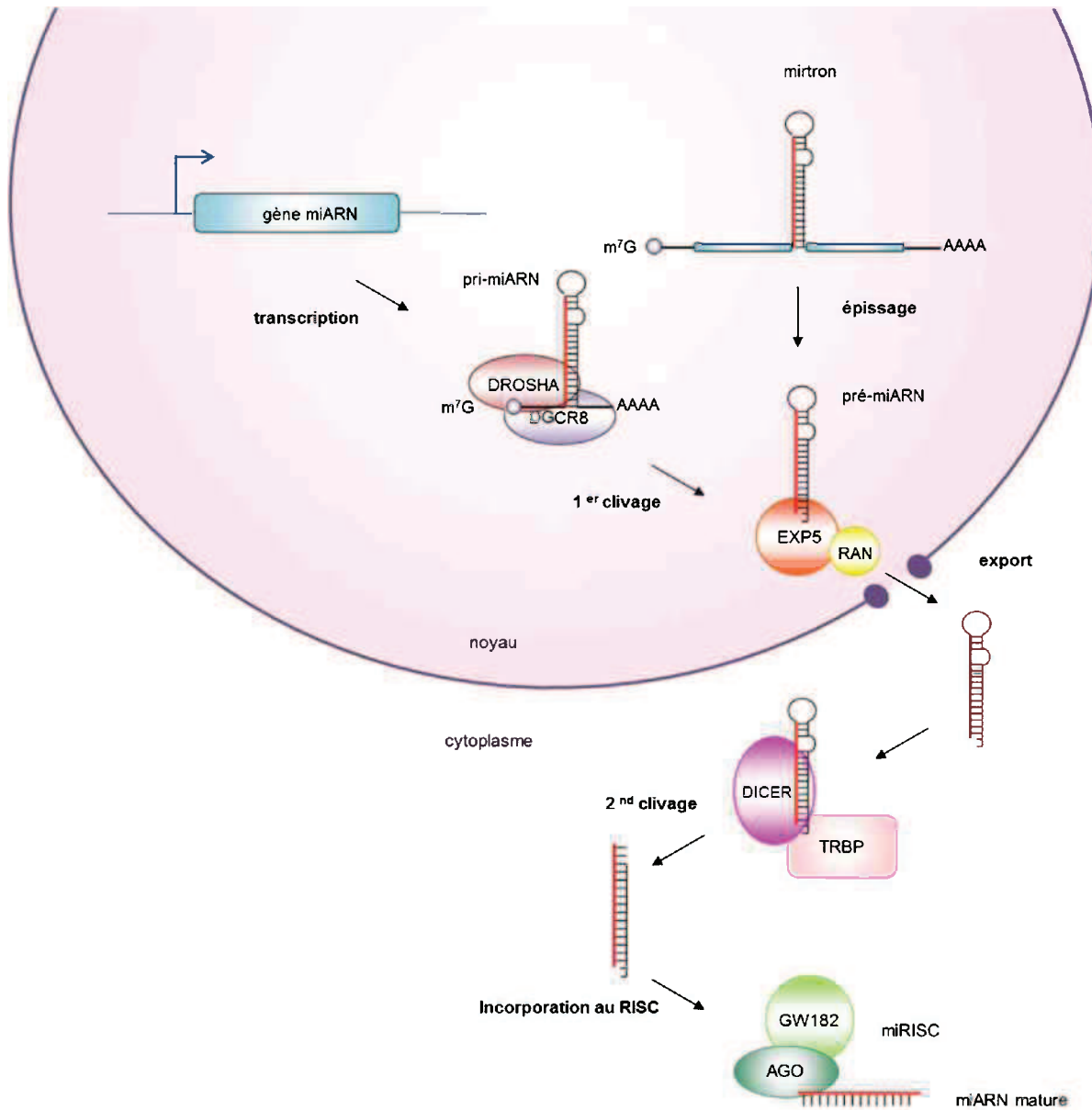


Figure 14 : Biogenèse des miARNs.

Le transcrit primaire, pri-miARN, est généré par l'ARN polymérase II. Il est ensuite clivé par le complexe DROSHA-DGCR8 générant le pré-miARN. Dans le cas des mirtrons, le pré-miARN correspondant à un intron est produit par la machinerie d'épissage. Le pré-miARN est ensuite pris en charge par l'Exportine 5 et exporté dans le cytoplasme où il est clivé par DICER associé à TRBP, ce qui génère un duplex miARN/ARN passager. Enfin, le miARN est incorporé dans le complexe RISC formant ainsi le miRISC.

1.2. La biogenèse des miARNs

Les miARNs matures sont le produit de deux étapes de clivage successives ayant lieu dans le noyau puis dans le cytoplasme. Ainsi, un transcrit primaire de plusieurs centaines ou milliers de nucléotides (pri-miARN) est produit par l'ARN polymérase de type II, puis clivé dans le noyau par le complexe DROSHA-DGCR8 donnant un miARN précurseur (pré-miARN) d'environ 60 à 80 nucléotides. Ce dernier est exporté dans le cytoplasme puis clivé par DICER générant un miARN mature d'environ 20 nucléotides, et enfin incorporé dans le complexe miRISC (figure 14).

1.2.1. La localisation génique et la transcription

On distingue deux types de miARNs: les miARNs intergéniques qui sont transcrits à partir de leur propre promoteur et les miARNs intragéniques qui sont situés à l'intérieur d'un gène hôte, et dont l'expression dépend donc du promoteur de ce gène hôte (Lagos-Quintana *et al.*, 2001 ; Lee et Ambros, 2001 ; Lee *et al.*, 2004). Ainsi, chez les mammifères, 70% des miARNs sont intragéniques, généralement issus d'une région intronique ou non codante d'un gène hôte (Rodriguez *et al.*, 2004 ; Baskerville and Bartel, 2005). De plus, de nombreux miARNs sont transcrits à partir d'un même promoteur : ils sont dits polycistroniques (Lagos-Quintana *et al.*, 2001 ; Lee *et al.*, 2002b).

Les miARNs intergéniques sont transcrits sous forme d'un long précurseur coiffé en 5' et polyadénylé en 3', indiquant ainsi qu'ils sont transcrits par l'ARN polymérase de type II (Aukerman and Sakai, 2003). Il est à noter qu'une étude suggérant que les miARNs du locus C19 soient transcrits par l'ARN polymérase de type III (Borchert *et al.*, 2006) a été invalidée (Bortolin-Cavaillé *et al.*, 2009). Ainsi, il apparaît que l'ARN polymérase II transcrit la plupart, sinon tous les miARNs, sous forme d'un long transcrit primaire le pri-miARN.

1.2.2. Le clivage par le complexe DROSHA-DGCR8

Le pri-miARN est clivé en un précurseur, le pré-miARN, ayant une structure en épingle à cheveux d'environ 70 nucléotides. Le clivage est effectué par un complexe nommé « microprocesseur » composé de deux protéines : DROSHA, une enzyme RNase de type III,

et une protéine liant l'ARN double brin : DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region 8 ; Pasha chez la drosophile) (Lee *et al.*, 2003 ; Shiohama *et al.*, 2003).

DGCR8 contient deux domaines de liaison à l'ARN double brin (dsRBD) lui permettant de reconnaître la jonction entre la région simple brin du pri-miARN et la structure « tige-boucle » du futur pré-miARN. DROSHA, qui appartient à la classe II de la famille des RNases III, est caractérisée par deux domaines RNase III et un domaine de liaison à l'ARN double brin (dsRBD) inactif (Han *et al.*, 2006). Le domaine RNase III dans la région C-terminale de DROSHA clive le brin 5' du pri-miARN, tandis que le second domaine RNase III clive le brin 3' du pri-miARN à environ 11 paires de bases de la jonction entre la région simple brin du pri-miARN et la structure « tige-boucle » du pré-miARN (Han *et al.*, 2004 ; Han *et al.*, 2006). Ainsi ce clivage génère un pré-miARN sous forme d'une tige boucle d'environ 70 nucléotides qui contient un groupe phosphate en 5', deux nucléotides sortants et un groupement hydroxyle en 3'.

Enfin, il est à noter que de rares miARNs, nommés mirtrons, sont générés à partir de la machinerie d'épissage de façon indépendante du complexe DROSHA-DGCR8. La réaction d'épissage libère alors un court intron qui constitue un pré-miARN (Berezikov *et al.*, 2007).

1.2.3. L'export du pré-miARN

Le pré-miARN est exporté du noyau vers le cytoplasme grâce à l'Exportine-5 (Exp5), une protéine de la famille des karyophérines (Yi *et al.*, 2003 ; Bohnsack *et al.*, 2004 ; Gwizdek *et al.*, 2004). La liaison de l'exportine 5 au pré-miARN dépend d'un cofacteur appelé RAN-GTP. La quantité de GTP étant plus élevée dans le noyau que dans le cytoplasme, l'exportine 5 lie le pré-miARN dans le noyau et le libère dans le cytoplasme (**figure 14**) (Lee *et al.*, 2003 ; Yi *et al.*, 2003)

Enfin, les pré-miARNs sont exportés de façon indépendante de leurs séquences. En effet, le complexe RAN-GTP-exportine 5 se lie à un ARN double brin dont l'extrémité 3' contient deux nucléotides sortants, une structure typique du clivage par DROSHA (miARN) ou par le spliceosome (mirtrons) (Bohnsack *et al.*, 2004 ; Zeng and Cullen , 2004).

Il est à noter que l'Exportine 5 intervient aussi dans l'export de l'ARNm *DICER*, toutefois par un mécanisme encore mal compris (Bennasser *et al.*, 2011).

1.2.4. Le clivage par DICER

Suite à son export dans le cytoplasme, le pré-miARN est reconnu et clivé par DICER, une RNase de type III cytoplasmique. Conservée dans tous les organismes eucaryotes, DICER intervient dans le clivage des pré-miARNs et dans la génération des siARNs à partir d'ARN double brin cytoplasmique. Cette protéine d'environ 250 kDa, contient un domaine DEXH-box hélicase, un domaine DUF283, un domaine PAZ, deux domaines RNase de type III (RIIIa et RIIIb) et un domaine de liaison à l'ARN double brin (dsRBD). Le domaine PAZ reconnaît l'extrémité 5'-phosphate ainsi que les deux nucléotides sortants de l'extrémité 3' du pré-miARN (Lingel *et al.*, 2003 ; Song *et al.*, 2003 ; Park *et al.*, 2011). Le domaine hélicase reconnaît les mésappariements ainsi que la boucle terminale du pré-miARN (Tsutsumi *et al.*, 2011 ; Gu *et al.*, 2012). Enfin, les deux domaines RNase III de DICER clivent le pré-miARN à une distance d'environ 22 nucléotides de l'extrémité 3', générant ainsi un duplex ARNs de 22 nucléotides ayant deux nucléotides sortants en 3'-OH (Bernstein *et al.*, 2001 ; Ketting *et al.*, 2001). La faible stabilité thermodynamique de ce duplex d'ARNs permet de sélectionner le brin guide, qui donnera le miARN mature incorporé dans le complexe miRISC, du brin passager, qui sera dégradé (Khvorova *et al.*, 2003 ; Schwarz *et al.*, 2003 ; Krol *et al.*, 2004). Toutefois, certains duplex d'ARNs donnent naissance à deux miARNs matures, miR-5p et miR-3p, qui peuvent être actifs et cibler des ARNm différents (Okamura *et al.*, 2008). Enfin et bien que *in vitro*, DICER puisse agir seule, on le retrouve *in cellulo* en complexe soit avec la protéine PACT, soit avec la protéine TRBP. Ces protéines stabilisent DICER et facilitent la production du miRISC contenant le miARN mature associé aux protéines AGO et GW182 (Chendrimada *et al.*, 2005 ; Lee *et al.*, 2006 ; Kok *et al.*, 2007 ; Melo *et al.*, 2009).

Notons qu'une diminution de DICER est associée à certains cancers et à des cas de dégénérescence maculaire liée à l'âge (Merritt *et al.*, 2008). De même, la létalité embryonnaire provoquée par l'inactivation de ce gène chez la souris prouve l'importance de DICER au cours du développement (Bernstein *et al.*, 2003).

1.2.5. Stabilité des miARNs matures

Les mécanismes de dégradation et de stabilisation des miARNs matures sont encore peu connus. En effet, si il est clair que les protéines Argonautes stabilisent les miARNs (Diederichs and Haber, 2007 ; Pasquinelli *et al.*, 2012), et que les exonucléases 3'-5', XRN2 et SDN, dégradent les miARNs respectivement chez *C.elegans* et les plantes (Ramachandran

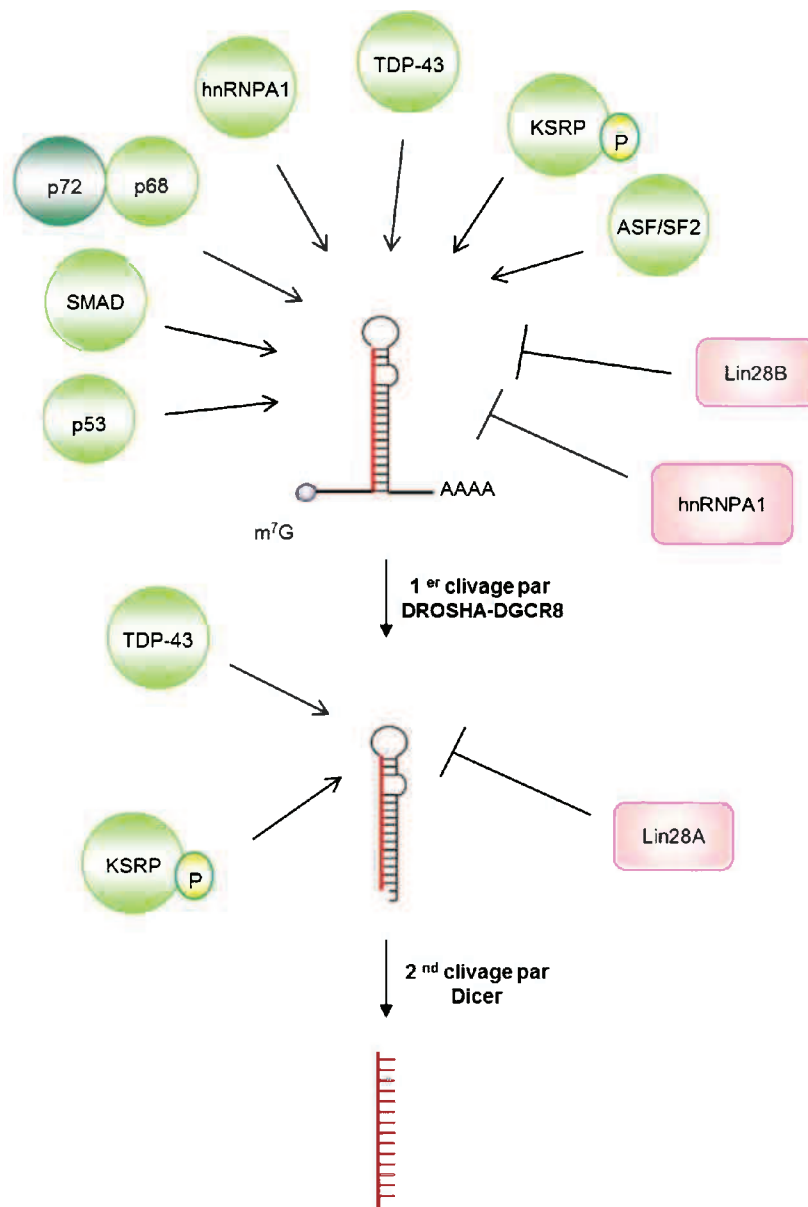


Figure 15 : Régulations de la maturation des miARNs.

Les régulateurs positifs (activateurs) et négatifs (inhibiteurs) de la maturation des miARNs sont respectivement en vert et en rose. La phosphorylation de KSRP est indiquée en jaune.

Au niveau de l'étape effectuée par DROSHA-DGCR8, les protéines p53, p68, p72, SMAD, ASF/SF2, hnRNP A1, TDP-43 et KSRP phosphorylée activent ou inhibent la maturation spécifique de miARNs. Lin28B inhibe la maturation des pri-let-7.

Au niveau de l'étape effectuée par Dicer, KSRP, TDP-43 et LIN28A activent ou inhibent la maturation de pré-miARNs spécifiques.

and Chen, 2008 ; Chatterjee and Grosshans 2009), les mécanismes conduisant à une stabilisation ou une dégradation spécifique de certains miARNs ont été peu étudiés. Une des rares études à ce sujet montre que le miR-122 est stabilisé spécifiquement dans les cellules de foie par une mono-adénylation due à la poly(A)-polymérase GLD2 (TUTase 2) (Katoh *et al.*, 2009 ; Burns *et al.*, 2011). Plus récemment, il a été montré que GLD2 est capable de mono-adényler une population de miARNs spécifiques, et ceci en fonction de leur séquence 3' (D'Ambrogio *et al.*, 2012).

1.3. La régulation de la biogenèse des miARNs

Comme la maturation des ARNm, la biogenèse des miARNs est régulée de façon spatio-temporelle par de nombreuses protéines. Cette régulation permet l'expression spécifique d'un miARN dans un type cellulaire donné à un moment défini du développement.

1.3.1. Les protéines régulant la biogenèse des miARNs

Le premier niveau de régulation de l'expression des miARNs est leur transcription. En effet, l'expression de nombreux facteurs de transcription est spécifique d'un tissu ou d'un stade du développement (Rosenberg *et al.*, 2006 ; Barroso-Del Jesus *et al.*, 2008). De même, les régulations épigénétiques affectent aussi l'expression des miARNs (Lujambio *et al.*, 2008). De plus, le clivage par le complexe DROSHA-DGCR8 serait co-transcriptionnel et lié à la coiffe présente en 5' du pri-miARN (Pawlicki and Steitz, 2010).

La seconde étape régulée est celle du clivage par le complexe DROSHA-DGCR8. En effet, des protéines sont capables de réguler positivement ou négativement cette étape en liant directement DROSHA et/ou le pri-miARN (Krol *et al.*, 2010). Ainsi, de nombreux facteurs impliqués dans la maturation des ARNm interviennent aussi dans la maturation des miARNs, tel que hnRNP A1 qui active le clivage par DROSHA du pri-miR-18a, mais qui inhibe le clivage du pri-let-7a1 (**figure 15**) (Guil *et al.*, 2007 ; Michlewski *et al.*, 2008 ; Michlewski *et al.*, 2010a). Au contraire, KSRP régule positivement le clivage du pri-let-7a1 par DROSHA (Trabucchi *et al.*, 2009 ; Michlewski *et al.*, 2010b), sachant que l'activité de KSRP est régulée par sa phosphorylation par la kinase ATM (Zhang *et al.*, 2011). De même, ASF/SF2 est capable de lier le pri-miR-7 et d'activer son clivage par DROSHA (Wu *et al.*, 2010). Enfin,

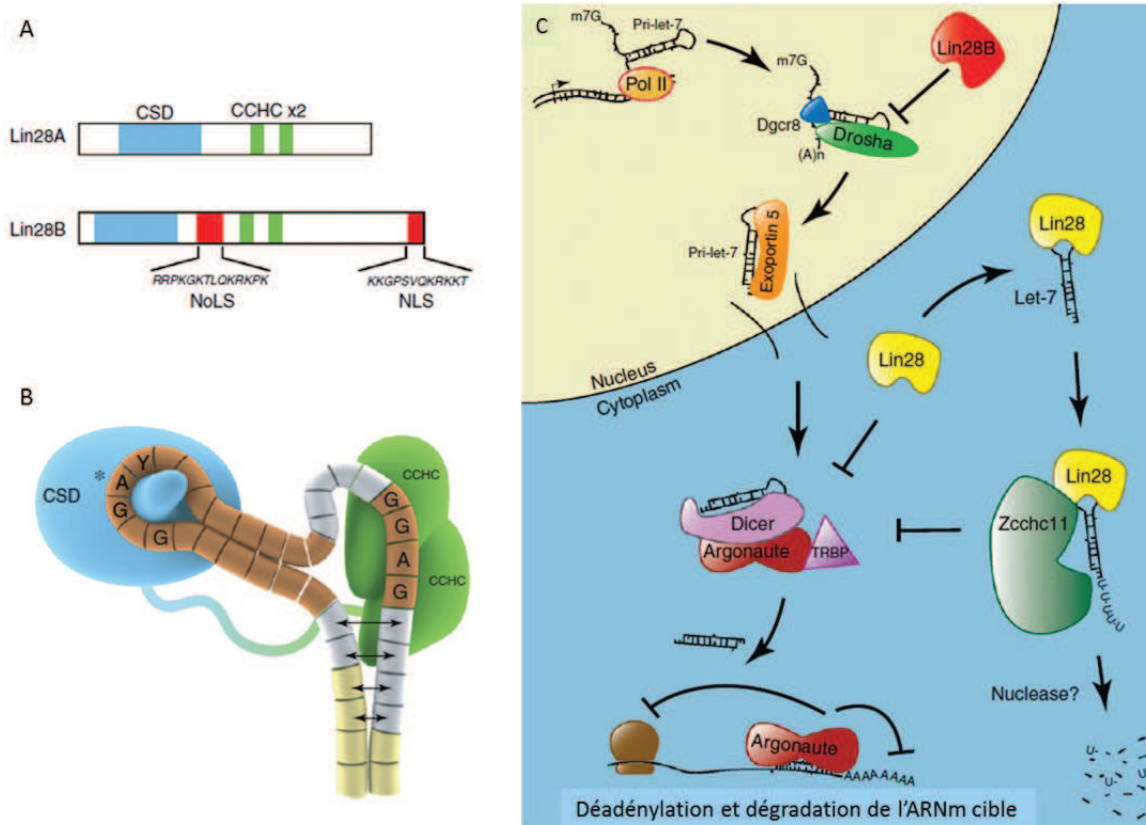


Figure 16 : LIN28 bloque sélectivement la biogenèse des miARNs let-7.

(adaptée de Thornton et al., 2012)

A. LIN28A et LIN28B possèdent un domaine Cold Shock (CSD) et deux domaines doigts de Zinc CCHC. NoLS : signal de localisation nucléolaire ; NLS : signal de localisation nucléaire.

B. Interactions entre LIN28 et let-7 (pri et pré-let-7). LIN28A lie la boucle terminale du pré-let-7. Le domaine CSD (en bleu) interagit avec la boucle terminale, tandis que le domaine CCHC (en vert) se dimérise autour du motif conservé GGAG plus proche du site de clivage de Dicer.

C. En l'absence de LIN28, les membres de la famille let-7 sont maturés par la voie classique de biogenèse des miARNs. Dans le cytoplasme, l'expression de LIN28A (jaune) bloque le clivage par Dicer à travers une interaction entre la boucle terminale du pré-let-7 et le recrutement de ZCCHC11 (TUT-4) qui uridyle le pré-let-7, le conduisant à sa dégradation.

LIN28B (rouge) lie le pri-let-7, bloquant l'activité du complexe DROSHA-DGCR8, par un mécanisme indépendant de TUT-4.

PolII : ARN polymérase II ; m7G : N-7-méthylguanine ; (A)_n : queue poly-Adénosine.

TRBP : TAR-RNA Binding Protein.

les protéines SMAD, les hélicases p68/p72 et TDP-43 stimulent le clivage par DROSHA de miARNs spécifiques (Fukuda *et al.*, 2007 ; Davis *et al.*, 2010 ; Kawahara *et al.*, 2012).

La dernière étape connue pour être régulée est celle du clivage par DICER. En effet, KSRP en se liant à la boucle terminale riche en guanine du pré-let-7a stimulerait son clivage par DICER (Trabucchi *et al.*, 2009 ; Nicastro *et al.*, 2012). KSRP favoriserait aussi le clivage par DICER du pré-miR-155 en miR-155 (Bhattacharyya *et al.*, 2013). De même, TDP-43 se lierait à la boucle terminale de certains pré-miARNs neuronaux afin de promouvoir leur clivage par DICER (Kawahara *et al.*, 2012).

Une partie de mon projet de thèse a porté sur la régulation de la maturation d'un miARN spécifique du cœur, miR-1, par une protéine de l'épissage alternatif MBNL1 et la protéine LIN28 qui était déjà connue comme un régulateur de la maturation de miARN spécifiques. C'est pourquoi la partie qui suit est plus particulièrement consacrée à la protéine LIN28.

1.3.2. LIN28 est un régulateur de la biogenèse des miARNs

Lin28 est une protéine de 28 kDa découverte chez *C.elegans* comme régulant les étapes du développement du nématode (Moss *et al.*, 1997). Chez l'homme, il existe deux paralogues: LIN28A (qui est l'homologue de Lin28) et LIN28B (figure 16A). Lin28 est un régulateur de la maturation des miARNs de la famille let-7. En effet, il a été observé que les pri-let-7 sont fortement exprimés dans les cellules souches embryonnaires, bien que les miARNs let-7 matures ne soient pas présents, suggérant qu'un mécanisme inhibe la maturation des pri-let-7 en let-7 matures (Rybak *et al.*, 2008). L'équipe de Narry Kim a alors montré que les protéines LIN28A et LIN28B sont capables de lier spécifiquement la boucle des pré-let-7 *in vitro* (figure 16B), et de recruter la terminal-uridylyl-transferase TUT-4 (ZCCHC11/PUP-2) qui poly-uridylyle l'extrémité 3' des pré-let-7, ce qui bloque ainsi le clivage par DICER (figure 16C) (Heo *et al.*, 2008 ; Heo *et al.*, 2009 ; Lehrbach *et al.*, 2009). En effet, l'uridylation des pré-let-7 en 3' empêche leur reconnaissance par DICER et conduit à leur dégradation par un mécanisme encore inconnu (Heo *et al.*, 2008 ; Heo *et al.*, 2009). Plus récemment, il a été découvert que la TUT-7 (ZCCHC6) peut également être recrutée et poly-uridylyler les pré-let-7 dans les cellules embryonnaires (Thornton *et al.*, 2012). En dépit de leur grande homologie, LIN28A et LIN28B régulent les miARNs let-7 par des mécanismes distincts. En effet, LIN28A, qui est majoritairement cytoplasmique, bloque le clivage par DICER en recrutant TUT-4 qui uridylyle les pré-let-7 tandis que LIN28B, qui est nucléaire,

bloque le clivage des pri-let-7 en pré-let-7 effectué par DROSHA (figure 16C) (Piskounova *et al.*, 2011).

Cette inhibition, spécifique aux membres de la famille de miARNs let-7, est conservée du nématode à l'homme et d'autres travaux suggèrent que les protéines LIN28 sont des acteurs importants du maintien de la pluripotence des cellules ES, du développement et de l'oncogenèse (Viswanathan *et al.*, 2008 ; Jones *et al.*, 2009). En effet, il a été observé que l'expression des protéines LIN28 diminue au cours de la différenciation des cellules ES tandis que l'expression des miARNs matures de la famille let-7 augmente. De plus, LIN28B fait partie des quelques protéines dont la surexpression permet de reprogrammer des fibroblastes en cellules iPS (Yu *et al.*, 2007). Enfin, les miARNs de la famille let-7 régulent les oncogènes MYC, RAS, cycline D1, HMGA2 et CDC25 (Roush and Slack, 2008 ; Li *et al.*, 2012). C'est pourquoi les miARNs let-7 sont considérés comme des suppresseurs de tumeurs. Ainsi, en inhibant l'expression des miARNs matures let-7, LIN28 agit comme un oncogène (Rybak, 2008 ; Zhou *et al.*, 2013). De plus, l'expression des protéines LIN28 est augmentée dans certaines tumeurs, et la déplétion de LIN28 dans des cellules cancéreuses humaines conduit à une diminution de la prolifération cellulaire (Chang *et al.*, 2009 ; Lliopoulos *et al.*, 2009 ; Viswanathan *et al.*, 2009). Enfin, une récente étude a montré que la surexpression de LIN28 dans des cellules souches hématopoïétiques murines adultes augmente leur capacité d'auto-renouvellement (Copley *et al.*, 2013).

1.3.3. L'édition des miARNs

Certains miARNs peuvent être édités ce qui consiste en une modification post-transcriptionnelle d'une base nucléotidique de l'ARN, changeant ainsi la séquence de l'ARN par rapport à la séquence de l'ADN. Ainsi, les protéines ADAR (« Adenosine Desaminases Acting RNA ») modifient les adénosines (A) en inosines (I) au niveau de certains pri-miARNs de façon co- ou post-transcriptionnelle. Cette édition toucherait 16% des pri-miARNs chez l'homme (Kawahara *et al.*, 2008). L'inosine possède des propriétés d'appariements similaires aux guanosines (G) ce qui peut donc influencer les clivages par DROSHA et DICER ainsi que la capacité du miARN mature à reconnaître ses cibles (Kawahara *et al.*, 2008 ; Heale *et al.*, 2009). En effet, l'édition des pri-miR-142 et -151 réprime respectivement leur clivage par DROSHA et par DICER (Scadden *et al.*, 2005 ; Kawahara *et al.*, 2007a). De plus, l'édition de miR-376 au niveau de sa région « seed » conduit à la reconnaissance d'un nouveau groupe d'ARNm cibles, dont la phosphoribosyl

pyrophosphate synthétase 1 impliquée dans la synthèse d'acide urique (Kawahara *et al.*, 2007b). Enfin, il a été montré que le niveau d'édition des miR-376a, -376b, -376c, -152-3p, -379 et -381 augmente avec le développement du cerveau, suggérant un rôle de l'édition au cours de la maturation de celui-ci (Ekdahl *et al.*, 2012).

Dans cette partie, j'ai détaillé la maturation des miARNs ainsi que ses régulations. La seconde partie de ce chapitre sera consacrée à la maturation et aux différents mécanismes de régulation des ARNm.

2. Les ARNs messagers : un gène, plusieurs messages

Dans les cellules eucaryotes, les gènes codant les protéines sont transcrits par l'ARN polymérase II sous forme d'ARN pré-messager (pré-ARNm). Celui-ci subit des modifications afin de donner naissance à des ARNm matures qui seront exportés vers le cytoplasme pour être traduits en protéines. Une de ces modifications est l'épissage des séquences codantes (les exons) conduisant à l'élimination des séquences non codantes (les introns).

En 1977, les travaux des équipes de Phillip Sharp, Pierre Chambon et Richard Roberts montrent que l'ARN pré-messager issu de la transcription est composé de parties codantes qui sont interrompues par des parties non codantes (Berget *et al.*, 1977 ; Breathnach *et al.*, 1977 ; Chow *et al.*, 1977). D'après la définition de Walter Gilbert, les régions non codantes ont alors été nommées introns pour « intragenic regions » et les régions codantes épissées : exons (Tonegawa *et al.*, 1978). L'épissage des exons permet donc de conserver uniquement les séquences donnant naissance à un ARNm mature qui sera exporté dans le cytoplasme et traduit en protéine. Chez les mammifères, les ARNs pré-messagers sont classiquement composés de plusieurs exons, relativement courts qui sont interrompus par de longs introns. Ainsi, chez l'homme, les ARNs pré-messagers sont en moyenne constitués de 8,8 exons de moins de 200 nucléotides interrompus par 7,8 introns d'une taille moyenne de 5500 nucléotides (Sakharkar *et al.*, 2004). Toutefois, ces chiffres ne constituent qu'une moyenne et sont donc à relativiser. Ainsi, le gène de la Titine contient 312 exons tandis que le gène de l'histone H1 n'en contient que deux. Par ailleurs, l'intron 7 de *KCNIP4*, codant une protéine liant le calcium et interagissant avec les canaux potassiques, mesure 1097903 nucléotides alors que l'intron 3 de *AQP2*, codant le canal aquaporine 2, mesure 26 nucléotides.

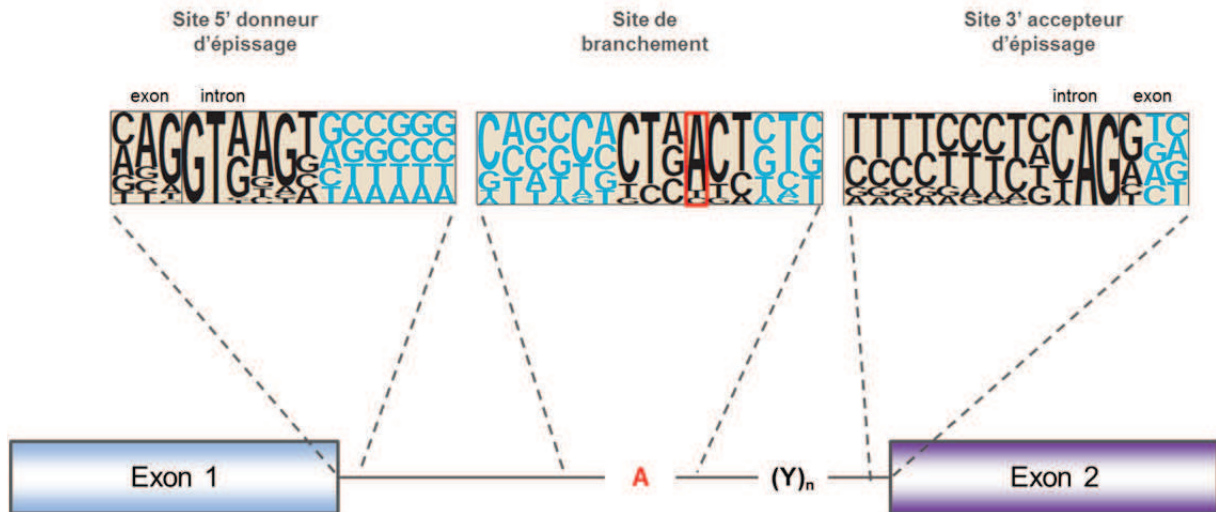


Figure 17 : Séquences consensus des sites d'épissage.

(adaptée de Patel and Steitz, 2003)

Les séquences consensus des sites 5' et 3' d'épissage des introns de classe majeure sont indiquées dans la partie supérieure du schéma. La fréquence à laquelle les nucléotides sont présents à chacune des positions est représentée par la taille des nucléotides. L'adénosine du site de branchement est indiquée en rouge et encadrée dans la partie supérieure ; (Y)_n représente la séquence riche en pyrimidines.

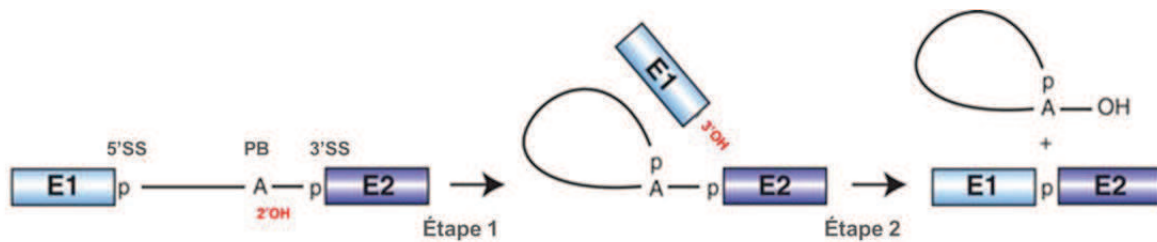


Figure 18 : Les deux étapes de transestérification de la réaction d'épissage.

(adaptée de Patel and Steitz, 2003)

Les deux étapes de transestérification sont indiquées par les deux flèches horizontales. Les hydroxyles (OH) réalisant les attaques nucléophiles sont indiqués en rouge. 5'SS : site 5' donneur d'épissage ; 3'SS : site 3' accepteur d'épissage.

2.1. L'épissage constitutif

Afin de générer un ARN mature, les exons doivent être identifiés et assemblés les uns à la suite des autres de façon précise et efficace. Ce mécanisme, appelé épissage constitutif, constitue donc une étape clé dans le contrôle de l'expression génique car elle détermine la nature de la phase codante du transcrit mature (Black, 2003).

2.1.1. Séquences nécessaires à l'identification des exons et des introns

L'épissage nécessite une reconnaissance précise des exons et des introns, qui dépend majoritairement de la séquence des sites 5' et 3' d'épissage, mais aussi de la taille des introns et des exons (Fox-Walsh *et al.*, 2005). Ainsi, lorsque la taille de l'intron est supérieure à 250 nucléotides, le spliceosome commence à s'assembler autour de l'exon, et on parle alors de définition de l'exon (Berget *et al.*, 1995).

Les introns et les exons sont limités par de courts éléments de séquences conservés et indispensables au recrutement de la machinerie d'épissage (figure 17).

- A l'extrémité 5' de l'intron, la séquence consensus AG/GURAGU (ou « R » définie un nucléotide A ou G et « / » représente la jonction exon/intron) constitue le site donneur d'épissage (site 5').
- A l'extrémité 3' des introns se trouvent trois éléments de séquence : le site de branchement (A), une séquence riche en pyrimidines (Yn) et le site accepteur (ou site 3'), qui est situé à la jonction de l'intron et de l'exon. Le site 3' d'épissage présente une séquence conservée de type YAG/G (Y définie une pyrimidine, soit les nucléotides U ou C). La séquence riche en pyrimidines est composée d'un enchaînement de 10 à 30 bases. Elle est limitée en amont par le site de branchement, situé 18 à 40 nucléotides du site 3' d'épissage. Ce site est caractérisé par une séquence consensus très dégénérée de type YNYURAC, renfermant une adénosine indispensable à la réaction de branchement (Patel and Steitz, 2003).

Il est à noter qu'il existe deux classes d'introns : les introns majoritaires délimités par les di-nucléotides GT/AG qui sont éliminés par la machinerie d'épissage majeure dépendante de la snRNP U2 ; et des introns beaucoup plus rares, qui sont délimités par les di-nucléotides AU/AC et qui sont éliminés par la machinerie d'épissage mineure dépendante de la snRNP U12 (Patel and Steitz, 2003).

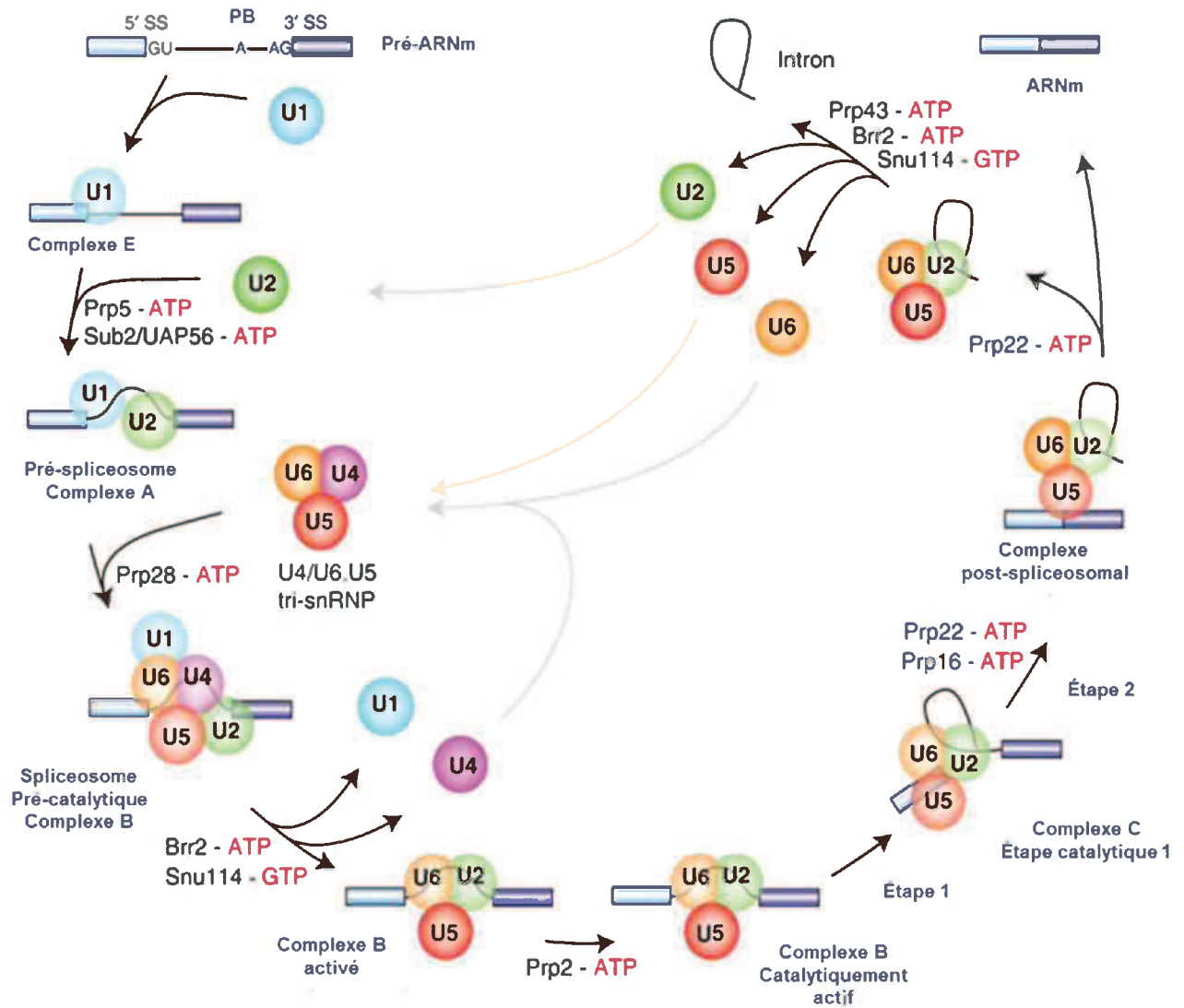


Figure 19 : Assemblage des acteurs de la réaction d'épissage.

(adaptée de Will and Luhrmann, 2011)

Les particules snRNP sont matérialisées par des sphères. PB : Point de branchement ; 5'SS : site 5' d'épissage ; 3'SS : site 3' d'épissage. Les noms des protéines ainsi que les noms des différents complexes formés sont indiqués ; Prp2, Prp5, Prp16, Prp28, Prp43, Brr2, Sub2 sont des ARN hélicases.

2.1.2. Mécanisme général de la réaction d'épissage

La réaction d'épissage est caractérisée par deux réactions de transestérification (**figure 18**) (Wahl *et al.*, 2009). La première réaction est une attaque nucléophile, par l'hydroxyle en 2' du résidu adénosine du point de branchement, du phosphate du premier nucléotide de l'intron. Cette réaction libère l'exon amont et permet la formation d'une liaison phosphodiester entre le premier nucléotide de l'intron (la guanosine du site 5') et l'adénosine du site de branchement résultant en un intermédiaire d'épissage formé de l'intron en lasso lié à l'exon aval. La seconde réaction est une attaque nucléophile, par l'hydroxyle situé en 3' de l'exon amont libre, du phosphate situé à la jonction intron/exon aval de la structure en lasso, conduisant ainsi à la libération de l'intron sous forme de « lasso » et la liaison des deux exons. L'intron en lasso est ouvert par une réaction enzymatique de débranchement pour être ensuite hydrolysé et dégradé.

Ces deux étapes de transestérification sont catalysées par une macrostructure, la machinerie d'épissage, aussi nommée « spliceosome ». Cette machinerie est un complexe composé de cinq particules ribonucléoprotéiques appelées snRNP U (pour « Uridine rich small nuclear RiboNucleoprotein Particle ») et de plus d'une centaine de protéines. Il est à noter que les snRNP U1, U2, U4/U6, et U5 constituent le « spliceosome » principal, qui est responsable de l'élimination des introns de classe GU/AG. Au contraire, les snRNP U11, U12 et U4atac/U6atac et U5 constituent le « spliceosome » mineur qui élimine les rares introns de type AU/AC. Chaque snRNP U est composée d'un ARN de petite taille nommé snARN U1, U2, U4, U5 ou U6, d'un cœur de sept protéines Sm pour les snARN U1, U2, U4, U5 et LSm (Sm-Like) pour U6, ainsi que d'un nombre variable de protéines spécifiques (Branlant *et al.*, 1982).

2.1.3. Les différentes étapes d'assemblage de la machinerie d'épissage

L'assemblage de la machinerie d'épissage sur un pré-ARNm se déroule séquentiellement selon une dynamique précise d'association et de dissociation des snRNP U1 à U6 (**figure 19**). La formation du complexe d'épissage commence ainsi par l'appariement entre l'extrémité 5' de l'ARN U1 à la séquence du site 5' d'épissage. Cette interaction ARN-ARN est stabilisée par les protéines de la snRNP U1, mais aussi par des protéines auxiliaires, dite protéines SR, car riches en sérines et arginines (Serine-arginine) (Boukris *et al.*, 2004 ; Bourgeois *et al.*, 2004).

De façon concomitante, la protéine SF1 et le dimère formé des protéines U2AF65 et U2AF35 (facteur auxiliaire de U2), s'associent respectivement au niveau du point de branchement et de la séquence polypyrimidine (figure 19). La sous-unité de 65 kDa de U2AF (U2AF65) reconnaît la suite de pyrimidines tandis que la sous-unité de 35 kDa de U2AF (U2AF35) interagit avec le di-nucléotide AG de l'extrémité 3' de l'intron. L'ensemble de ces interactions permet la reconnaissance des extrémités 5' et 3' de l'intron et génère le complexe spliceosomal E.

Suite à la reconnaissance des sites 5' et 3' d'épissage, la snRNP U2 s'engage dans un appariement ARN-ARN entre les nucléotides centraux du petit ARN U2 et les nucléotides du site de branchement. Cette interaction est stabilisée par les protéines de la snRNP U2 et par les protéines U2AF65 et 35 (Valcarcel *et al.*, 1996). L'association de la snRNP U2 sur le site de branchement chasse la protéine SF1 et conduit à la formation du complexe A.

La tri-snRNP U4/U6.U5 préassemblée est alors recrutée, pour former le complexe B inactif. Lors de la conversion du complexe B inactif en complexe B* actif, les snRNP U1 et U4 sont déstabilisées et libérées et les snRNP U2 U6 et U5 sont remodelées grâce à l'intervention de plusieurs hélicases (figure 19). En effet, l'interaction entre le site 5' d'épissage et le snARN U1 est rompue au profit d'une interaction entre le site 5' et le snARN U6 ; l'interaction entre les snARN U4 et U6 est rompue au profit d'une interaction entre les snARN U2 et U6 et enfin la snRNP U5 se lie à l'extrémité 3' de l'exon amont. Ces changements conduisent à un positionnement de l'adénosine du point de branchement à proximité de l'extrémité 3' de l'exon amont (Wahl *et al.*, 2009). Ce complexe B* catalyse la première réaction de transestérification ce qui génère le complexe C. Des réarrangements des snRNP U2 U6 et U5 se produisent, et notamment la snRNP U5 interagit avec l'extrémité 3' de l'exon amont et l'extrémité 5' de l'exon aval afin de rapprocher les deux exons et permettre la catalyse de la seconde transestérification. Enfin, le spliceosome se dissocie libérant l'ARNm sous forme d'une mRNP (messenger RiboNucleoprotein Particle) et les snRNP U2, U5 et U6 sont recyclées.

2.2. L'épissage alternatif

L'épissage alternatif correspond à la sélection de certaines séquences codantes selon le type cellulaire, le stade de développement ou les signaux reçus par la cellule. Cette régulation de l'épissage conduit donc à l'obtention de différents ARNm matures et permet donc l'expression de différentes protéines à partir d'un seul ARN pré-messager. Ce mécanisme

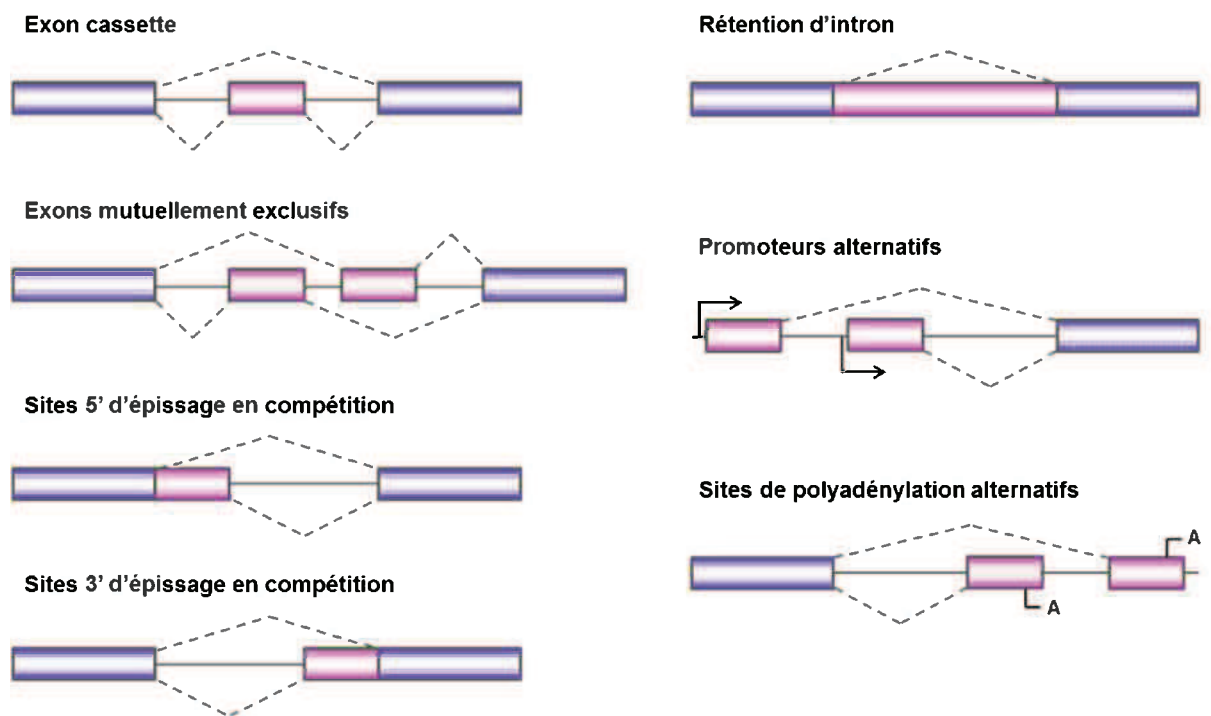


Figure 20 : Les différents types d'épissage alternatif.

Les exons épissés constitutivement sont matérialisés par des rectangles violets et les séquences épissées alternativement sont représentées par des rectangles roses. Les flèches représentent les promoteurs et les lettres « A » désignent les sites de polyadénylation de l'ARN pré-messager.

permet ainsi de générer des ARNm différents codant des protéines différentes à partir d'une même séquence génomique et accroît la capacité codante du génome (Graveley, 2001). L'épissage alternatif permet aussi de moduler l'expression des gènes en fonction du type cellulaire ou du stade de développement d'un organisme (Black, 2003).

2.2.1. Les différents types d'épissages alternatifs

On distingue plusieurs types d'épissage alternatif (figure 20) :

- Exons dits « cassette » : l'exon concerné est soit inclus soit exclu de l'ARNm ;
- Exons mutuellement exclusifs : les exons ne sont jamais inclus ensemble dans le même ARNm. Le choix d'un des couples de sites d'épissage 5' et 3' empêche l'utilisation de l'autre couple et vice versa ;
- Sites 5' d'épissage alternatif : plusieurs sites 5' d'épissage sont utilisables pour un même exon et sont en compétition les uns avec les autres ;
- Sites 3' d'épissage alternatif : plusieurs sites 3' d'épissage sont utilisables pour un même exon et sont donc en compétition les uns avec les autres ;
- Rétention d'introns : l'absence d'épissage entre un site 5' et 3' conduit à la rétention de l'intron ;
- Promoteurs ou sites de polyadénylation alternatifs : l'utilisation de promoteurs ou de sites de polyadénylation différents détermine l'identité des exons terminaux d'un ARNm.

L'épissage alternatif est généralement un processus hautement régulé qui implique de moduler la reconnaissance des sites d'épissage 5' et 3'. L'efficacité de cette reconnaissance dépend du degré de similitude des sites 5' et 3' avec les séquences consensus, mais aussi de la présence de séquences régulatrices introniques et exoniques, de la taille des exons et des introns, de la présence de structures secondaires d'ARN, ainsi que du couplage avec la transcription.

2.2.2. Les éléments régulateurs en *cis*

- La « force » des sites d'épissage.

Les sites d'épissage dits « forts » présentent des séquences fortement similaires aux séquences consensus des sites 5' et 3' d'épissage et une séquence polypyrimidine riche en

résidus uraciles entraînant une inclusion constitutive de ces exons. Au contraire, les sites d'épissage alternatif possèdent souvent des séquences dégénérées par rapport aux séquences consensus, une séquence polypyrimidine entrecoupée de purine et/ou un site de branchement non canonique (Coolidge *et al.*, 1997). Ces caractéristiques entraînent une diminution de l'interaction avec les snRNP du spliceosome et une augmentation de l'effet des éléments régulateurs (Garg and Green, 2007). En effet, le recrutement du spliceosome peut être facilité, ou au contraire diminué, par des interactions ou des compétitions avec des protéines qui se lient à des séquences spécifiques. Ces séquences, situées dans les exons ou dans les introns, peuvent donc être activatrices si elles recrutent des protéines stabilisant ou aidant le recrutement des composants du spliceosome, on parle alors de séquences ESE (« Exonic Splicing Enhancer ») ou ISE (« Intronic Splicing Enhancer »). Au contraire, l'assemblage de la machinerie d'épissage peut être inhibé par la présence de protéines se liant à des séquences inhibitrices exoniques, ESS (« Exonic Splicing Silencer »), ou introniques ISS (« Intronic Splicing Silencer »). Ces séquences sont reconnues par des protéines spécifiques: les protéines SR sont ainsi majoritairement associées aux séquences activatrices, alors que les protéines hnRNP sont souvent associées aux séquences inhibitrices (Chen and Manley, 2009).

- La taille et la structure des exons et des introns.

La taille de l'exon ou de l'intron influence aussi l'épissage alternatif. Ainsi, l'épissage d'un exon est favorisé quand celui-ci mesure entre 50 et 300 nucléotides (Berget, 1995). Un exon de moins de 50 nucléotides ou de plus de 300 nucléotides aura tendance à être exclu et nécessitera des séquences activatrices pour une reconnaissance correcte. Enfin, la structure secondaire d'un pré-ARNm peut influencer l'épissage alternatif. Ces structures permettent soit d'exposer, ou au contraire de « masquer », des sites 5' et 3' d'épissage ou des séquences de régulation (Warf and Berglund, 2010). En effet, pour être reconnus, les sites d'épissage 5' et 3' doivent être accessibles sous forme de séquence simple brin. Pour exemple, le site d'épissage 5' de l'exon 10 de l'ARN *MAPT* est « dissimulé » dans une structure tige-boucle ; l'ouverture de cette structure entraîne une augmentation de l'inclusion de cet exon (Varani *et al.*, 1999).

- Le couplage transcription-épissage.

En 1997, une étude de l'équipe d'Alberto Kornblihtt a montré que des modifications du promoteur provoquent des changements dans le profil d'épissage alternatif de l'exon EDI du pré-ARNm de la fibronectine (Cramer *et al.*, 1997). Cette étude fondatrice a ainsi

hnRNP

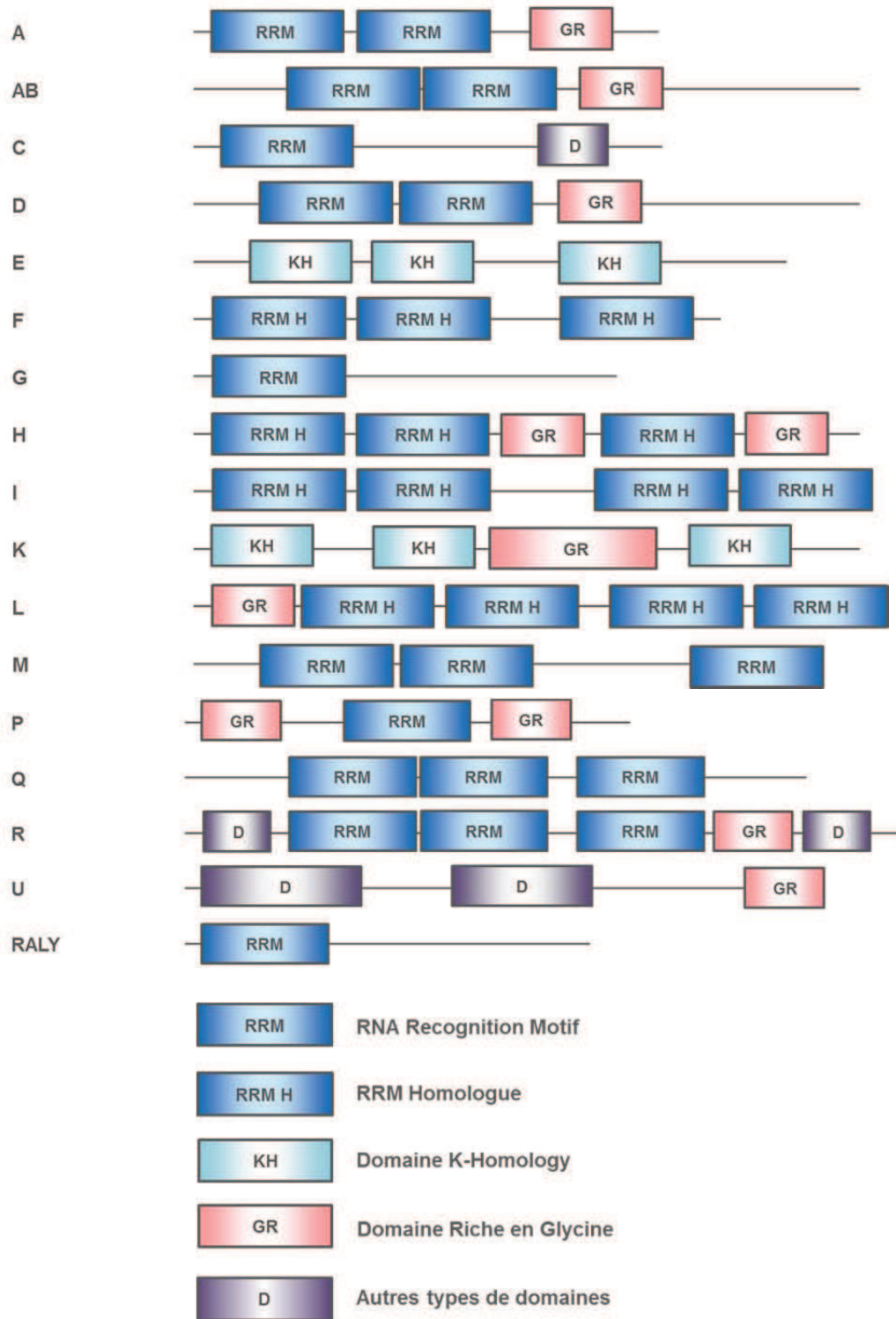


Figure 21 : Organisation structurale des protéines hnRNP.

(adaptée de Han et al., 2010)

L'appellation « A » représente les protéines hnRNP A/B dont A0, A1, A2/B1 et A3, issues de l'épissage alternatif des pré-ARNm de deux gènes distincts.

démontré l'existence d'un couplage entre la transcription et l'épissage alternatif. Depuis, plusieurs études ont montré que le domaine C-terminal (CTD) de la grande sous-unité de l'ARN polymérase II joue un rôle dans ce couplage en agissant comme une plateforme pour le recrutement des facteurs d'épissage tels que les snRNP U1, U5, les protéines SR, hnRNP A1 et les facteurs de polyadénylation (Neugebauer, 2002 ; Pandya-Jones, 2011 ; David *et al.*, 2011). Enfin la vitesse d'élongation de l'ARN polymérase II joue également un rôle dans l'épissage alternatif. En effet, il apparaît que dans le cas d'une combinaison d'un site alternatif 3' faible et d'un site alternatif 3' fort, la rapide élongation de l'ARN polymérase II entraîne l'exclusion de l'exon tandis que la faible élongation entraîne l'inclusion (de la Mata *et al.*, 2010).

2.2.3. Les éléments régulateurs en *trans*

2.2.3.1. Les protéines hnRNP

Dès leur transcription par l'ARN polymérase II, les ARNm interagissent avec un groupe de protéines très abondantes dans la cellule faisant la navette entre le noyau et le cytoplasme : les membres de la famille des protéines hnRNP (heterogeneous RiboNucleoprotein Particle). Ces protéines interviennent dans de nombreux processus cellulaires tels que la transcription, l'épissage, l'export, la stabilité, la polyadénylation et la traduction des ARNm. Elles sont classées par ordre alphabétique de A à U (**figure 21**). Les protéines hnRNP possèdent un ou plusieurs domaines de liaison à l'ARN de type RRM (« RNA Recognition Motif ») ou KH (« hnRNP K Homology ») et un ou plusieurs domaines riches en glycines ou prolines permettant des interactions protéine-protéine. Elles présentent également des séquences d'export et d'import de ces protéines à travers les pores nucléaires (Pollard *et al.*, 1996). Ces protéines peuvent subir des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation des résidus sérines et thréonines, la méthylation des résidus arginines et la SUMOylation et acétylation (Martinez-Contreras *et al.*, 2007). Ces modifications affectent la localisation de ces protéines ainsi que leur capacité à se lier à leurs ARNs cibles.

Les rôles de ces protéines sont multiples. Classiquement, elles étaient considérées comme des facteurs impliqués dans la répression de l'épissage, à l'opposé des protéines SR. Ainsi, hnRNPA1 peut se lier à des séquences inhibitrices d'épissage (ESS) dans l'exon 3 de TAT et empêcher ainsi la fixation des protéines U1-70K et U2AF35, ce qui conduit à l'exclusion de cet exon (Zhu *et al.*, 2001). De même, les protéines hnRNP I (PTB), F et H

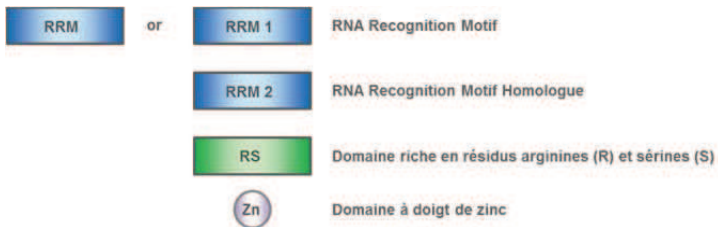
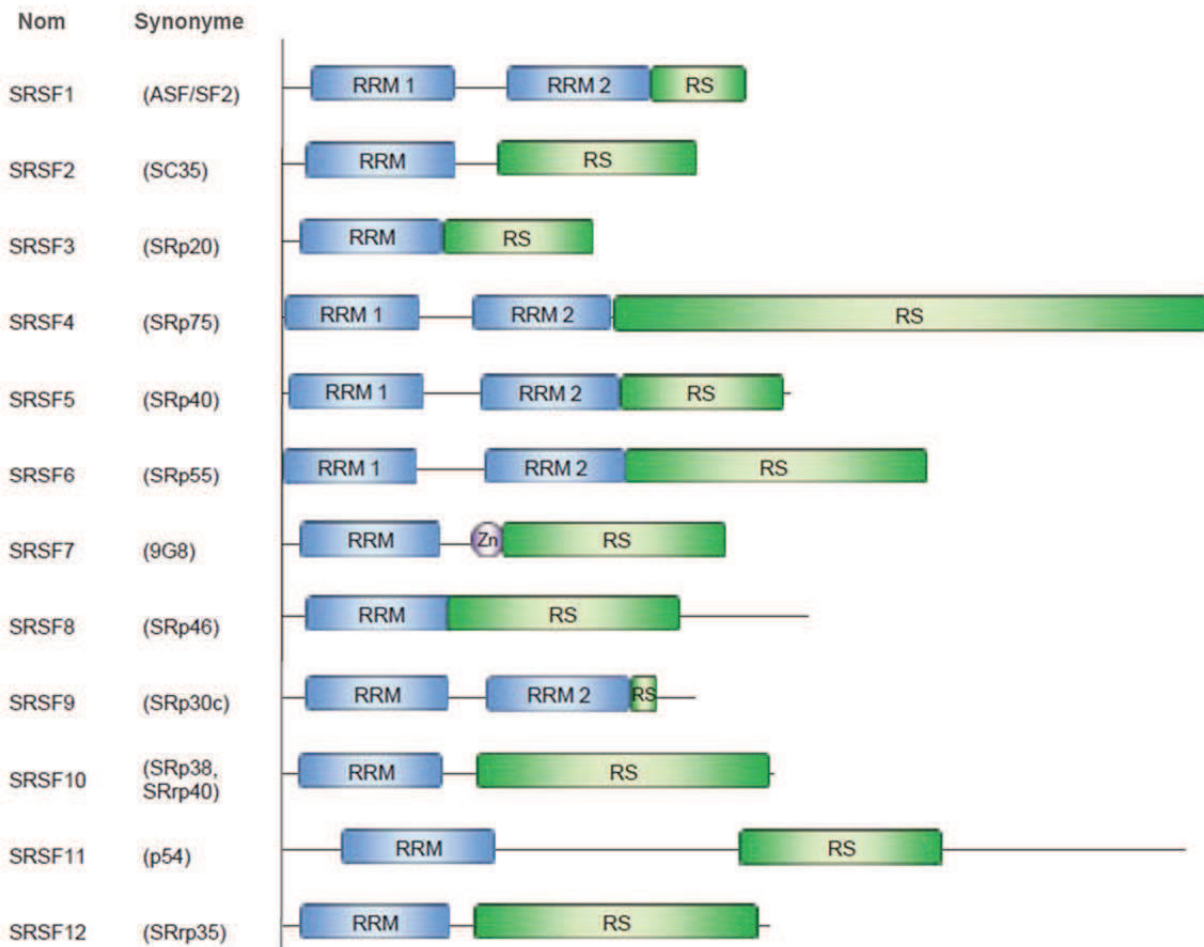


Figure 22 : Organisation structurale des protéines SR.

(adaptée de Twyffel, et al., 2011)

peuvent aussi se lier à des séquences inhibitrices introniques (ISS) et favoriser l'exclusion d'un exon (Martinez-Contreras *et al.*, 2006). Cependant, plusieurs études ont montré qu'elles peuvent être impliquées dans l'activation d'un exon (Chou *et al.*, 1999 ; Han *et al.*, 2010). Il est à noter que les protéines hnRNP se lient à des motifs ARN souvent dégénérés, qui peuvent être reconnus par d'autres protéines hnRNP ou SR, conduisant ainsi à une compétition entre ces protéines pour se lier aux mêmes séquences.

Enfin, les protéines hnRNP (hnRNP A, B, D, E, K, F, H, I, L, Q, et R) régulent aussi la stabilité, la polyadénylation, l'export, le transport et la traduction des ARNm (LaBranche *et al.*, 1998 ; Guang *et al.*, 2005 ; Zhang *et al.*, 2006).

2.2.3.2. Les protéines SR

En 1990, les équipes de Adrian Krainer et James Manley identifient la protéine ASF/SF2, conduisant ainsi à la mise en évidence d'une nouvelle famille de protéines régulant l'épissage : les protéines SR (Krainer *et al.*, 1990 ; Ge and Manley, 1990). Ces protéines possèdent un ou plusieurs domaines de liaison à l'ARN et un domaine RS, riche en arginine et Sérine, et sont divisées en deux sous-groupes : les protéines SR, dites classiques, et les protéines SR-Like (Long and Caceres, 2009).

Les protéines SR possèdent en commun (1) une organisation de leurs domaines, (2) un rôle dans l'épissage constitutif et alternatif, (3) un phospho-épitope identique au niveau du domaine RS reconnu par l'anticorps mAb104 et (4) la particularité d'être hautement solubles dans le sulfate d'ammonium à 50-60% de saturation mais insolubles dans le chlorure de magnésium à 20 mM (Long and Caceres, 2009). Chez l'homme, cette famille de protéines est constituée de 12 membres ([figure 22](#)).

Ces protéines comportent classiquement un ou de deux domaines de liaison à l'ARN de type RRM (« RNA Recognition Motif »), et un domaine de liaison aux protéines (domaine SR), contenant plus de 40% de di-peptides arginine-sérine (Manley and Krainer, 2010).

Le domaine RRM de liaison à l'ARN est caractérisé par une topologie de type $\beta 1\alpha 1\beta 2\beta 3\alpha 2\beta 4$ (4 feuillets β anti parallèles et 2 hélices α perpendiculaires l'une à l'autre). Il possède au niveau des brins $\beta 1$ et $\beta 3$ deux motifs conservés RNP1 et RNP2 qui incluent les résidus aromatiques phénylalanine (F) et tyrosine (Y) (Cléry *et al.*, 2008). Au sein de ce motif, l'ARN adopte une structure spécifique qui dépend des résidus du domaine RRM, expliquant ainsi comment le domaine RRM d'une protéine SR donnée est capable de reconnaître spécifiquement un ensemble de séquences dégénérées.

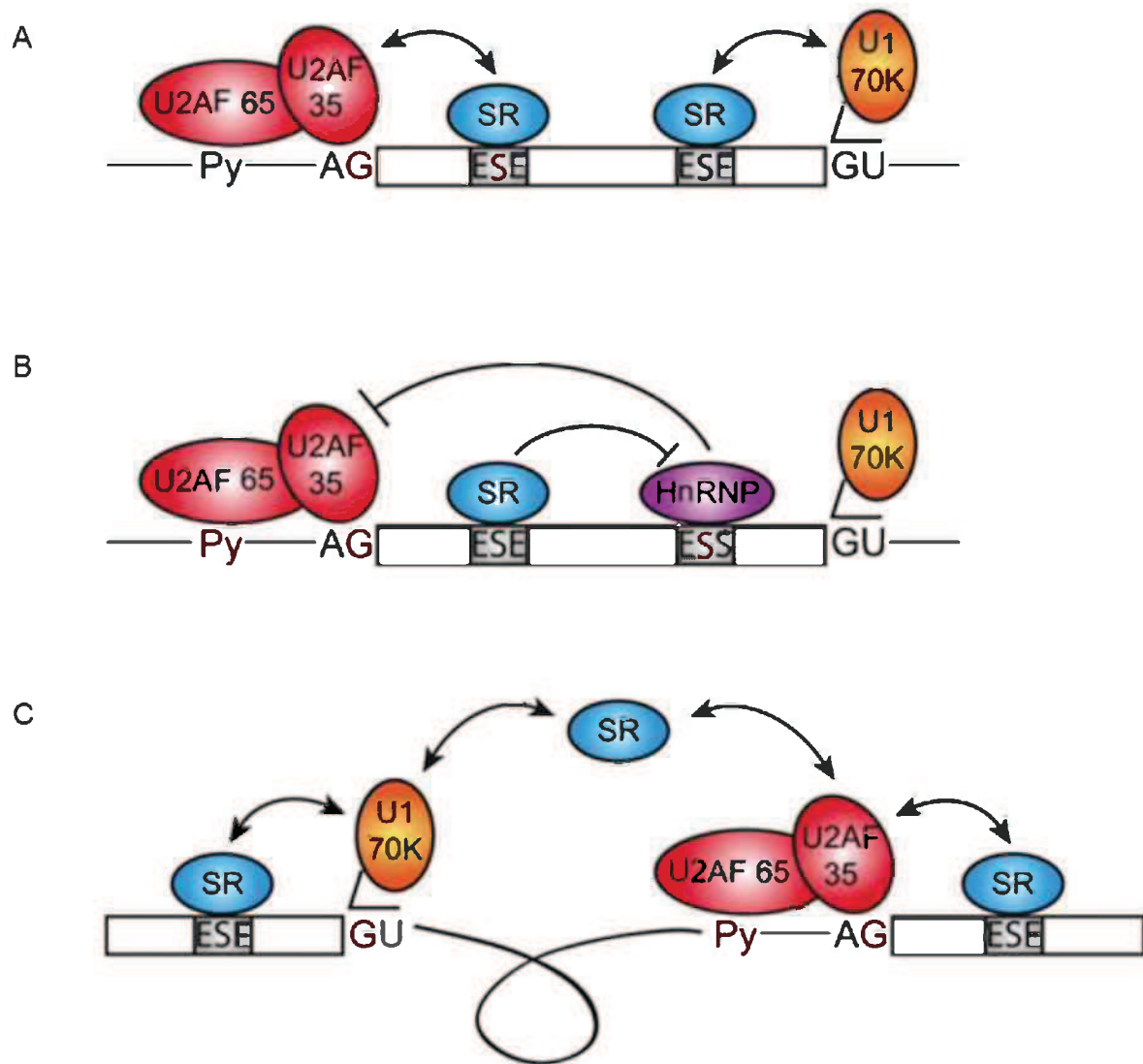


Figure 23 : Rôles des protéines SR dans la sélection des sites d'épissage.

(Long and Caceres, 2009)

A. Définition de l'exon: les protéines SR se fixent aux éléments activateurs d'épissage exoniques (ESE), recrutent snRNP U1 et U2AF65 et stabilisent les interactions entre snRNP U1 et le site 5' d'épissage et celles de U2AF65 et le site 3' d'épissage.

B. Inhibition des protéines hnRNP : les protéines SR se fixent aux éléments ESE et empêchent la liaison des protéines hnRNP aux éléments inhibiteurs d'épissage exoniques (ESS) favorisant ainsi l'utilisation des sites d'épissage.

C. Les protéines SR forment un réseau via leur domaine RS, d'interaction protéine-protéine, permettant de juxtaposer les sites 5' et 3' d'épissage.

Enfin, certaines protéines SR possèdent un second domaine RRM composé de différents acides aminés aussi nommé pseudo-RRM de fonction inconnue. Récemment, l'équipe du Dr Allain a mis en évidence que le domaine pseudo-RRM de ASF/SF2 a un rôle régulateur de l'épissage (Cléry *et al.*, 2013).

Le domaine RS, riche en arginine et sérine, permet des interactions protéine-protéine, et notamment avec le domaine SR d'autres protéines (Wu and Maniatis, 1993). Les protéines SR sont capables d'interagir entre elles, ou avec le domaine RS des protéines « SR-like » comme U2AF et U1-70K. Ainsi, les protéines SR peuvent se lier, *via* leur domaine RRM, à des séquences exoniques de type « ESE » et recruter, *via* leur domaine RS, les protéines U2AF35 et U1-70K (figure 23A). Ces interactions permettent alors de stabiliser la fixation de la snRNP U1 sur le site 5' d'épissage et la fixation de la sous-unité U2AF35 sur le site 3' d'épissage, conduisant ainsi à la reconnaissance et donc à l'inclusion de l'exon (Singh and Valcarcel, 2005). La liaison de ces protéines SR peut aussi inhiber la fixation de protéines hnRNP à des séquences ESS, et ainsi prévenir la fixation d'un inhibiteur de l'épissage (figure 23B). Les interactions des protéines SR entre elles ainsi qu'avec les protéines U2AF et U1-70K permettent la juxtaposition des sites 5' et 3' d'épissage (figure 23C).

Enfin, la phosphorylation des protéines SR au niveau de leurs résidus sérines influence l'activité et la localisation de ces protéines (Long and Caceres, 2009). Pour exemple, la phosphorylation des domaines RS de ASF/SF2 et SC35 par la protéine kinase SRPK1 (SR Protein Kinase) conduit à l'import de ces protéines SR au sein du noyau, et favorise l'interaction du domaine RRM avec l'ARN (Lin *et al.*, 2005 ; Cho *et al.*, 2011).

A côté de ces protéines SR classiques, il existe des protéines dites « SR-Like », qui possèdent, elles aussi, un domaine RS et peuvent jouer un rôle de régulation dans l'épissage, la transcription et/ou le remodelage de la chromatine (Boucher *et al.*, 2001). Toutefois, ces protéines « SR-Like » qui ne possèdent pas toujours un domaine RRM, ne sont pas systématiquement reconnues par l'anticorps mAb104 et ne sont pas particulièrement solubles en sulfate d'ammonium. Parmi ces protéines, on retrouve les protéines U2AF65 et U2AF35, la protéine U1-70K de la snRNP U1, les co-activateurs d'épissage SRm160 et SRm300, et les protéines TRA2 α et TRA2 β (Dauwalder *et al.*, 1996 ; Beil *et al.*, 1997 ; Blencowe *et al.*, 1999) (figure 24).

Lors de ma thèse, j'ai étudié l'implication de TRA2- β dans la régulation de la biogenèse de miARNs spécifiques. Je vais donc présenter succinctement cette protéine.

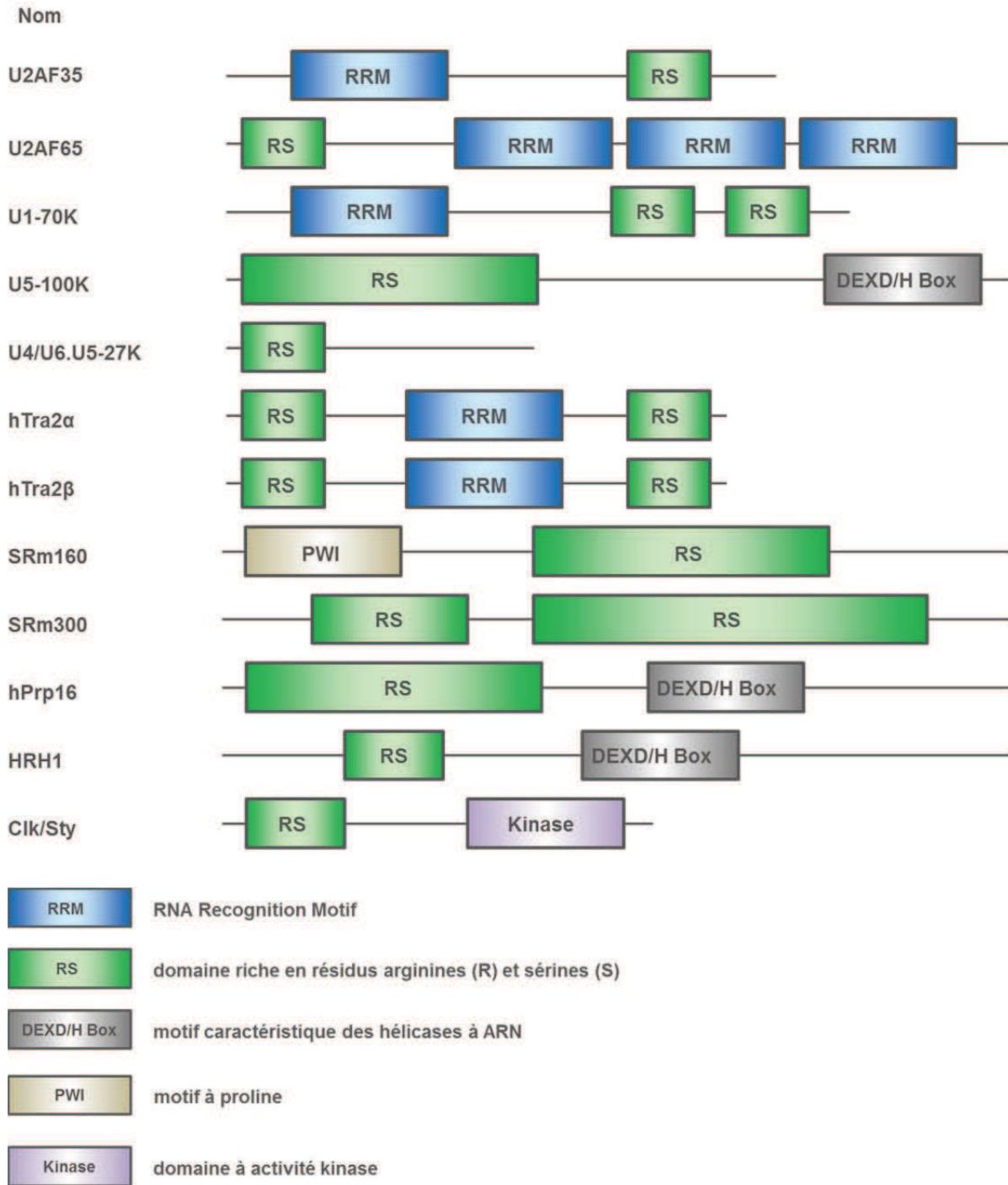


Figure 24 : Organisation structurale des protéines SR-like.
(adaptée de Long and Caceres, 2009)

TRA2- β , qui est codé par le gène *SFRS10*, est constitué de deux domaines RS entourant un domaine RRM. Cette protéine est l'orthologue humain de Tra2, un facteur d'épissage qui régule la détermination sexuelle de la drosophile (Dauwalder *et al.*, 1996 ; Nayler *et al.*, 1998). Enfin, TRA2- β est un régulateur de l'épissage alternatif qui reconnaît un motif ARN de séquence AGAA (Stoilov *et al.*, 2004 ; Cléry *et al.*, 2011).

Ainsi, TRA2- β 1 régule positivement l'inclusion de l'exon 10 de *MAPT*, codant pour la protéine TAU (Jiang *et al.*, 2003). Chez des patients FTDP-17 (« démences frontotemporales avec syndrome parkinsonien liées au chromosome 17 »), la délétion de trois nucléotides génère un site sous-optimal qui n'est plus reconnu par TRA2- β , ce qui conduit à l'exclusion de cet exon et donc à une protéine TAU altérée.

Enfin, la liaison de TRA2- β à un motif AGAA situé dans l'exon 7 du gène *SMN2* stimule l'inclusion de cet exon (Cléry *et al.*, 2011). Cette régulation est importante car la perte du gène *SMN1* (Survival Motor Neuron 1) conduit chez l'homme à une amyotrophie spinale (SMA=Spinal Muscular Atrophy). Il existe un paralogue de *SMN1*, *SMN2*, mais qui ne peut pas compenser la perte de *SMN1* suite à un changement de nucléotide (C->T) dans l'exon 7 de *SMN2*. Cette simple modification de séquence entre *SMN1* et *SMN2* altère une séquence activatrice d'épissage (ESE) dans *SMN2*, conduisant à l'exclusion de l'exon 7 et donc à la production d'une protéine *SMN2* tronquée non active (Pellizzoni *et al.*, 1999 ; Hofmann *et al.*, 2002 ; Young *et al.*, 2002). TRA2- β étant capable de réguler l'inclusion de l'exon 7 de *SMN2*, il constitue donc une cible thérapeutique potentielle.

2.2.3.3. Les protéines régulatrices non SR et non hnRNP

Enfin, il existe un grand nombre de protéines régulant l'épissage alternatif qui ne sont ni classées dans la famille des protéines SR, ni dans le groupe des hnRNP. Durant ma thèse, j'ai étudié l'implication de plusieurs de ces facteurs d'épissage alternatif dans des maladies à gain de fonction d'ARN. Je décris succinctement ces protéines (NOVA, RBFOX, MBNL et CUGBP) ci-dessous.

- Les protéines de la famille NOVA

En 1996, l'équipe de Robert Darnell a identifié NOVA-1 (Neuro-Oncological Ventral Antigen-1) comme un auto-antigène présent chez des patients atteints de maladies neurologiques néoplasiques (POMA « Paraneoplastic psOclonus Myoclonus Syndrome »)

(Buckanovich *et al.*, 1993 ; Darnell, 1996). Rapidement, NOVA-1, et son paralogue NOVA-2, sont apparus comme des facteurs d'épissage spécifiques des neurones (Buckanovich *et al.*, 1996 ; Buckanovich *et al.*, 1997 ; Yang *et al.*, 1998).

NOVA-1 et NOVA-2 possèdent trois domaines de liaison à l'ARN de type KH (« hnRNP K Homology ») qui reconnaissent un motif ARN de séquence YCAY (Y : pyrimidine) (Lewis *et al.*, 1999; Jensen *et al.*, 2000 ; Teplova *et al.*, 2011). La mise au point d'une technique d'immunoprécipitation de la protéine NOVA-1 liée à ses ARNs par pontage aux UV appelée CLIP (« crosslinking and immunoprecipitation of in vivo RNA targets of RNA-binding proteins ») a été fondatrice et a permis pour la première fois d'identifier l'ensemble des cibles endogènes d'une protéine de liaison à l'ARN (Ule *et al.*, 2003 ; Ule *et al.*, 2006). Parmi ces cibles, les protéines NOVA régulent l'épissage alternatif des exons Z de l'agrine (Ruggiu *et al.*, 2009), de l'exon 3A du récepteur à glycine GlyR α 2 (Polydorides *et al.*, 2000), de l'inclusion de l'exon 24a et de l'exclusion de l'exon 31a des canaux calciques Ca $_v$ 2.1 et Ca $_v$ 2.2 (Allen *et al.*, 2010) et de l'exon 9 du récepteur gamma2 au GABA(A) (Dredge *et al.*, 2003). Ces études à grande échelle ont permis de déterminer que les effets activateurs et inhibiteurs de NOVA-1 et NOVA-2 sur l'épissage dépendent de la localisation du site de fixation de NOVA sur l'ARN pré-messager. Ainsi, les protéines NOVA induisent l'inclusion de l'exon cible lorsqu'elles se fixent en aval de cet exon. Au contraire, les protéines NOVA inhibent l'inclusion de leur exon cible lorsqu'elles se fixent en amont de cet exon (Ule *et al.*, 2006). De plus, les protéines NOVA peuvent réguler l'expression d'un ARNm spécifique. En effet, l'inclusion, régulée par NOVA-1, d'un exon cassette contenant des codons d'arrêt prématurés dans un ARNm conduit à la dégradation de cet ARNm par le mécanisme de surveillance des ARNs (NMD « Nonsense-Mediated mRNA Decay ») (Eom *et al.*, 2013).

Enfin, des souris invalidées pour le gène *Nova-1* meurent deux semaines après leur naissance suite à une dégénérescence du tronc cérébral indiquant que *Nova-1* est indispensable à la survie neuronale lors du développement post-natal (Jensen *et al.*, 2000). La double invalidation de *Nova-1* et *Nova-2* chez la souris conduit à la mort des souris à la naissance montrant ainsi en partie le rôle redondant de NOVA-1 et NOVA-2 (Ruggiu *et al.*, 2009).

- Les protéines de la famille RBFOX

La protéine Fox-1 (Feminizing Locus On X 1) a été initialement découverte chez *C. elegans* comme étant un gène impliqué dans la détermination sexuelle (Hodgkin *et al.*, 1994). Chez l'homme, cette famille est composée de trois membres : RBFOX1, aussi appelé A2BP1 (Ataxin-2 Binding Protein 1), RBFOX2, aussi appelé RBM9 (RNA Bindind Motif protein 9) et RBFOX3, aussi appelé NeuN. RBFOX3 est exprimé spécifiquement dans les neurones (Tang *et al.*, 2009). RBFOX1 est détecté dans le cerveau, les muscles squelettiques et le cœur (Shibata *et al.*, 2000 ; Jin *et al.*, 2003), alors que RBFOX2 est exprimé dans la plupart des tissus (Underwood *et al.*, 2005 ; Baraniak *et al.*, 2006 ; Yeo *et al.*, 2009). Il est aussi à noter que des isoformes de RBFOX1 et RBFOX2 dont le domaine RRM est délété (FOX1 Δ RRM ; FOX2 Δ RRM) ont été identifiées dans les muscles et le cœur (Nakahata *et al.*, 2005 ; Yang *et al.*, 2008 ; Damianov *et al.*, 2010). Enfin, l'expression de RBFOX1 augmente fortement au cours de la différenciation des cellules musculaires et cardiaques (Kalsotra *et al.*, 2008).

Ces trois protéines possèdent une structure similaire, avec un domaine central de liaison aux ARNs de type RRM et un signal de localisation nucléaire (NLS) hydrophobique de type PY (proline, tyrosine) localisé à l'extrémité C-terminale (Nakahata *et al.*, 2005). Les protéines RBFOX lient spécifiquement le motif ARN de séquence YGCAUG (Ponthier *et al.*, 2006 ; Auweter *et al.*, 2006). Ce motif UGCAUG est enrichi à proximité d'exons cassettes de gènes musculaires et neuronaux (Minovitsky *et al.*, 2005 ; Brudno *et al.*, 2009). Tout comme les protéines NOVA, des expériences de CLIP montrent que les protéines RBFOX activent ou répriment l'inclusion d'exons alternatifs suivant la position de leur site de fixation. En effet, les protéines RBFOX inhibent l'inclusion d'un exon lorsqu'elles se lient en amont de celui-ci. Au contraire, les protéines RBFOX activent l'inclusion d'un exon quand elles se fixent en aval de cet exon (Zhang *et al.*, 2008 ; Venable *et al.*, 2009 ; Sun *et al.*, 2012). Parmi ces exons, on peut noter l'exon 18 du canal Na_v1.6 (Zubovic *et al.*, 2012), l'exon 9 de la sous-unité gamma de l'ATP synthetase (Hayakawa *et al.*, 2002), l'exon N1 du gène c-src (Underwood *et al.*, 2005), les exons 9 et 33 du canal Ca_v1.2 (Tang *et al.*, 2009), et l'exon 16 de la protéine 4.1R (Ponthier *et al.*, 2006 ; Yang *et al.*, 2008). Enfin l'inactivation des gènes *Rbox1* et *Rbfox2* spécifiquement dans le cerveau de souris conduit à une dégénérescence des motoneurones et des cellules de Purkinje (Gehman *et al.*, 2011 ; Gehman *et al.*, 2012), démontrant ainsi l'importance de ces facteurs d'épissage dans la survie de ces neurones.

- Les protéines de la famille CELF

En 1996, a été découverte la protéine CUGBP1, premier membre de la famille CELF (« CUGBP and ETR-3 Like Factor »), aussi appelée Bruno-like (Timchenko *et al.*, 1996 ; Good *et al.*, 2000 ; Ladd *et al.*, 2001). Cette famille est composée de six membres CELF1 (CUGBP1), CELF2 (CUGBP2/ETR3/NAPOR), CELF3, CELF4, CELF5 et CELF6.

De nombreuses études montrent que CELF1 est exprimé de manière ubiquitaire avec une expression plus forte dans le cœur, les muscles squelettiques et le cerveau. Au contraire, ETR3 (CELF2) est spécifiquement exprimée dans le cœur, les muscles squelettiques et le cerveau. De plus, l'expression d'ETR3 augmente fortement au cours de la différenciation des cellules musculaires ou neuronales. Les protéines CELF3, -4, -5 et -6 sont, elles, spécifiquement exprimées dans le système nerveux (Lu *et al.*, 1999 ; Ladd *et al.*, 2001 ; Levers *et al.*, 2002 ; Ladd *et al.*, 2004 ; Dasgupta *et al.*, 2013).

Les protéines CELF contiennent trois domaines de liaison à l'ARN de type RRM (deux en position N-terminale et un en C-terminale) (Timchenko *et al.*, 1999 ; Good *et al.*, 2000). Des expériences de SELEX (« Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment »), montrent que CUGBP1 et ETR3 lient des motifs ARN de type UGU (Faustino *et al.*, 2005 ; Marquis *et al.*, 2006). Ces données ont été confirmées par plusieurs études (Charlet *et al.*, 2002 ; Paillard *et al.*, 2002 ; Ho *et al.*, 2004 ; Vlasova *et al.*, 2008 ; Rattenbacher *et al.*, 2010 ; Sureau *et al.*, 2011), et la structure résolue en résonance magnétique nucléaire (RMN) confirme l'interaction spécifique de CUGBP1 avec un motif ARN de type UGUU (Teplova *et al.*, 2010 ; Edwards *et al.*, 2011).

Les protéines de la famille CELF interviennent dans de nombreux processus cellulaires tels que la régulation de l'épissage alternatif, l'édition des ARNs, la polyadénylation, la stabilité des ARNm et leur traduction. Ainsi, CUGBP1 régule l'inclusion de l'exon 5 de *hcTNT*, de l'exon 11 de *INSR*, de l'exon 6B de la β -tropomyosine et de l'exon 10 de *MAPT* (Philips *et al.*, 1998 ; Savkur *et al.*, 2001 ; Dhaenens *et al.*, 2011 ; Sureau *et al.*, 2011). CUGBP1 favorise aussi la déadénylation d'ARNm conduisant à leur dégradation dans le cytoplasme (Paillard *et al.*, 2003 ; Vlasova *et al.*, 2008 ; Rattenbacher *et al.*, 2010), tandis que CELF2/ETR3, en liant la région 3'UTR de l'ARNm *COX2*, le stabilise et inhibe sa traduction (Mukhopadhyay *et al.*, 2003). De plus, CUGBP1 régule la traduction de p21, CEBPB, de la cycline A2 et de p27Kip1 (Iakova *et al.*, 2004 ; Timchenko *et al.*, 2006 ; Horb *et al.*, 2010 ; Zheng *et al.*, 2011).

Comme nous l'avons vu dans le chapitre consacré aux dystrophies myotoniques, CUGBP1 est phosphorylée par la PKC (« Protein Kinase C») ce qui entraîne une augmentation de sa demi-vie dans des modèles cellulaires ou murins de DM (Kuyumuku-Martinez *et al.*, 2007). Toutefois, le mécanisme d'activation de la PKC par les répétitions CUG reste mal compris, et il est possible que cette activation soit un artefact dû à des constructions contenant des répétitions CUG interrompues (DT960) (Gwendal Dujardin, communication personnelle).

Enfin, les souris invalidées pour le gène *Celf1* montrent un grand taux de mortalité, un retard de croissance et des défauts de spermatogenèse suggérant un rôle crucial de CUGBP1 dans une variété de processus cellulaires (Kress *et al.*, 2007).

- Les protéines de la famille MBNL

La famille de protéines humaines MBNL (MuscleBlind-Like) est composée de trois paralogues, MBNL1, MBNL2 et MBNL3. Ces protéines sont les orthologues de la protéine Muscleblind (Mbl), découverte chez la drosophile comme étant impliqué dans la différenciation des photorécepteurs et des muscles (Begemann *et al.*, 1997 ; Artero *et al.*, 1998). Chez l'homme et la souris, MBNL1 est principalement exprimée dans les muscles squelettiques, le cœur et plus faiblement dans le cerveau. Lors du développement du muscle squelettique, son expression augmente et sa localisation subcellulaire est tout d'abord cytoplasmique puis devient majoritairement nucléaire (Lin *et al.*, 2006). Enfin, l'épissage alternatif de *MBNL1* donne naissance à 8 isoformes de tailles comprises entre 35 et 43 kDa, dont les expressions sont régulées selon le type tissulaire et le stade de développement (Kino *et al.*, 2004 ; Tran *et al.*, 2011). MBNL2 est, quant à elle, principalement exprimée dans le cerveau et le cœur, et plus faiblement dans le muscle squelettique. MBNL3 est principalement exprimée dans le placenta et lors du développement (Fardaei *et al.*, 2002). De plus, alors que l'expression de MBNL1 et MBNL2 augmente au cours du développement, celle de MBNL3 diminue (Kanadia *et al.*, 2003b).

Les protéines MBNL contiennent, à l'extrémité N-terminale, quatre domaines à doigts de zinc de type CCCH (3 cystéines et 1 histidine) organisés en deux couples de CX₇CX₆CX₃H (X : acide aminé) et de type CX₇CX₄CX₃H (Miller *et al.*, 2000). Ces couples de doigts de zinc sont hautement conservés du nématode à l'homme, suggérant que la présence du second couple proviendrait d'une duplication en tandem d'un couple de doigts de zinc de type CX₇CX₆CX₃H + CX₇CX₄CX₃H au cours de l'évolution (Pascual *et al.*, 2006). L'analyse de la

structure cristallographique des domaines à doigts de zinc Znf3 et Znf4 révèle que ces doigts de zinc présentent leurs surfaces d'interaction à l'ARN en miroir, et lient deux chaînes d'ARN simple brin orientés de façon anti-parallèle (Teplova and Patel, 2008). Ainsi, Znf3 et Znf4 lient respectivement le tri-nucléotide YGC simple brin et le tétra-nucléotide YGCU simple brin. Chacun des doigts de zinc de MBNL1 reconnaît donc un motif de type UGC ou CGC, ainsi chaque molécule de MBNL1 peut reconnaître quatre motifs YGC. Ces motifs sont retrouvés dans les ARNs pré-messagers dont l'épissage alternatif est régulé par MBNL1 (Ho *et al.*, 2004 ; Yuan *et al.*, 2007 ; Warf *et al.*, 2009a ; Goers *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2012). Un signal de localisation nucléaire (NLS), codé par l'exon 5, est présent en aval des doigts de zinc (Lin *et al.*, 2006 ; Fernandez-Costa *et al.*, 2010 ; Terenzi *et al.*, 2010 ; Tran *et al.*, 2011). De plus, l'exon situé entre les deux couples de doigts de zinc, et dont l'inclusion est régulée par épissage alternatif, module l'affinité de la liaison de MBNL1 à ses ARNs cibles (Kino *et al.*, 2004 ; Teplova and Patel., 2008 ; Tran *et al.*, 2011). Les trois protéines MBNL contiennent également des sites de phosphorylation pour CK2 (« Caseine Kinase 2 ») et PKC (« Protein Kinase C ») conservés au niveau des doigts de zinc (Kino *et al.*, 2004 ; Trembley *et al.*, 2005 ; Monferrer and Artero, 2006).

Concernant l'implication des membres de la famille MBNL dans les dystrophies myotoniques, leur rôle dans les altérations de l'épissage alternatif est maintenant bien caractérisé. En effet, chez les patients atteints de DM, les répétitions CUG et CCUG, qui contiennent autant de motif UGC reconnus par MBNL, séquestrent ces protéines et conduisent à la perte de protéines MBNL libres, ce qui entraîne des défauts d'épissage alternatif des transcrits régulés par MBNL et les symptômes des dystrophies myotoniques (Ho *et al.*, 2004 ; Lin *et al.*, 2006 ; Warf and Berglund, 2007 ; Yuan *et al.*, 2007 ; Kino *et al.*, 2009 ; Fleming *et al.*, 2012 ; Gooding *et al.*, 2013). Il est intéressant de noter que l'hélicase à ARN p68 augmente l'affinité de MBNL pour les répétitions CUG, suggérant ainsi qu'elle pourrait entraîner des changements structuraux des ARNs contenant de longues répétitions CUG et promouvoir leur interaction avec MBNL1 (Laurent *et al.*, 2012). Enfin, et comme vu précédemment dans la partie consacrée aux dystrophies myotoniques, des souris invalidées pour *Mbnl1* (*Mbnl1*^{-/-}) ou *Mbnl2* (*Mbnl2*^{-/-}) reproduisent la plupart des symptômes musculaires, oculaires et neuronaux des DM, confirmant ainsi le rôle important de la perte de fonction des protéines MBNL dans la pathogenèse des DM (Kanadia *et al.*, 2003 ; Martynia *et al.*, 2010 ; Charizanis *et al.*, 2012).

Plus récemment, des expériences de HIT-CLIP montrent que, comme pour les protéines NOVA ou RBFOX, la localisation du site de liaison des protéines MBNL

conditionne le type de régulation. Les protéines MBNL sont activatrices de l'inclusion d'un exon quand elles se fixent en aval de cet exon ; au contraire, elles sont répressives quand elles se fixent en amont de cet exon (Charizanis *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2012 ; Han *et al.*, 2013). De plus, ces expériences démontrent que 50% des cibles de MBNL1, MBNL2 et MBNL3 sont situées dans des régions 3'UTR d'ARNm suggérant que ces protéines régulent aussi la stabilité, la localisation ou la traduction d'ARNm (Licatalosi *et al.*, 2008 ; Xue *et al.*, 2009 ; Charizanis *et al.*, 2012 ; Masuda *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2012 ; Poulos *et al.*, 2013). Ce rôle a été initialement proposé dans une étude démontrant que MBNL2 était capable de lier la région 3'UTR de l'ARNm de l'intégrine $\alpha 3$ et de favoriser sa localisation et sa traduction (Adereth *et al.*, 2005).

Enfin, des expériences à partir de cellules iPS ont mis en évidence le rôle crucial des protéines MBNL dans la répression de l'épissage alternatif spécifique aux cellules non différenciées (Han *et al.*, 2013). Ainsi, la surexpression de MBNL1 induit la différenciation des cellules iPS en modifiant entre autre l'épissage du facteur de totipotence FOXP1 (Han *et al.*, 2013). Il reste toutefois à déterminer si cette nouvelle fonction des protéines MBNL est importante dans la dystrophie myotonique, notamment pour sa forme congénitale.

CHAPITRE III :

Les miARNs, SCN5A et le cœur

Dans le chapitre I, j'ai présenté brièvement les « propriétés générales du cœur » ainsi que les symptômes cardiaques des patients atteints de DM. Dans ce chapitre III, je présenterai plus en détail la structure et les fonctions des différents composants du cœur, puis j'aborderai les rôles de régulateurs cardiaques des miARNs. Enfin, je présenterai le rôle incontournable du canal sodique $Na_v1.5$ (*SCN5A*) dans la contraction du tissu cardiaque.

1. Le cœur a ses fonctions que les expansions ignorent

1.1. Les fonctions et régulations cardiaques

1.1.1. Structure du cœur

Le cœur est un organe musculaire creux comportant 4 cavités : les oreillettes gauche et droite et les ventricules gauche et droit qui sont reliés par des valves. Le cœur est divisé en deux par un mur musculaire épais, le septum auriculo-ventriculaire, empêchant le sang de passer du cœur droit dit veineux au cœur gauche dit artériel. De façon ordonnée et séquentielle, l'ouverture et la fermeture de ces valves permettent un passage unidirectionnel du sang depuis les oreillettes vers les ventricules. L'expulsion du sang vers les organes ou les poumons se fait respectivement grâce aux valves aortique et pulmonaire.

Le cœur est un organe musculaire intra-thoracique constitué de 3 structures : l'endocarde, qui est une mince membrane endothéliale qui tapisse la face interne du myocarde, l'épicarde, qui est une membrane séreuse de tissu conjonctif formant la couche externe du cœur, et le myocarde, qui est la partie musculaire active du cœur et qui est constitué de trois types cellulaires : les cellules musculaires myocardiques, les cellules nodales et les cellules endocrines.

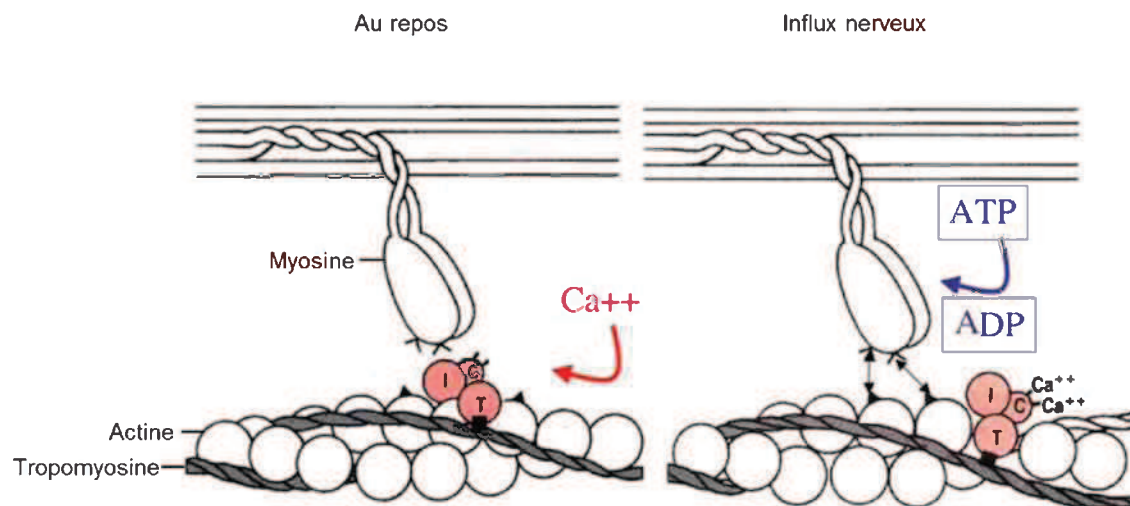


Figure 25 : Modèle du fonctionnement de la contraction musculaire.

Au repos, la tropomyosine, protéine fibreuse liée à la troponine, cache le site de fixation de la tête de myosine sur l'actine. Lorsque l'influx nerveux arrive au muscle, des ions calcium pénètrent dans les cellules musculaires et se fixent sur la troponine (trois sous-unités en rose I : inhibitrice ; T : liée à la tropomyosine ; C : liant le calcium) qui change de conformation et déplace la tropomyosine. Le site de fixation de la myosine est libéré et peut se fixer à l'actine. Grâce à l'ATP, la tête de myosine tourne et entraîne avec elle le filament d'actine. Les deux filaments coulissent l'un sur l'autre et la myofibrille raccourcit. Lorsque ce phénomène se produit dans toutes les fibres musculaires simultanément, le muscle se contracte. Puis les ions calcium ressortent de la cellule et le muscle se relâche.

1.1.2. Les différents types de cellules cardiaques

1.1.2.1. Les cellules contractiles

Les cellules musculaires cardiaques, ou cardiomyocytes, sont des cellules striées riches en mitochondries et ne possèdent qu'un seul noyau. Elles constituent des fibres allongées, ramifiées et présentent des bandes transversales identiques aux cellules musculaires striées. Ces cellules sont soudées les unes aux autres grâce aux disques intercalaires et forment un syncytium grâce aux jonctions communicantes, permettant ainsi la transmission du potentiel d'action et la contraction musculaire.

Le sarcomère cardiaque a une structure similaire au sarcomère strié du muscle squelettique, et est constitué de deux types de filaments : fins et épais. Les filaments épais sont composés de plusieurs centaines de molécules de myosine, constituées de chaînes lourdes et chaînes légères. Les dimères de chaînes lourdes, longues de 2 000 acides aminés, présentent des extrémités C-terminales en hélice α surenroulée, ce qui confère à la myosine une forme rigide en bâtonnet de 180 nm, et des extrémités N-terminales de 190 acides aminés, qui constituent les domaines moteurs portant l'activité ATPasique et forment deux têtes globulaires responsables de l'interaction avec l'actine (figure 25). Les deux chaînes lourdes sont stabilisées par deux paires de chaînes légères : une paire de chaînes légères dites essentielles (ELC) et une paire de chaînes légères dites régulatrices (RLC), qui se fixent près du domaine N-terminal des chaînes lourdes.

Les filaments fins sont composés d'actine, de tropomyosine et de troponine. L'actine forme une double hélice stabilisée par des dimères de tropomyosine logés dans ses sillons. La troponine est constituée de trois sous unités: la troponine-T, la troponine-C et la troponine-I. La troponine-T interagit avec la tropomyosine, la troponine-C possède 4 sites de fixation au calcium et la troponine-I est la sous-unité responsable de l'inhibition de la liaison entre la myosine et l'actine. Une fois le calcium lié à la troponine-C, le complexe troponine-calcium se déplace et la troponine-I cesse d'empêcher la liaison entre la myosine et l'actine en démasquant le site de fixation de la myosine sur l'actine (figure 25).

Au sein des cardiomyocytes adultes, deux myosines cardiaques sont principalement exprimées. L' α -MHC (Myosin Heavy Chain), codée par le gène *MYH6* est une forme de myosine à activité ATPasique rapide. La β -MHC, codée par le gène *MYH7*, est une forme à activité ATPasique lente. Au niveau fœtal, la forme α -MHC est prédominante dans les ventricules tandis que la forme β -MHC est prédominante dans les oreillettes. Après la naissance, la forme β -MHC diminue (Morkin, 2000).

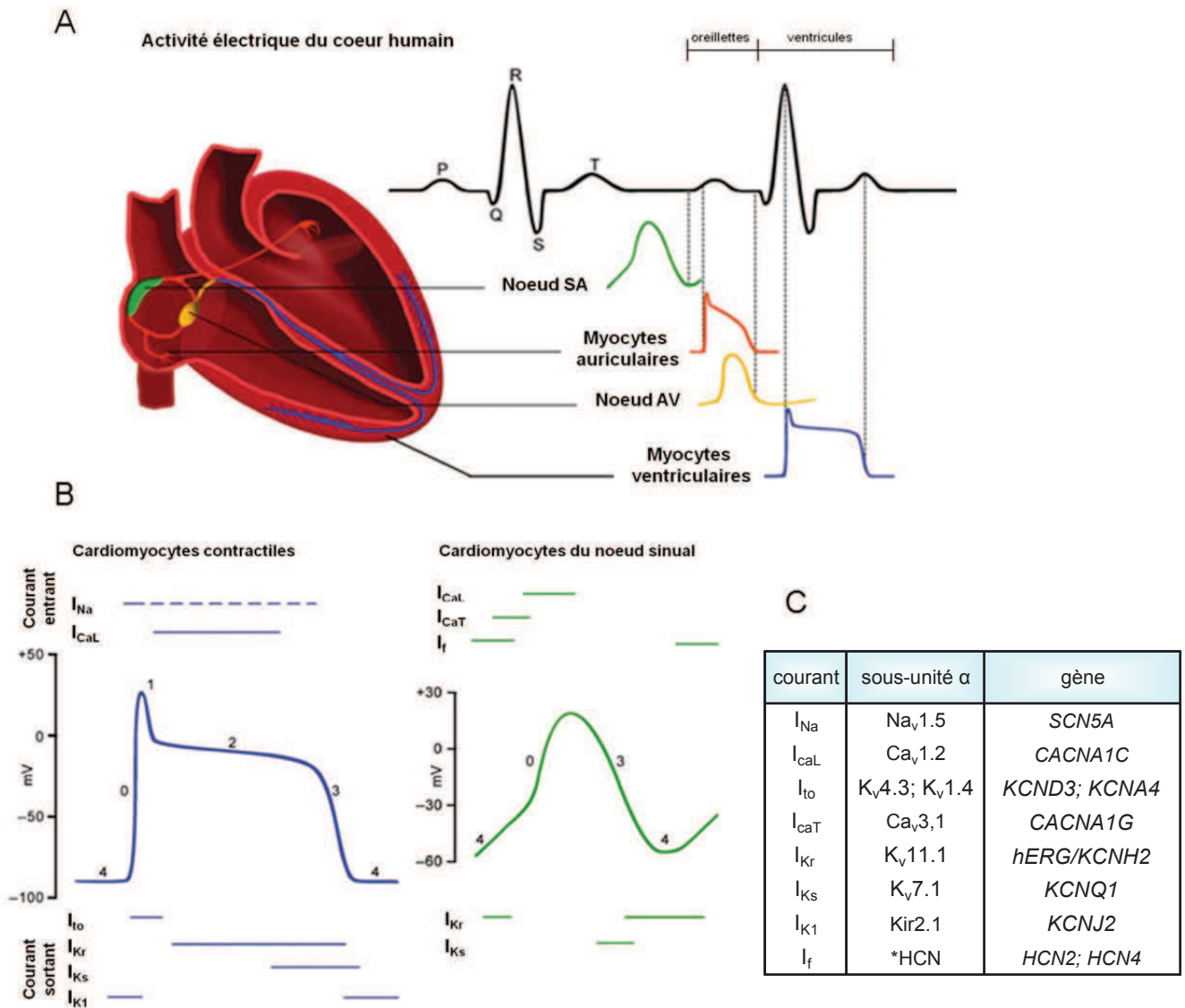


Figure 26 : Illustration de l'activité électrique du cœur humain.

(adapté de Sorensen et al., 2012)

A. Activité électrique cardiaque.

B. Potentiel d'action des cardiomyocytes et des cellules pacemaker. Les chiffres au-dessus des courbes de courants correspondent aux différentes phases du potentiel membranaire (0 : dépolarisation ; 1 : repolarisation initiale ; 2 : plateau ; 3 : repolarisation ; 4 : repos)

Nœud SA : Nœud Sinuso-Auriculaire ; Nœud AV : Nœud Auriculo-Ventriculaire

C. Tableau récapitulatif des canaux à l'origine des différents courants ioniques. L'astérisque devant HCN signifie que ce n'est pas une sous-unité alpha.

1.1.2.2. Les cellules pacemaker

Certaines cellules cardiaques sont capables de se contracter spontanément en l'absence de stimulation nerveuse : ce sont les cellules nodales appelées aussi cellules pacemaker. Elles ne contiennent que très peu de myofibrilles et sont donc peu contractiles. Ces cellules sont à l'origine de la contraction automatique du myocarde en initiant une impulsion électrique mais aussi en régulant le potentiel d'action. On distingue trois types de cellules nodales :

- Les cellules du nœud sinusal, génératrices du rythme cardiaque, sont situées à l'apex de l'oreillette droite.
- Les cellules du nœud auriculo-ventriculaire qui se terminent par les branches de His (faisceau de His). Le faisceau de His transmet les impulsions électriques des oreillettes aux ventricules.
- Les fibres de Purkinje qui sont les ramifications terminales des branches droite et gauche du faisceau de His, transmettent l'influx électrique aux ventricules et donc sont indispensables à la conduction cardiaque.

La dépolarisation spontanée de ces cellules nodales est le résultat de l'activité des canaux pacemaker HCN (« Hyperpolarization and Cyclic Nucleotide-gated channels »), qui génèrent un courant activé par l'hyperpolarisation de la membrane des cellules nodales.

1.1.3. Activité électrique des cellules cardiaques

1.1.3.1. L'activité électrique des cellules contractiles

L'excitabilité des cardiomyocytes est possible grâce à de nombreux canaux ioniques. En effet, le potentiel d'action (PA) est généré par des changements cycliques des courants ioniques entrant et sortant durant la dépolarisation (I_{Na} , I_{Ca}) et la repolarisation (I_K), respectivement. Cinq phases définissent le PA des cardiomyocytes auriculaires et ventriculaires (**figures 26A et 26B à gauche**). La phase de repos est caractérisée par un courant sortant (I_{K1}) d'ions potassiques (K^+) à travers les canaux à K^+ ($Kir2.1$, $KCNJ2$) grâce auquel le potentiel membranaire au repos est maintenu (phase 4). Quand un cardiomyocyte est excité par les cellules adjacentes, une dépolarisation initiale provoque l'ouverture des canaux à sodium voltage-dépendants, $Na_v1.5$ codé par le gène *SCN5A* (« Sodium Channel voltage gated type V Alpha subunit »). Ceci conduit à un courant entrant de sodium (I_{Na}) durant quelques millisecondes, ce qui initie le PA ascendant (phase 0). Cette dépolarisation de la membrane désactive rapidement la majorité des canaux $Na_v1.5$ et active les canaux

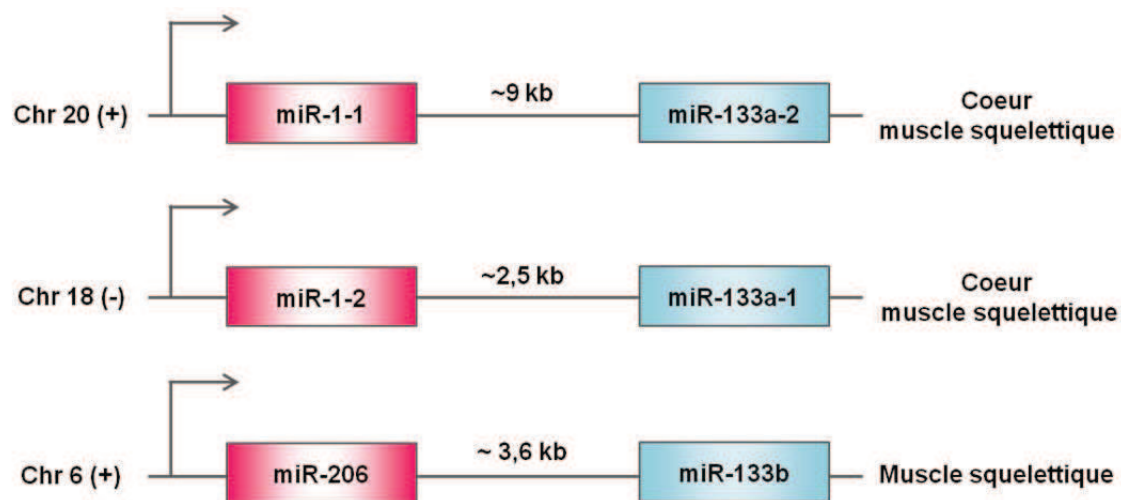
potassiques voltage-dépendant ($K_v1.4/KCNA4$; $K_v4.3/KCND3$; $K_v4.2/KCND2$), ce qui génère un rapide courant transitoire repolarisant (I_{to}) (phase 1). Une fraction de canaux $Na_v1.5$ montre une cinétique plus lente d'inactivation (100 à 200 ms), ces canaux restant actifs durant les phases 2 et 3 du PA. Ceci génère un courant persistant de Na^+ contribuant à maintenir le plateau observé dans la phase 2 du PA cardiaque. L'activation des canaux à calcium $Ca_v1.2$ (*CACNA1C*) permet l'entrée de Ca^{2+} (I_{CaL}). Elle est électriquement compensée par des sorties de K^+ très rapide, rapide, et lente (I_{Kur} , I_{Kr} , I_{Ks} , respectivement) qui résultent de l'activation respective des canaux à K^+ $K_v1.4$ (*KCNA4*), $K_v11.1$ (*hERG/KCNH2*), $K_v7.1$ (*KCNQ1*), se traduisant par un plateau dans le PA (phase 2). La fermeture des canaux calciques conduit à des courants sortants prédominants en K^+ , entraînant la repolarisation (phase 3). Enfin, la réinitialisation du courant I_{K1} passant par l'activation de *Kir2.1* (*KCNJ2*) conduit à un retour au potentiel de repos membranaire.

Notons que les canaux potassiques s'assemblent en tétramères pour être fonctionnels et des associations de canaux de familles différentes sont possibles telles que *KCND3* en complexe avec *KCNE1*, et *KCNJ2* (Amin *et al.*, 2010 ; Sorensen *et al.*, 2013).

Tous ces canaux sont à l'origine du potentiel d'action cardiaque et donc du rythme cardiaque (Wang *et al.*, 2008 ; Yang *et al.*, 2008). Ainsi, des mutations affectant ces différents canaux conduisent à des troubles électriques et à des arythmies qui seront présentés plus en détail dans la prochaine partie de ce chapitre. Enfin, l'expression de ces différents canaux est régulée par des miARNs spécifiques (Yang *et al.*, 2007).

1.1.3.2. L'activité électrique des cellules pacemaker

Contrairement aux cardiomyocytes auriculaires et ventriculaires, les cellules du nœud sinusal et du nœud auriculo-ventriculaire ne présentent pas de potentiel de repos stable. Cependant, elles montrent une lente dépolarisation caractéristique de leurs propriétés pacemaker (phase 4). Aucun courant I_{K1} n'apparaît, ce qui permet aux principaux canaux pacemaker cardiaques *HCN2* et *HCN4* perméables aux ions Na^+ et K^+ (« Hyperpolarization Cyclic-Nucleotide-gated channel ») de conduire un courant entrant nommé « funny » (I_f) dépolarisant lentement la membrane. Cette lente dépolarisation inhibe les canaux $Na_v1.5$ (*SCN5A*) d'une part, et active les canaux à Ca^{2+} de type L (lent), $Ca_v1.2$ (I_{CaL} , *CACNA1C*), et de type T (transitoire), $Ca_v3.1$ (I_{CaT} , *CACNA1G*) d'autre part (phase 0) (Grant *et al.*, 2009 ; Amin *et al.*, 2010 ; Sorensen *et al.*, 2013) (figure 26B, à droite).



miR-1-1	<u>UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU</u>	miR-133a-1	<u>UUUGGUCCCCU</u> CAACCAGCUG
miR-1-2	<u>UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU</u>	miR-133a-2	<u>UUUGGUCCCCU</u> CAACCAGCUG
miR-206	<u>UGGAAUGUAA</u> GGAAGUGUGUGG	miR-133b	<u>UUUGGUCCCCU</u> CAACCAGCUA

Figure 27 : Séquence et expression tissulaire des miARNs miR-1/206 et miR-133.

- A. Les gènes *miR-1-1/miR-133a-2*, *miR-1-2/miR-133a-1* et *miR-206/miR-133b* sont situés respectivement dans des unités bicistroniques au niveau des chromosomes 20, 18 et 6.
- B. Les séquences des miARNs appartenant à la même famille sont similaires. La région « seed », composée de 6 à 8 nucléotides localisés à l'extrémité 5' du miARN mature et qui permet le ciblage spécifique des ARNm, est identique.

1.1.4. La conduction cardiaque

Les cardiomyocytes ont la capacité de propager l'influx électrique qu'ils reçoivent à leurs voisins : ce phénomène se nomme la conduction cardiaque. Elle est possible grâce à la présence de jonctions communicantes, qui sont des groupes de canaux transmembranaires reliant directement les cytoplasmes de deux cellules voisines et assurant ainsi la communication intercellulaire. Au niveau cardiaque, les jonctions communicantes forment une voie laissant passer l'onde électrique excitatrice responsable des contractions synchronisées d'une cellule à une autre, permettant ainsi le couplage électrique entre les cardiomyocytes (Severs *et al.*, 2004a ; Severs *et al.*, 2004b). Dans le cœur, chaque jonction communicante est constituée de deux connexons (un par cellule), eux-mêmes composés de six molécules de connexines (Cx). Chez l'homme, les connexines forment une famille de 21 membres. Les cardiomyocytes humains expriment principalement la Cx43 (*GJA1*) au niveau des ventricules et la Cx40 (*GJA5*) et Cx43 au niveau des oreillettes (Severs *et al.*, 2001). Enfin, la Cx45 (*GJA7*) est détectée au nœud auriculo-ventriculaire.

2. Intervention musclée de 3 familles de miARNs cardiaques

Dans cette partie, je vais présenter l'importance de certains miARNs dans le développement et le fonctionnement du cœur. En effet, de nombreuses études ont révélé le rôle crucial de trois familles de miARNs « miR-1/miR-206 », « miR-133 » et « miR-208/499 », exprimées spécifiquement dans le cœur et le muscle squelettique (Kwon *et al.*, 2005 ; Zhao *et al.*, 2005 ; Chen *et al.*, 2006 ; van Rooij and Olson, 2007 ; Zhao *et al.*, 2007 ; Wilson *et al.*, 2010). Ces « myomiRs » régulent la prolifération et la différenciation des cardiomyocytes, ainsi que l'expression des canaux ioniques et des jonctions communicantes, orchestrant ainsi la contraction et la conduction cardiaque (Wang *et al.*, 2008 ; Yang *et al.*, 2008).

2.1. La famille miR-1/miR206

La famille miR-1/miR206 est composée de trois membres miR-1-1, miR-1-2 et miR-206 issus de trois loci différents (figure 27). Les membres de cette famille font partie des miARNs les plus conservés et sont trouvés du nématode aux vertébrés. Ainsi, les gènes codant miR-1-1 et miR-1-2 sont situés sur deux loci mais génèrent des miARNs matures

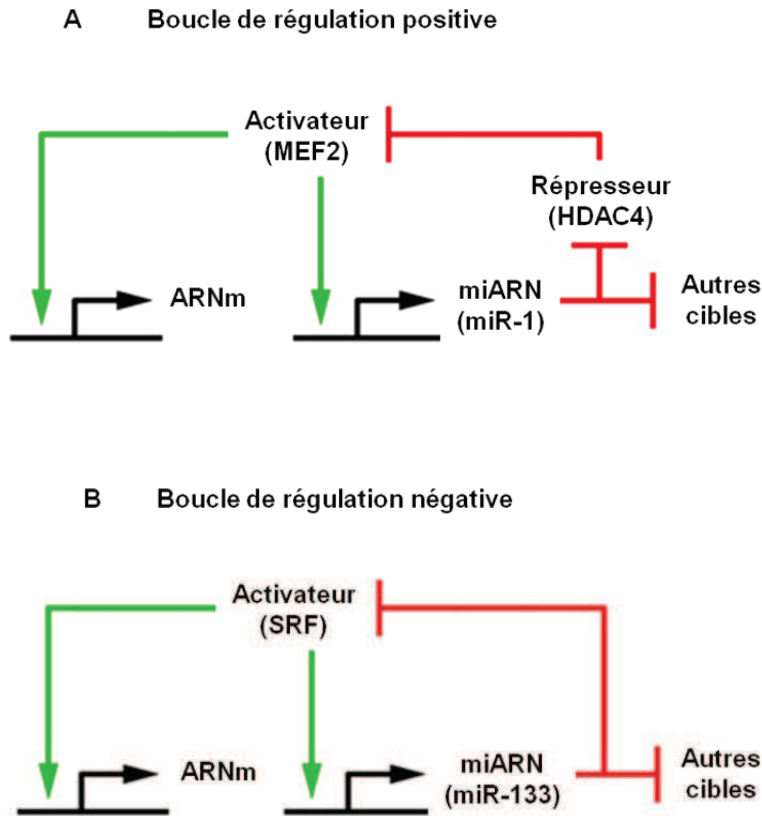


Figure 28 : Boucles de régulation des miARNs.

(adaptée Liu and Olson et al., 2010)

A. MiR-1 réprime un répresseur de son activateur MEF2 conduisant à une amplification de l'expression de miR-1. La boucle formée entre miR-1, HDAC4 et MEF2 amplifie les régulations effectuées par miR-1 et correspond à une boucle de régulation positive.

B. MiR-133 réprime le facteur de transcription SRF (Serum Response Factor) nécessaire à son expression, ce qui conduit à une diminution de l'expression de miR-133. La boucle formée entre miR-133 et SRF correspond à une boucle de régulation négative.

identiques. Ils sont exprimés dans le cœur et le muscle squelettique tandis que miR-206 est spécifiquement détecté dans le muscle squelettique. Comme la plupart des gènes musculaires, les facteurs de transcription SRF (« Serum Response Factor ») et MEF2 (« Myocyte Enhancer Factor 2 ») régulent la transcription de ces miARNs, et il est intéressant de noter qu'il existe une boucle d'autorégulation de ces miARNs. En effet, MEF2 et SRF régulent la transcription des miR-1 et miR-133, qui régulent respectivement SRF et HDAC (inhibant l'expression de MEF2) (figure 28) (Chen *et al.*, 2006).

Ces miARNs sont exprimés sous forme d'unité bi-cistronique : miR-1-1/miR-133a-2 et miR-1-2/miR-133a-1 (Liu *et al.*, 2007) (figure 27). Le transcrit primaire de miR-1-1/miR-133a-2 dérive d'un ARN non codant, tandis que celui de miR-1-2/miR-133a-1 provient du brin opposé du gène *MIB1*, codant une ubiquitine ligase E3. Toutefois, le cluster miR-1-2/miR-133a-1 possède son propre promoteur et est exprimé de façon indépendante de *MIB1*. Plus récemment, une étude a décrit la présence d'un promoteur régulé par MEF2 situé entre miR-1-2 et miR-133a-1, contredisant ainsi une co-transcription de ces deux miARNs (Callis *et al.*, 2009). Enfin, malgré une co-expression transcriptionnelle, l'expression de ces miARNs matures serait subtilement régulée au cours du développement. Ainsi, les miARNs de la famille miR-133 réguleraient la prolifération et ceux de la famille miR-1 réguleraient la différenciation cardiaque (Zhao *et al.*, 2005 ; Chen *et al.*, 2006).

2.1.1. Le rôle de miR-1 dans le développement cardiaque

En 2005, Zhao et ses collaborateurs ont montré que la surexpression de miR-1 dans le cœur embryonnaire de souris inhibe la prolifération des cardiomyocytes en inhibant la traduction de *HAND2* qui est un facteur de transcription indispensable au développement ventriculaire (Srivastava *et al.*, 1995 ; Zhao *et al.*, 2005). En 2007, l'invalidation de *miR-1-2* chez la souris a mis en évidence une augmentation de 4 fois de l'expression de *HAND2* et une augmentation de 3 fois de la prolifération des cellules cardiaques (Zhao *et al.*, 2007). Enfin, Chen et ses collaborateurs ont renforcé l'idée du rôle régulateur de miR-1 dans la différenciation cardiaque par une injection de miR-1 au stade unicellulaire chez le xénope qui conduit à l'absence complète de cellules cardiaques (Chen *et al.*, 2006).

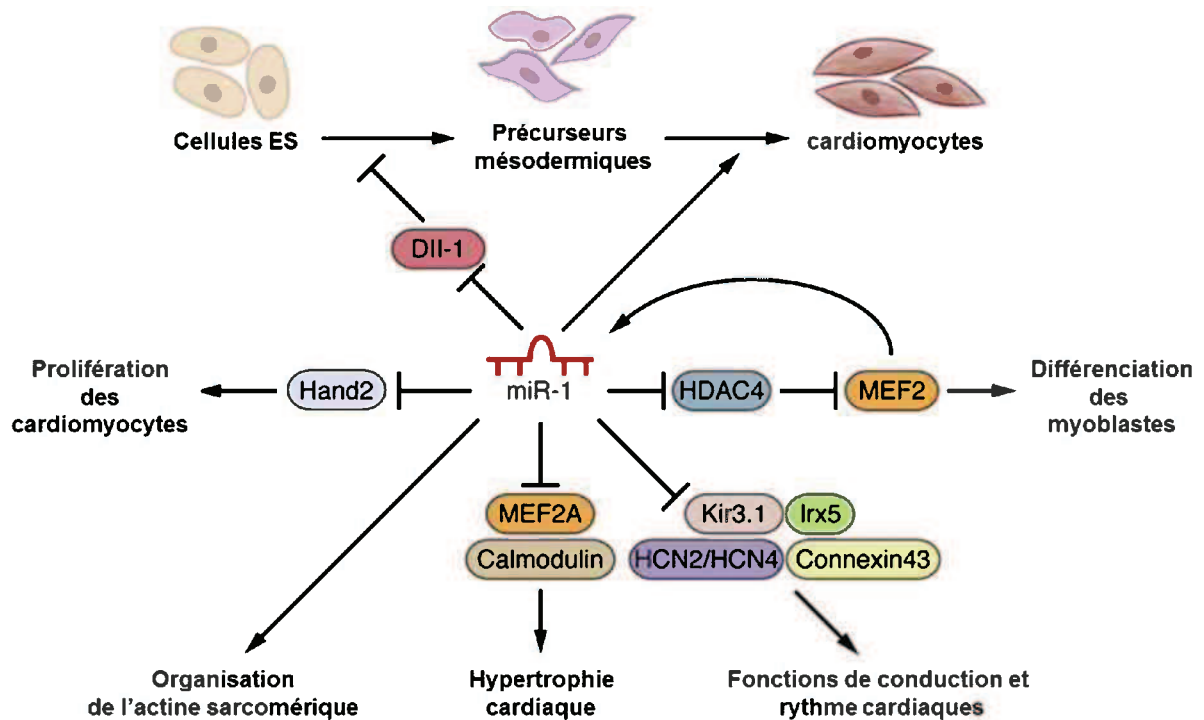


Figure 29 : Fonction de miR-1 dans les muscles squelettique et cardiaque.

(adaptée de Liu and Olson, 2010)

Dll1 : Notch ligand Delta-Like-1 ; HDAC4 : Histone Deacetylase 4 ; MEF2 : Myocyte Enhancer Factor 2 ; HAND2 : bHLH transcription factor nécessaire à la croissance des cardiomyocytes ; Kir3.1 : *potassium* inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 3 (*KCNJ3*) ; HCN2 ; HCN4 : potassium/sodium Hyperpolarisation-activated Cyclic Nucleotide-gated channel.

2.1.2. Le rôle de miR-1 dans le fonctionnement cardiaque

Afin d'étudier le rôle de miR-1 dans le fonctionnement cardiaque, Zhao et ses collaborateurs ont généré des souris invalidées pour le gène *miR-1-2* et ont observé des anomalies de la conduction cardiaque, caractérisées par une faible diminution de l'intervalle PR et des arythmies avec une prolongation du complexe QRS provoquant une mort subite (Zhao *et al.*, 2007). De plus, la surexpression et la diminution de miR-1 dans un modèle de rat ayant des prédispositions à l'infarctus du myocarde, conduisent respectivement à des arythmies et à une réduction de la prédisposition de ces rats aux arythmies (Yang *et al.*, 2007). D'autres études renforcent cette fonction de miR-1, notamment l'observation d'une diminution de l'expression de miR-1 dans des modèles d'hypertrophies cardiaques, mais aussi des expériences de surexpression de miR-1 dans des cœurs adultes murins qui diminue l'hypertrophie cardiaque (Ikeda *et al.*, 2009). MiR-1 jouerait ce rôle en régulant l'expression de MEF2 (Potthoff and Olson, 2007). De plus miR-1 inhibe l'expression de la calmoduline, ce qui diminue l'activation de la voie de signalisation calmoduline-calcineurine-NFAT dans la prolifération cardiaque (Crabtree and Olson, 2002 ; Ikeda *et al.*, 2009). Enfin, l'expression de nombreux canaux ioniques et des protéines des jonctions communicantes responsables du rythme et de la conduction cardiaque, est régulée par miR-1. Ces différentes régulations par miR-1 sont présentées ci-dessous (figure 29).

- La régulation de la conduction cardiaque par miR-1

La conduction cardiaque s'effectue grâce aux jonctions communicantes, principalement constituées de Cx43 dans les ventricules. En 2012, une équipe a montré que la Cx43 est régulée par miR-1 chez la souris (figure 29) (Xu *et al.*, 2012). Ainsi les variations de miR-1 dans le cœur entraîneraient des variations d'expression de cette protéine cruciale pour la conduction cardiaque.

- La régulation de la repolarisation cardiaque par miR-1

Le repolarisation de la membrane des cardiomyocytes est possible grâce au fonctionnement des canaux potassiques codés par les gènes *KCND2*, *KCNE1*, *KCNQ1*, *KCNH2* et *KCNJ2* et du canal calcique cardiaque codé par le gène *CACNA1C*.

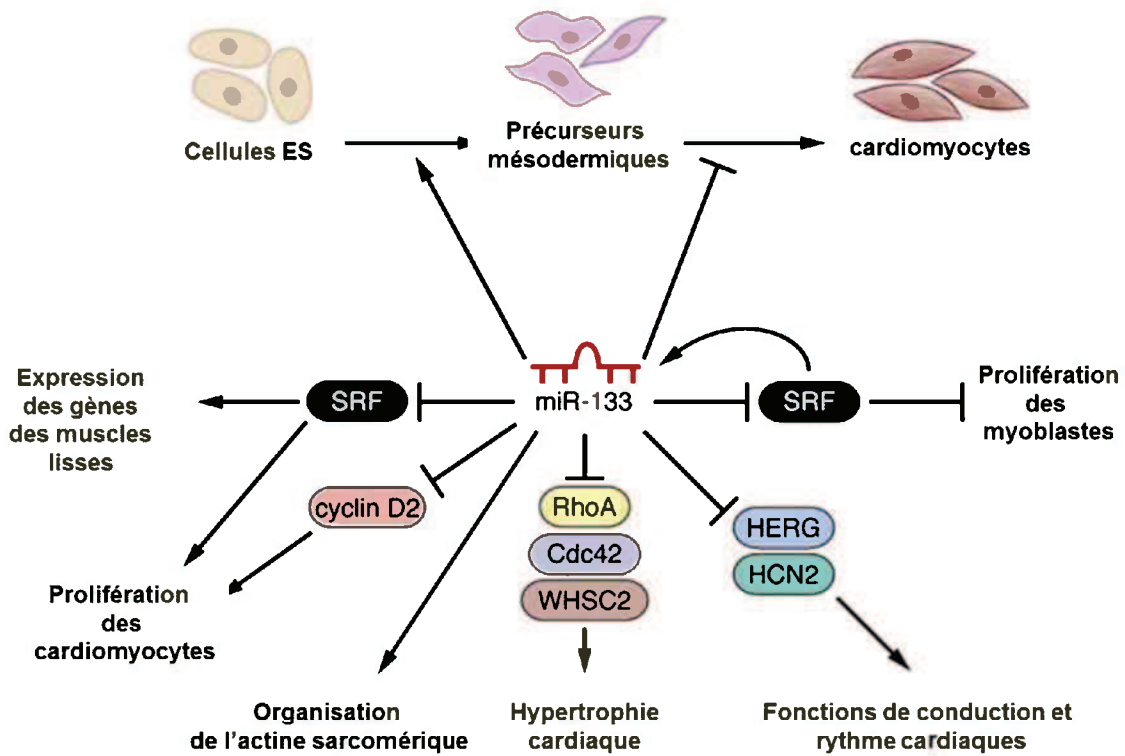


Figure 30 : Fonction de miR-133 dans les muscles squelettique et cardiaque.

(adapté de Liu and Olson, 2010)

SRF : Serum Response Factor ; RhoA : GTPase Ras Homolog family member A (GTPase)
 Cdc42 : Cell division control 42 ; WHSC2 : Wolf-Hirschhorn Syndrome Candidate 2; MEF2 :
 Myocyte Enhancer Factor 2 ; HAND2 : bHLH transcription factor (nécessaire à la croissance
 des cardiomyocytes) ; Kir3.1 : *potassium* inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 3
 (*KCNJ3*) ; HCN2, HCN4 : potassium/sodium Hyperpolarisation Cyclic Nucleotide-gated
 channel.

En 2007, il apparaît que l'expression des canaux potassiques codés par les gènes *KCNE1* et *KCNJ2* est régulée par miR-1 (Yang *et al.*, 2007). Toutefois, en 2012, ces résultats ont été discutés. Dans la même année, une autre équipe a mis en évidence, dans des cellules progénitrices humaines stimulées par hyperglycémie, une augmentation de miR-1 ainsi qu'une diminution de *KCNE1* suggérant que miR-1 pourrait réguler l'expression de *KCNE1* (Li *et al.*, 2012).

De plus, lors de l'étude de l'inactivation de *miR-1-2* chez la souris, Zhao *et al.* ont mis en évidence que miR-1 réprime l'expression du facteur de transcription IRX5, qui, lui, inhibe l'expression de *KCND2* (Zhao *et al.*, 2007). Ainsi, la diminution de miR-1 chez ces souris conduit à une augmentation de IRX5, entraînant une diminution de *KCND2* et donc des défauts de repolarisation conduisant à des arythmies (Costantini *et al.*, 2005 ; Zhao *et al.*, 2007). D'autres études confirment le rôle anti-arythmique des canaux à K⁺. Effectivement, les syndromes du QT long de type 1 et 2 sont respectivement dus à des mutations dans les gènes codant les canaux potassiques *KCNQ1* et *KCNH2* (Zimmer *et al.*, 2008). Enfin, des analyses par puces à ADN montrent une augmentation du niveau d'expression de l'ARNm du canal calcique cardiaque, *Cacna1c*, dans des souris invalidées pour *miR-1-2*, suggérant ainsi un rôle de miR-1 dans l'expression de *Cacna1c* et ainsi dans la signalisation cellulaire dépendante du calcium (Zhao *et al.*, 2007).

2.2. La famille miR-133

La famille miR-133 est également composée de trois membres miR-133-a1, miR-133-a2 et miR-133-b (figure 27). Les miARNs miR-133-a1 et miR-133-a2 sont exprimés dans le cœur et le muscle squelettique tandis que miR-133-b n'est détecté que dans le muscle squelettique. Carè et ses collaborateurs ont montré que la diminution de miR-133 chez la souris provoque une hypertrophie cardiaque (Carè *et al.*, 2007). Ce résultat est en accord avec l'observation d'une réduction de miR-133 dans des échantillons de patients présentant une hypertrophie cardiaque (Carè *et al.*, 2007). Enfin, ces résultats sont confirmés par l'inactivation des gènes *miR-133-a1* et *miR-133-a2* chez la souris qui conduit à des défauts ventriculaires entraînant une létalité embryonnaire (Liu *et al.*, 2008). Les rares souris atteignant l'âge adulte présentent des cardiomyopathies dilatées, une fibrose cardiaque, une prolifération et une apoptose excessive des cardiomyocytes. Cette prolifération excessive serait due à une augmentation de la cycline D1, qui est une cible de miR-133-a.

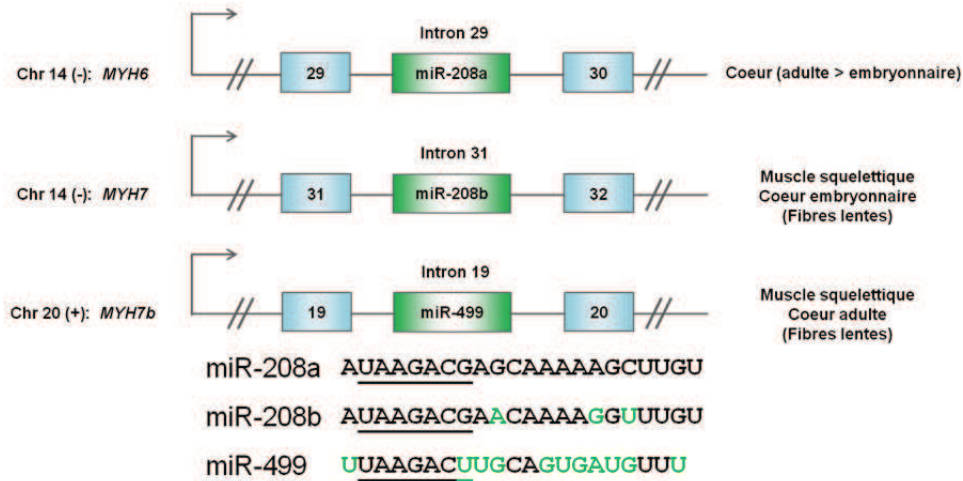


Figure 31 : Localisation chromosomique, séquence et expression tissulaire des miARNs de la famille miR-208/499.

A. Les gènes *miR-208a*, *miR-208b*, *miR-499* sont situés dans des régions introniques des gènes codant les chaînes lourdes de la myosine *MYH6* (α), *MYH7* (β) et *MYH7b* (β) au niveau des chromosomes 14, 14 et 20, respectivement.

B. La région « seed » soulignée, composée de 6 à 8 nucléotides localisée à l'extrémité 5' du miARN mature permettant le ciblage spécifique des ARNm, est pratiquement conservée chez les 3 miARNs.

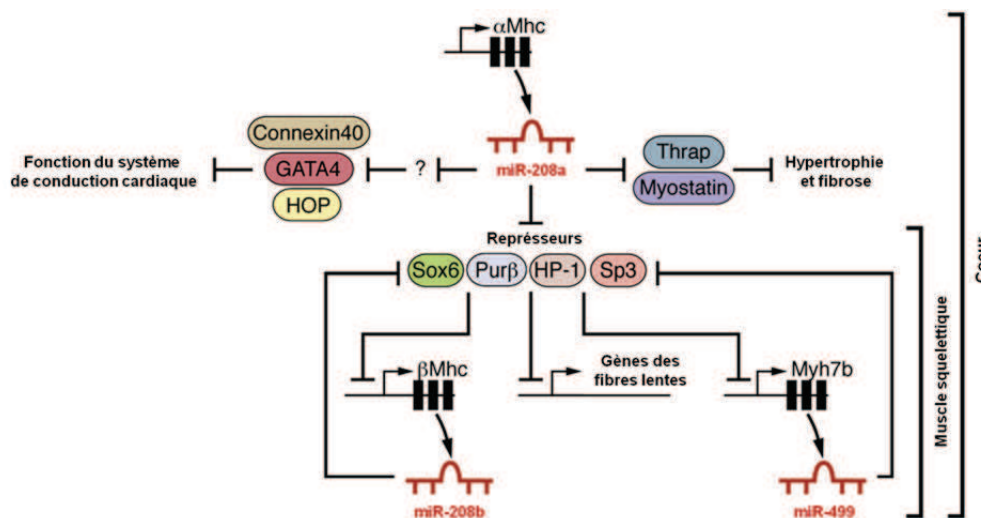


Figure 32 : Fonction de miR-208 dans les muscles squelettique et cardiaque.

(adapté de Liu and Olson, 2010)

GATA4: transcriptional factor 4 binding to GATA sequence ; HOP: Homeodomain Only Protein; Thrap: Thyroid Hormon T3 Receptor Auxiliary Protein ; Sox6: SRY (Sex determining Region Y)-box 6 ; Purβ: Purine-rich element-binding protein β.

Sox6, Purβ et Sp3 sont des répresseurs transcriptionnels de βMhc (*MYH7*)

Mhc: Myosin heavy chain (*MYH*); HP1: Heterochromatin Protein 1

MiR-133-a régule aussi le fonctionnement cardiaque (figure 30). En effet, miR-133-a contrôlerait l'expression du canal pacemaker HCN2, et des canaux potassiques KCNQ1 et KCNH2 régulant la repolarisation. Ces canaux sont impliqués dans la prolongation de l'onde QT et sont associés à des arythmies et des fibrillations auriculaires. Cependant, ces résultats sont discutés. Aucune variation d'expression de *Kcnh2* n'est observée chez les souris invalidées pour les gènes *miR-133-a* (Liu *et al.*, 2008). Toutefois, une autre équipe a mis en évidence, dans des cellules progénitrices humaines stimulées par hyperglycémie, une augmentation de miR-133 ainsi qu'une diminution de KCNQ1 suggérant que miR-133 pourrait réguler l'expression de KCNQ1 (Li *et al.*, 2012).

Enfin, miR-133 affiche également un rôle dans le métabolisme des cardiomyocytes. En effet, miR-133 réprime l'expression du facteur KLF15 (« Kruppel-Like Factor 15 ») qui régule l'expression de GLUT4, transporteur de glucose dans le cœur (Horie *et al.*, 2009).

2.3. La famille miR-208/miR-499

Comme les familles miR-1/miR-206 et miR-133, la famille miR-208/miR-499 est composée de trois membres possédant une région « seed » identique (figure 31). Ces miARNs sont impliqués dans le développement cardiaque, l'identité de la fibre musculaire (rapide ou lente) ainsi que la performance musculaire (van Rooij *et al.*, 2007 ; Callis *et al.*, 2009 ; van Rooij *et al.*, 2009).

Les miR-208a, miR-208b et miR-499 sont localisés respectivement dans les gènes *MYH6*, *MYH7* et *MYH7b*. L'expression de ces miARNs est étroitement liée à celle de leurs gènes hôtes. Ainsi, miR-208a est exprimé dans le tissu cardiaque adulte (van Rooij *et al.*, 2007). MiR-208b est exprimé dans les fibres musculaires lentes et dans le cœur embryonnaire, et miR-499 est exprimé dans les fibres musculaires lentes et le cœur adulte (Rossi *et al.*, 2009).

L'inactivation de *miR-208a* chez la souris conduit à une résistance à la fibrose et à l'hypertrophie cardiaque suite à un stress (van Rooij *et al.*, 2007 ; Callis *et al.*, 2009 ; van Rooij *et al.*, 2009). Au contraire, la surexpression de miR-208a chez la souris entraîne une diminution de THRAP1 (« T3 receptor auxiliary protein 1 »), qui régule le récepteur à l'hormone thyroïdienne T3, et une diminution de la myostatine, un répresseur de l'hypertrophie du muscle squelettique et cardiaque, conduisant à une hypertrophie cardiaque et des arythmies (Callis *et al.*, 2009) (figure 32). De plus, miR-208a régulerait l'expression de la connexine 40, de la protéine HOP (« Homeodomain-Only Protein ») et du facteur de

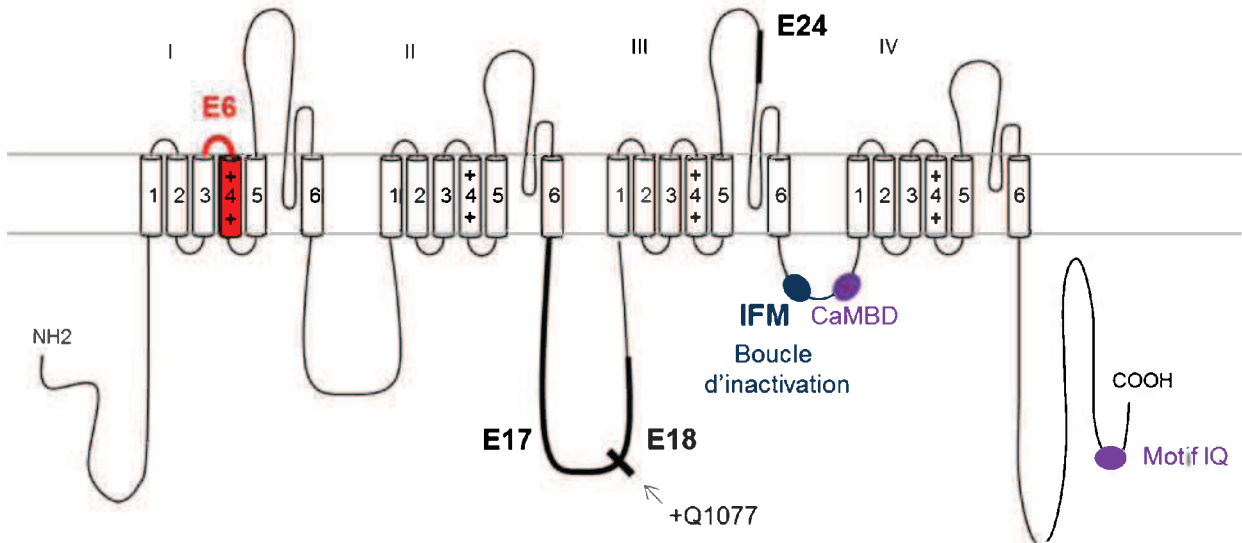


Figure 33 : Structure de la sous-unité α du canal à sodium $Na_v1.5$.

Le canal est composé de 4 domaines I à IV, composés de 6 segments transmembranaires de 1 à 6. Les segments S4 des trois premiers domaines sont sensibles au voltage. Les signes « + » indiquent que les segments contiennent un bandeau d'acides aminés chargés positivement.

Le segment S4 du domaine I en rouge correspond à la partie du canal codée par l'exon 6A dans la forme néonatale et par l'exon 6B dans la forme adulte. Les parties en trait noir épais sont codées par les exons alternatifs 17, 18 et 24. « +Q1077 » correspond à l'isoforme issue de l'utilisation d'un site 3' d'épissage alternatif de l'exon 18 conduisant à l'inclusion de trois nucléotides CAG codant une glutamine supplémentaire. Le motif IFM (Isoleucine, Phénylalanine, Méthionine) est nécessaire à la boucle d'inactivation. CaMBD et le motif IQ (Isoleucine Glutamine) sont des domaines de liaison à la Calmoduline.

transcription GATA4. A ces régulations, s'ajoute celle des gènes codant les myosines MYH7 et MYH7b, et donc les deux autres membres de la famille, miR-208b et miR-499. Ainsi, suite à des signaux tels que le stress, l'augmentation de miR-208a entraîne une augmentation de l'expression des myosines MYH7 et MYH7b et des miARNs, miR-208b et miR-499 (van Rooij *et al.*, 2009).

3. Le canal à sodium SCN5A/Na_v1.5 au cœur des troubles cardiaques

3.1. Généralités sur les canaux sodiques

Les canaux sodiques voltage-dépendant (« VGSC : Voltage-Gated Sodium Channel ») sont constitués d'une large sous-unité principale α d'environ 230 kDa associée à une ou plusieurs sous-unités auxiliaires β de 33 à 38 kDa (Catterall, 2000 ; Schroeter *et al.*, 2010). La sous-unité α , formant le pore, est responsable de l'activation et l'inactivation du canal et de la sélection ionique, tandis que les sous-unités β peuvent modifier la dépendance au voltage et les cinétiques de la sous-unité α . Les canaux à sodium possèdent la caractéristique de s'activer rapidement puis de s'inactiver en fonction du voltage et du temps, conduisant ainsi à une inactivation rapide ou lente.

3.1.1. La sous-unité alpha des canaux sodiques

La sous-unité α du canal (VGSC α) est formée de quatre domaines homologues (DI à DIV). Chaque domaine est composé de six segments transmembranaires (S1 à S6) (figure 33). Le repliement des quatre domaines sur eux-mêmes forme un pore central. Les boucles P (Pore) situées entre les segments S5 et S6 de chaque domaine constituent la partie centrale du pore. Les segments S4, structurés en hélices α , sont dits « sensible au voltage » et détectent ainsi les variations de voltage membranaire et les transmettent au reste du canal. Les boucles extracellulaires connectant les différents segments entre eux peuvent être glycosylées. Enfin, la boucle intracellulaire qui relie les domaines DIII et DIV constitue la boucle d'inactivation qui est capable de se replier sur le canal et ainsi fermer le pore (Stuhmer *et al.*, 1989). Les extrémités amino- et carboxy-terminales du canal sont cytoplasmiques et contribuent à la formation de la face intracellulaire du canal.

Canal	Gène	sensibilité à la TTX	Distributions tissulaires majeures	Références
Na _v 1.1	SCN1A	TTX-S	Système nerveux central et périphérique	Westenbroek et al., 1989 Black et al., 1996
Na _v 1.2	SCN2A	TTX-S	Système nerveux central et périphérique	Westenbroek et al., 1989 Black et al., 1996
Na _v 1.3	SCN3A	TTX-S	Système nerveux central et périphérique, cœur	Whitaker et al., 2001 Waxman et al., 1994b
Na _v 1.4	SCN4A	TTX-S	Muscle squelettique	Haimovich et al., 1987
Na _v 1.5	SCN5A	TTX-R	Cœur	Rogart et al., 1987
Na _v 1.6	SCN8A	TTX-S	Système nerveux central et périphérique, muscle lisse	Black et al., 2002 Saleh et al., 2005
Na _v 1.7	SCN9A	TTX-S	Neurones des ganglions spinaux, cellules de Schwann et endocrines	Toledo-Aral et al., 1997
Na _v 1.8	SCN10A	TTX-R	Système nerveux périphérique, cœur	Akopian et al., 1996 Chambers et al., 2010
Na _v 1.9	SCN11A	TTX-R	Système nerveux périphérique	Dib-Hajj et al., 1998
Na _x	SCN7A & SCN6A	1 μM	Cœur et utérus	Hiyama et al., 2004

Tableau 6 : Les différentes sous-unités α du canal à sodium.
(adapté de Eijkelkamp et al., 2012)

La sous-unité Na_x est sensible à la tétrodoxine à partir de 1 μM.

Chez l'homme, dix gènes codant pour différentes sous-unités α du canal sodique ont été identifiés. Le nom de chaque sous-unité α est défini selon le symbole chimique de l'ion perméant (Na), l'initiale du principal régulateur en indice, le voltage (Na_v) et le chiffre correspondant à la famille de gène (Na_v1). Dans le cas des canaux sodiques, une seule famille a été décrite (Goldin, 2001). Le second chiffre apparaissant après le point correspond à la sous-famille du gène ($\text{Na}_v1.X$). Par exemple, la sous-unité $\text{Na}_v1.5$ correspond au cinquième gène de la famille 1 des canaux à sodium. Ces différents canaux peuvent être regroupés en fonction de leur sensibilité à la tétrodoxine (TTX), un bloqueur sélectif des canaux sodiques qui condamne de façon rapide et réversible le pore du canal. Ainsi, les canaux dits « TTX-sensibles » (TTX-S) sont $\text{Na}_v1.1$ à $\text{Na}_v1.4$, $\text{Na}_v1.6$, $\text{Na}_v1.7$ et les canaux « TTX-résistants » (TTX-R) sont $\text{Na}_v1.5$, $\text{Na}_v1.8$ et $\text{Na}_v1.9$. Cette résistance serait due à la substitution d'un seul acide aminé au niveau du domaine I : un résidu phénylalanine aromatique des formes TTX-S est remplacé par un résidu cystéine polaire dans les canaux TTX-R, réduisant ainsi d'environ 200 fois la sensibilité à la TTX (Satin *et al.*, 1992). L'expression de ces différents gènes varie selon les tissus. Par exemple, les canaux $\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.3$, et $\text{Na}_v1.6$ sont fortement exprimés au niveau du système nerveux central (SNC). Les canaux $\text{Na}_v1.7$, $\text{Na}_v1.8$ et $\text{Na}_v1.9$ sont principalement exprimés dans le système nerveux périphérique (SNP). Le canal $\text{Na}_v1.4$ (*SCN4A*) est, quant à lui, spécifique aux muscles squelettiques et sa quantité augmente au cours du développement. Le canal $\text{Na}_v1.5$ (*SCN5A*) est lui retrouvé faiblement dans le muscle squelettique embryonnaire ou dénervé, mais est fortement exprimé dans le muscle cardiaque. Enfin, des protéines apparentées aux canaux sodiques voltage-dépendant, ont été retrouvées chez la souris, le rat et l'homme et forment une sous famille : Na_x (Eijkelkamp *et al.*, 2012). Ces protéines possèdent environ 50% d'identité avec la famille de canaux Na_v1 mais montrent des différences au niveau de motifs cruciaux tels que le détecteur au voltage (segment S4), la boucle d'inactivation (boucle reliant les domaines DIII et DIV), le motif IFM (isoleucine, phénylalanine, méthionine) et la région du pore. Ces variations de séquences suggèrent que ces canaux sont plutôt régulés par la concentration de Na^+ extracellulaire que par le voltage (Grob *et al.*, 2004). Le **tableau 6** récapitule les différentes formes de canaux sodiques voltage-dépendant et Na_x détectés chez l'homme, leur sensibilité à la TTX ainsi que leur distribution tissulaire.

- Activation des canaux sodiques

Les canaux sodiques présentent une sélectivité pour le sodium cent fois plus élevée que pour les autres ions, avec un débit d'ions par canal ouvert de 10^7 ions par seconde. Cette

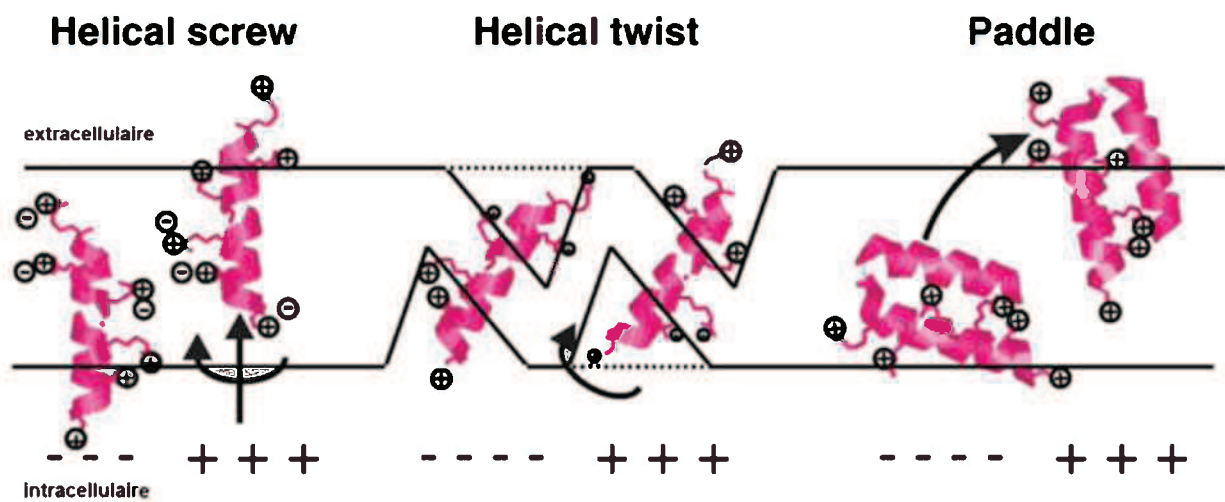


Figure 34 : Modèles moléculaires des mouvements des segments S4, détecteurs de voltage, du canal sodique $Na_v1.5$.

(adapté de Elinder et al., 2007)

Les segments S4 sont en rose. Les flèches noires indiquent les mouvements effectués par les segments. Les charges négatives et positives intracellulaires correspondent respectivement à la charge globale intracellulaire avant et après dépolarisation de la membrane.

Le modèle à gauche est nommé « helical screw » (mouvement de tire-bouchon).

Le modèle au centre est nommé « helical twist » (torsion hélicoïdale).

Le modèle à droite est nommé « paddle » (pagaie).

spécificité est due aux boucles P, reliant les segments S5 et S6 de chaque domaine, qui forment un pore aqueux sélectif. Un modèle (Lipkind and Fozzard, 2000) propose qu'un filtre de sélectivité serait formé par l'arrangement de résidus d'acides aminés chargés négativement en deux anneaux (un externe et un interne) au niveau de ce pore. L'anneau externe comprend le motif d'acides aminés EEDD et l'anneau interne est constitué du motif DEKA (Lipkind and Fozzard, 2000). Dans ce modèle, intervient une molécule d'eau qui est stabilisée par les deux résidus K et E du motif DEKA, l'ion Na^+ déplace la molécule d'eau et lie les résidus D et E du motif DEKA, tandis que la lysine se rapproche de l'alanine pour former une loge pour le sodium. Dans un second modèle (Vora *et al.*, 2005), deux ions Na^+ occuperaient en continu le filtre de sélectivité, et un troisième ion entrant du côté extracellulaire propulserait l'un des deux ions à travers le canal (Vora *et al.*, 2005).

Les segments S4 de chaque domaine contiennent des motifs répétés, constitués d'acides aminés positivement chargés (lysine ou arginine), séparés par deux résidus non polaires. La structure des segments S4 forme une hélice amphiphile présentant un bandeau de charges positives. Ces dernières seraient stabilisées par des charges négatives, principalement portées par les segments transmembranaires S2 et S3 (figure 34). Le segment S4 du domaine DI serait le premier à percevoir les variations de voltage. La localisation des segments S4 ainsi que leur mouvement lors du passage des ions Na^+ sont encore controversés. Ainsi, un premier modèle connu sous le nom de « helical screw » (mouvement de tire-bouchon) propose que lors d'une dépolarisation membranaire, sous l'effet du champ électrique, les liaisons électrostatiques des segments S4 avec les segments S2 et S3 sont rompues et les segments S4 effectuent un mouvement de rotation et de soulèvement vers le milieu extracellulaire. Ceci provoque un changement de conformation du canal qui permet le passage des ions Na^+ . Au contraire, un second modèle suggère que les segments S4 seraient en contact avec des lipides, et effectueraient un mouvement de pagaie (modèle « paddle ») entraînant l'ouverture du canal. Enfin, il émerge un troisième modèle dit « helical twist » selon lequel les segments S4 sont diagonalement insérés dans la membrane et effectueraient un mouvement de rotation de 180° , sans mouvement de translation (figure 34) (Elinder *et al.*, 2007).

- Inactivation des canaux sodiques

Aux structures sensibles au voltage entraînant l'activation du canal, s'ajoutent des structures d'inactivation. Cette inactivation s'effectue lors de la dépolarisation, quelques millisecondes après l'ouverture. Ainsi, l'inactivation ferme le canal et empêche sa réouverture avant un certain temps de réactivation. Ce mécanisme joue un rôle important dans les cellules

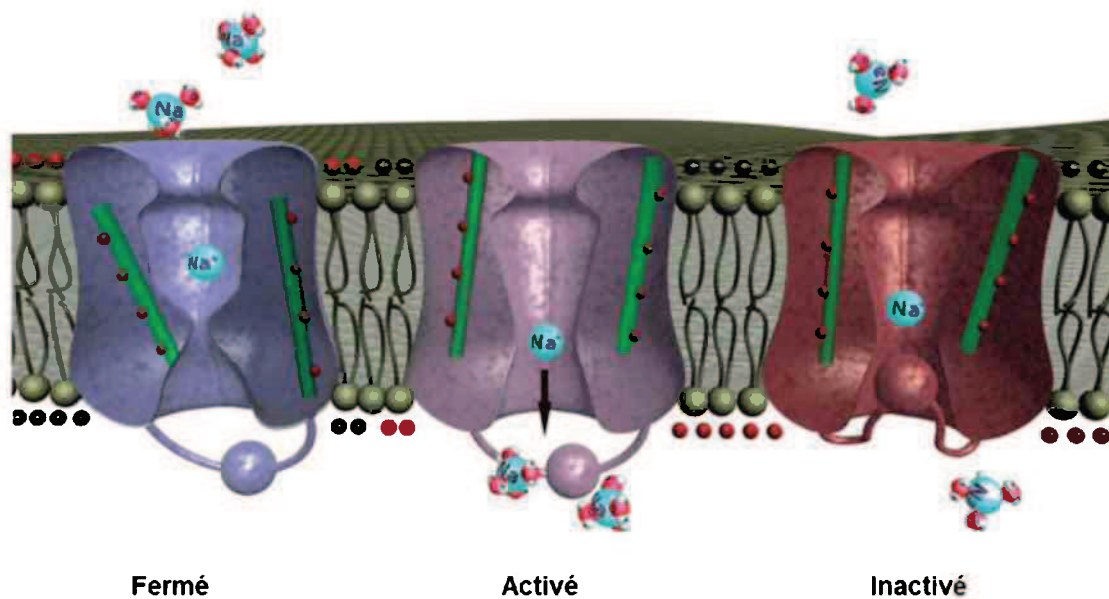


Figure 35 : Modèle des 3 états du canal à sodium.

(adapté de Eijkelkamp et al., 2013)

Le pore du canal peut être divisé en deux parties : la porte d'activation et la porte d'inactivation (respectivement au centre et en bas du canal sur le schéma). A gauche, le canal est dit « fermé » avec la porte d'activation fermée et la porte d'inactivation ouverte. Au centre, le canal est dit « ouvert » ou « activé » avec les portes d'activation et d'inactivation ouvertes. A droite, le canal est dit « inactivé » avec la porte d'activation ouverte et la porte d'inactivation fermée car obstruée par la boucle d'inactivation.

excitables en déterminant la fréquence maximale de décharge des potentiels d'action et leur propagation. Trois types d'inactivation ont été caractérisés en fonction de leur cinétique : rapide, lente et ultra-lente (Goldin, 2003).

L'inactivation débute à la réception du voltage par le segment S4 du domaine IV. Celui-ci affiche un délai de réponse et change de conformation seulement après le passage des ions Na^+ à travers le pore. L'inactivation rapide du canal s'effectue par la boucle intracellulaire reliant les domaines III et IV, qui vient se fixer à une région dite site de garage (« docking site »). Ce mécanisme d'inactivation se déroule par un mécanisme de boule et de chaîne (« ball and chain »). Dès l'ouverture du pore, cette boucle se mettrait en mouvement et un motif hydrophobe IFM constitué de trois acides aminés (isoleucine, phénylalanine, méthionine) viendrait obstruer le pore. Le « docking site » serait constitué des boucles qui relient les segments S4 et S5 des domaines III et IV contenant des résidus hydrophobes et la partie C-terminale du segment S6 du domaine IV (Catterall, 2000). L'extrémité C-terminale du canal interagirait avec la boucle d'inactivation, permettant de maintenir le canal sous forme inactivée pendant une dépolarisation prolongée.

L'inactivation lente et l'inactivation ultra-lente, quant à elles, seraient le résultat d'un réarrangement de la structure du pore. En effet, des mutations dans les boucles P du pore, dans le motif EEDD de l'anneau externe et dans le motif DEKA de l'anneau interne modifient ces deux types d'inactivation.

- Modèle du mécanisme général d'ouverture et fermeture des canaux sodiques

Dans ce modèle, le pore du canal peut être divisé en deux parties : la porte d'activation (« activation gate ») située dans le pore et regardant vers le milieu extracellulaire, et la porte d'inactivation (« inactivation gate ») formée de la boucle d'inactivation intracellulaire (figure 35). Au repos, le canal est sous sa forme « fermée » avec la porte d'activation fermée et la boucle d'inactivation dans le milieu intracellulaire « ouverte ». Lors d'une dépolarisation membranaire, les changements de conformation des segments S4 vers le milieu extérieur entraînent l'ouverture de la porte d'activation. Ainsi, le canal est dit « ouvert » ou « activé ». Lors de l'inactivation par le mécanisme « ball and chain », la boucle d'inactivation vient obstruer le pore avec la porte d'activation ouverte mais la porte d'inactivation fermée : le canal est dit « inactivé ». Enfin, quand la membrane est repolarisée, le pore retrouve son état dit « fermé » (figure 35).

Canal	Gène	Distribution tissulaire majeure	Références
$\beta 1$	SCN1B	Système nerveux central, cœur	Isom et al., 1992
$\beta 2$	SCN2B	Système nerveux périphérique	Lopez-Santiago et al., 2006
$\beta 3$	SCN3B	Cœur, système nerveux central, muscle squelettique	Stevens et al., 2001
$\beta 4$	SCN4B	Systèmes nerveux central et périphérique	Yu et al., 2003

Tableau 7 : Les différentes sous-unités β du canal à sodium.

(adapté de Eijkelkamp et al., 2012)

Les deux isoformes $\beta 1$ et $\beta 1B$ sont représentées dans le tableau par la sous-unité $\beta 1$.

3.1.2. Les sous-unités beta des canaux sodiques

Les sous-unités auxiliaires β (VGSC β) des canaux sodiques sont des glycoprotéines d'environ 30 à 40 kDa. Elles sont constituées d'un segment transmembranaire unique, d'un segment N-terminal extracellulaire possédant un domaine immunoglobuline-like, et d'une petite chaîne C-terminale intracellulaire. Souvent par deux, les sous-unités β sont associées à une sous-unité α , de manière non-covalente ou covalente en fonction des différents canaux (Catterall, 1986 ; Isom, 2001).

Les sous-unités $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ et $\beta 4$ sont codées par les gènes *SCN1B*, *SCN2B*, *SCN3B* et *SCN4B* (tableau 7). Il existe deux isoformes d'épissage de la sous-unité $\beta 1$: $\beta 1$ et $\beta 1B$. Les profils d'expression de ces sous-unités β varient en fonction des tissus et au cours du développement embryonnaire. Par exemple, le niveau d'expression cardiaque de la sous-unité $\beta 1$ augmente au cours du développement cardiaque (Dominguez *et al.*, 2005). Les sous-unités $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 4$ sont exprimées dans les ventricules et oreillettes cardiaques, tandis que la sous-unité $\beta 3$ est exprimée dans les ventricules et les fibres de Purkinje mais pas dans les oreillettes. Les sous-unités $\beta 1$ et $\beta 3$ interagissent avec la sous-unité α par des liaisons non-covalentes, tandis que les sous-unités $\beta 2$ et $\beta 4$ sont reliées à la sous-unité α par des ponts disulfure. De plus, les fonctions de ces sous-unités sont multiples. D'une part, elles modulent les propriétés électrophysiologiques et l'expression à la membrane des sous-unités α des canaux sodiques. D'autre part, elles jouent le rôle de molécules d'adhésion en interagissant avec la matrice extracellulaire, en régulant la migration et l'agrégation cellulaire et en interagissant avec le cytosquelette (Isom, 2001). La sous-unité $\beta 1$ régule l'activité de $Na_v1.1$ et de $Na_v1.5$ (Isom *et al.*, 1992 ; Qu *et al.*, 1995). La sous-unité $\beta 3$, quant à elle, est impliquée dans l'augmentation du courant sodique persistant (Qu *et al.*, 2001). La sous-unité $\beta 4$ joue un rôle dans l'inactivation du canal $Na_v1.1$ (Aman *et al.*, 2009). Ces différentes régulations de la sous-unité α des canaux sodiques par les sous-unités β sont présentées plus en détail dans la partie « Régulations du canal $Na_v1.5$ ».

3.1.3. Molécules bloquant les canaux sodiques

Les canaux sodiques sont les cibles de toxines naturelles provenant de différentes espèces (scorpions, serpents, araignées, mollusques et végétaux, etc.), de molécules thérapeutiques, d'agents anesthésiants et d'insecticides. Ces molécules se fixent à différents

Site	Toxines	Effet physiologique
1	tétradotoxine (TTX) saxitoxine μ -conotoxine	blocage de la perméabilité au sodium
2	batrachotoxine (BTX) vératridine aconitine grayanotoxine N-alkylamides	activation persistante
3	toxines α de scorpion toxine d'anémone de mer (ATXII) δ -atracotoxine	ouverture prolongée du canal
4	toxines β de scorpion	déplacement de la courbe d'activation
5	brevetoxines ciguatoxines	déplacement de la courbe d'activation
6	δ -conotoxines	ouverture prolongée du canal
7	DDT et analogues pyréthroïdes	activation persistante
8	toxines de cônes	ouverture prolongée du canal
9	anesthésiques locaux anticonvulsants dihydropyrazoles	blocage de la perméabilité au sodium

Tableau 8 : Toxines et insecticides liant et bloquant les canaux sodiques voltage-dépendant.
(adapté de Anger et al., 2001)

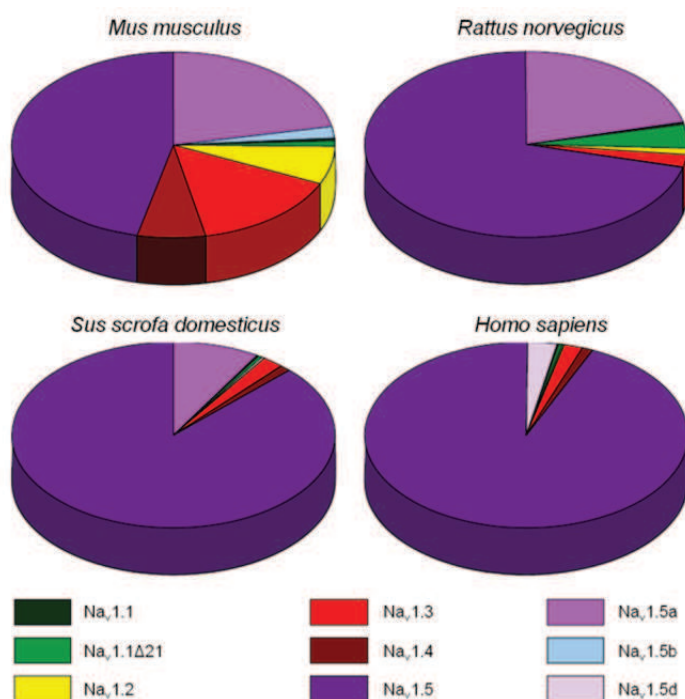


Figure 36 : Niveaux d'expression cardiaque de différentes isoformes Na_v1 dans les cœurs de mammifères.

(adapté de Blechschmidt et al., 2008)

Les profils d'expression des transcrits de différentes isoformes de Na_v1 dans le muscle cardiaque de la souris, du rat, du cochon et de l'humain, présentés sous forme de diagramme circulaire.

sites de la sous-unité α . A ce jour, neuf sites de liaison de ces molécules ont été identifiés et sont récapitulés dans le **tableau 8** (Anger *et al.*, 2001).

3.2. Caractéristiques du canal à sodium $\text{Na}_v1.5$

Durant ma thèse, j'ai étudié l'épissage alternatif d'un des canaux sodiques, $\text{Na}_v1.5$, en rapport avec les origines des symptômes cardiaques des patients DM. C'est pourquoi, parmi les canaux sodiques connus, une partie de ce chapitre est consacré au canal $\text{Na}_v1.5$.

3.2.1. Expression du canal à sodium $\text{Na}_v1.5$

Les canaux sodiques voltage-dépendant cardiaques ont été initialement identifiés chez le rat, le lapin et le poulet (Colatsky *et al.*, 1979 ; Rogart *et al.*, 1983 ; Cruz *et al.*, 1985 ; Rogart *et al.*, 1986). En 1992, le principal homologue cardiaque de ces canaux chez l'homme, *SCN5A*, a été localisé sur le chromosome 3 puis cloné et caractérisé (Gellens *et al.*, 1992). La protéine $\text{Na}_v1.5$ / *SCN5A* est composée de 2016 acides aminés. Elle est localisée au niveau de la membrane latérale et des disques intercalaires des cardiomyocytes et représente le canal sodique le plus abondant dans le cœur humain (**figure 36** ; Blechschmidt *et al.*, 2008). Enfin, l'invalidation du gène *Scn5a* chez la souris est létale à l'état embryonnaire (Papadatos *et al.*, 2001). Les embryons de souris *Scn5a*^{-/-} montrent des contractions cardiaques non coordonnées jusqu'au stade E10,5, puis aucune contraction au-delà de E11,5. De plus, l'étude des embryons *Scn5a*^{-/-} a révélé une réduction de la taille du cœur et des chambres ventriculaires, tandis que le développement des oreillettes paraissait normal. Au contraire, les souris *Scn5a*^{+/-} se développent normalement et ne montrent pas de mortalité précoce par rapport aux souris sauvages. Cependant, les expériences de patch clamp mettent en évidence une réduction du courant sodique de 50% dans les cardiomyocytes de souris *Scn5a*^{+/-} par rapport aux souris *Scn5a*^{+/+}. De plus, les ECG effectués sur les souris *Scn5a*^{+/-} montrent des défauts de conduction cardiaque s'apparentant à des retards de conduction cardiaque progressifs (« CCD : Cardiac Conduction Delay » ou maladie de Lev-Lenègre) avec une prolongation de l'onde P et de l'intervalle PR. Ceci indique une faible conduction cardiaque au niveau des oreillettes et du système de conduction auriculo-ventriculaire, et des blocs de branche droit indiquant des défauts de conduction du faisceau de His. Ces souris présentent également des tachycardies ventriculaires rappelant le syndrome de Brugada (Papadatos *et al.*, 2002 ; Jeevaratnam *et al.*, 2010). Enfin, une étude longitudinale récente a montré que ces souris

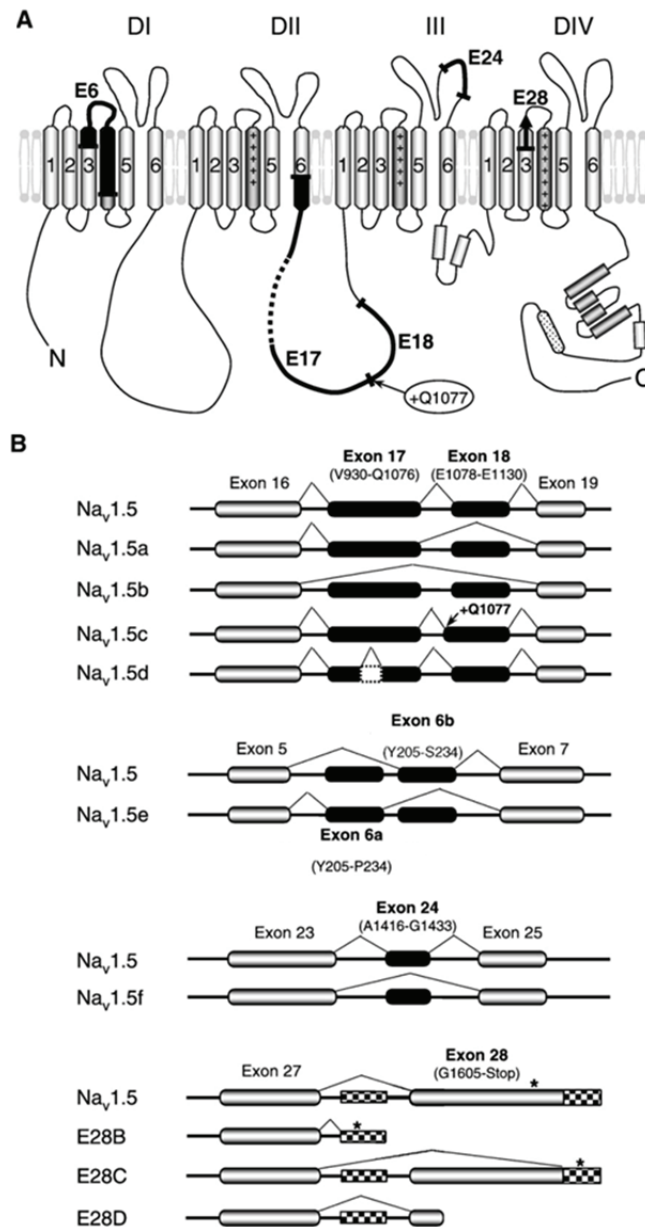


Figure 37 : Différents variants d'épissage alternatif de SCN5A.

(Schroeter et al., 2010)

A. Structure des variants du canal Na_v1.5. Les zones en noir sont les parties codées par l'un des exons alternatifs notés : E6, E17, E18, E24 et E28. +Q1077 correspond à l'utilisation d'un site 3' d'épissage alternatif de l'exon 18 conduisant à l'inclusion de trois nucléotides CAG codant une glutamine supplémentaire.

B. Épissages alternatifs de SCN5A conduisant aux isoformes protéiques.

Les noms des variants protéiques sont indiqués à gauche. Les exons constitutifs, alternatifs et les parties d'introns retenues sont représentés respectivement par des rectangles gris, noirs, et mosaïques de blanc et noir. Les codons d'arrêt sont indiqués par des astérisques.

présentent une diminution progressive de la conduction cardiaque et une apparition de fibrose cardiaque progressant avec l'âge. Il est intéressant de noter que les CCD s'aggravent avec l'âge et sont souvent associés à une fibrose interstitielle progressant avec le temps (Jeevaratnam *et al.*, 2011 ; Jeevaratnam *et al.*, 2012). Ces données suggèrent donc que la perte de fonction d'une partie des canaux $\text{Na}_v1.5$ chez les souris *Scn5a*^{+/-} provoque des défauts cardiaques s'apparentant au syndrome de retard de conduction cardiaque progressif et au syndrome du Brugada, deux maladies génétiques observées chez l'homme.

3.2.2. Les différents variants d'épissage de $\text{Na}_v1.5$

A l'instar de la majorité des 20 000 gènes humains, l'épissage alternatif de l'ARN pré-messager de *SCN5A* donne naissance à plusieurs variants de ce canal (Schroeter *et al.*, 2010). Parmi les 28 exons de *SCN5A*, les exons 6A, 6B, 17, 18 et 28 ainsi que l'intron 27 sont soumis à l'épissage alternatif générant dix ARNm et donc théoriquement au moins dix isoformes protéiques ($\text{Na}_v1.5$; $\text{Na}_v1.5a$; $\text{Na}_v1.5b$; $\text{Na}_v1.5c$; $\text{Na}_v1.5d$; $\text{Na}_v1.5e$; $\text{Na}_v1.5f$; E28B ; E28C ; E28D). Ces variants sont présentés dans la [figure 37](#). Ils peuvent être séparés en deux groupes : les isoformes fonctionnelles ($\text{Na}_v1.5a$; $\text{Na}_v1.5c$; $\text{Na}_v1.5d$; $\text{Na}_v1.5e$) et les isoformes non-fonctionnelles ($\text{Na}_v1.5b$; $\text{Na}_v1.5f$; E28B ; E28C ; E28D). Il est important de noter que plusieurs événements d'épissage alternatif peuvent se produire dans un même transcrit augmentant ainsi le nombre de variants de $\text{Na}_v1.5$ et modifiant les propriétés de ce canal.

- Les variants fonctionnels

Le premier variant de $\text{Na}_v1.5$, découvert dans le cerveau et le cœur de rat, est le canal $\text{Na}_v1.5a$. Cette isoforme due à l'exclusion de l'exon 18 présente une cinétique d'activation plus rapide que $\text{Na}_v1.5$; toutefois, elle n'est pas exprimée dans le cœur humain. Une autre isoforme liée à l'exon 18 est $\text{Na}_v1.5c$. En effet, le choix du site accepteur d'épissage distal de l'exon 18 conduit à l'inclusion de 3 nucléotides CAG entraînant l'insertion d'une glutamine. Il est à noter que la forme incluant ce triplet CAG (+Q1077) est la forme commune dans le cœur adulte. De plus l'insertion de cette glutamine ne modifie pas les caractéristiques électrophysiologiques du canal $\text{Na}_v1.5$. Cependant des études récentes montrent que la présence ou l'absence de cette glutamine (+Q1077 ou Δ Q1077) affecte les cinétiques d'activation et d'inactivation du canal lorsqu'elle est associée à d'autres mutations conduisant

au syndrome du QT long de type 3 et au syndrome de Brugada (Tan *et al.*, 2005 ; Tan *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2007).

La délétion dans le cadre de lecture d'un fragment de 120 nucléotides de l'exon 17 (codant les résidus 961 à 1000) donne naissance au variant $Na_v1.5d$. Des expériences de patch clamp montrent que $Na_v1.5d$ entraîne une plus faible activation et inactivation du canal ainsi qu'une plus faible probabilité d'ouverture du canal comparé à $Na_v1.5$ (Camacho *et al.*, 2006). Toutefois, le niveau d'expression de cette isoforme $Na_v1.5d$ est très faible dans le cœur humain.

Enfin, le dernier variant fonctionnel de $Na_v1.5$, $Na_v1.5e$, sujet de mon travail de thèse, sera décrit dans la partie 3.2.3.

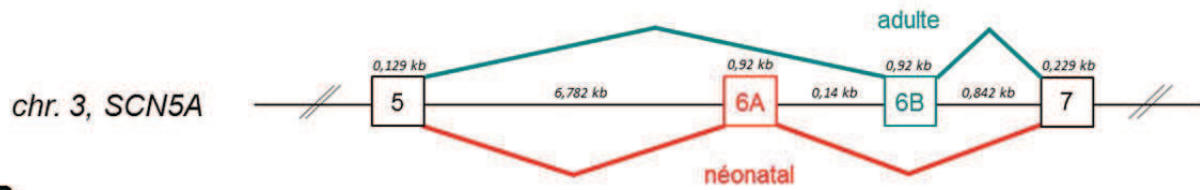
- Les variants non-fonctionnels

$Na_v1.5b$, identifié par RT-PCR dans le cœur de souris, est un variant non fonctionnel caractérisé par une délétion des exons 17 et 18. Il est exprimé faiblement dans le cœur de souris et est absent dans le cœur humain. Un second variant non-fonctionnel, $Na_v1.5f$, a été identifié dans le cerveau et le cœur de rat. Ce variant est le résultat d'une délétion de l'exon 24 codant 18 acides aminés (position : 1416-1433) dans la région du pore en DIII. Des études électrophysiologiques dans des ovocytes de xénope et des cellules HEK293 montrent que ce canal $Na_v1.5f$ est non fonctionnel. De plus, il peut se détecter dans le cerveau chez l'homme. Enfin, les variants d'épissage E28B, E28C et E28D sont des formes tronquées en C-terminale de $Na_v1.5$. Leur expression protéique est limitée à des cas d'arrêt cardiaque (Schroeter *et al.*, 2010). Notons que ces variants ont été détectés par RT-PCR et peuvent être des artéfacts de PCR dus à la structure répétée de l'ARNm *SCN5A*.

3.2.3. Le variant d'épissage néonatal : $Na_v1.5e$

En 2005, deux études indépendantes menées sur une lignée cellulaire de neuroblastome et sur une lignée cellulaire de cancer du sein ont montré l'existence d'un variant dit « néonatal », nommé $Na_v1.5e$ (Fraser *et al.*, 2005 ; Ou *et al.*, 2005). Ce variant est le résultat de l'épissage alternatif de l'exon 6 du gène *SCN5A*, qui a été dupliqué en tandem au niveau de six gènes de la famille Na_v1 (*SCN1A* ; *SCN2A* ; *SCN3A* ; *SCN5A* ; *SCN8A* ; *SCN9A*). Cette duplication conduit à la présence de deux exons, appelés exon 6A et exon 6B, dans le gène. Ces deux exons sont mutuellement exclusifs et codent la région correspondant à la fin du segment S3 et à la totalité du segment S4 du domaine DI (acides aminés 205 à 234).

A



B

EX 6B ATACACAACCTGAATTTGTGGACCTGGGCAATGTCTCAGCCTTACGCACCTTCCGAGTCCTCCGGGCCCTGAAAACCTATATCAGTCATTTCCAG
EX 6A GTATGTATCAGAAAATATAAACTAGGCAATTTGTCGGCTCTTCGAACTTTCAGAGTCCTGAGAGCTCTAAAACTATTTTCAGTTATCCAG

C

EX 6B YTTEFVDLGNVSALRTERVLRALKTISVIS
EX 6A YVSENIKLGNLSALRTERVLRALKTISVIP

Figure 38 : Les exons 6A et 6B mutuellement exclusifs de SCN5A.

A. Schéma des exons 6A et 6B mutuellement exclusifs.

B. Séquences nucléotidiques des exons 6A et 6B de SCN5A. Les nucléotides différents sont indiqués en rouge.

C. Séquences protéiques des exons 6A et 6B de SCN5A. Les acides aminés différents sont indiqués en rouge.

L'épissage alternatif de ces exons est régulé au cours du développement cardiaque. En effet, l'exon 6A amont, appelé aussi exon néonatal codant pour le canal $Na_v1.5e$, est remplacé après la naissance par l'exon 6B aval, appelé exon adulte codant pour le canal $Na_v1.5$. Ainsi, une étude récente montre que l'exon 6A est respectivement exprimé 1,5 fois et 7,5 fois plus dans le cœur de fœtus que dans le cœur de nouveau-nés et d'adultes (Murphy *et al.*, 2012), suggérant que l'expression de $Na_v1.5e$ diminue lors du développement conduisant à l'expression exclusive de $Na_v1.5$ dans le cœur adulte.

Cependant, cette régulation développementale est spécifique du muscle cardiaque et n'existe pas dans le cerveau. En effet, $Na_v1.5e$, qui est le principal variant de $Na_v1.5$ dans le cerveau, ne diminue que légèrement chez l'adulte (Wang *et al.*, 2009 ; Schröeter, 2010).

Les exons 6A et 6B sont de taille identique (92 paires de bases), mais diffèrent par 31 nucléotides (figure 38), générant deux canaux ($Na_v1.5$ et $Na_v1.5e$) qui diffèrent par 7 acides aminés. Parmi ces 7 résidus, la lysine K211 de $Na_v1.5e$, qui remplace l'acide aspartique D211 de $Na_v1.5$, jouerait un rôle important dans les propriétés électrophysiologiques du canal. En effet, il a été proposé que la lysine K211, chargée positivement et située au niveau du lien extracellulaire S3-S4 du domaine DI, soit responsable du décalage des courbes d'activation du canal fœtal $Na_v1.5e$ par rapport à l'isoforme adulte $Na_v1.5$ (Onkal *et al.*, 2008). Ce travail a été confirmé par une seconde étude, qui a mis en évidence un retard d'activation de +9 mV du canal $Na_v1.5e$, mais sans modification de son inactivation ou de sa récupération après inactivation (Walzik *et al.*, 2011). Enfin, en accord avec cette étude, une troisième équipe a également montré un retard d'activation du canal $Na_v1.5e$ (décalage de +10 mV) par rapport à $Na_v1.5$, et ceci sans modification de son inactivation ou de sa récupération après inactivation (Murphy *et al.*, 2012).

3.2.4. Régulations de l'activité du canal à sodium $Na_v1.5$

- Régulation lors de sa synthèse

La synthèse de l'ARNm *SCN5A* est régulée. En effet, le traitement par la mexiletine de cardiomyocytes de rat en culture augmente l'expression d'ARNm de *SCN5A*, (Kang *et al.*, 1997). De même, l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire par un ionophore calcique conduit à une diminution de la quantité de *SCN5A* (Duff *et al.*, 1992) (figure 39).

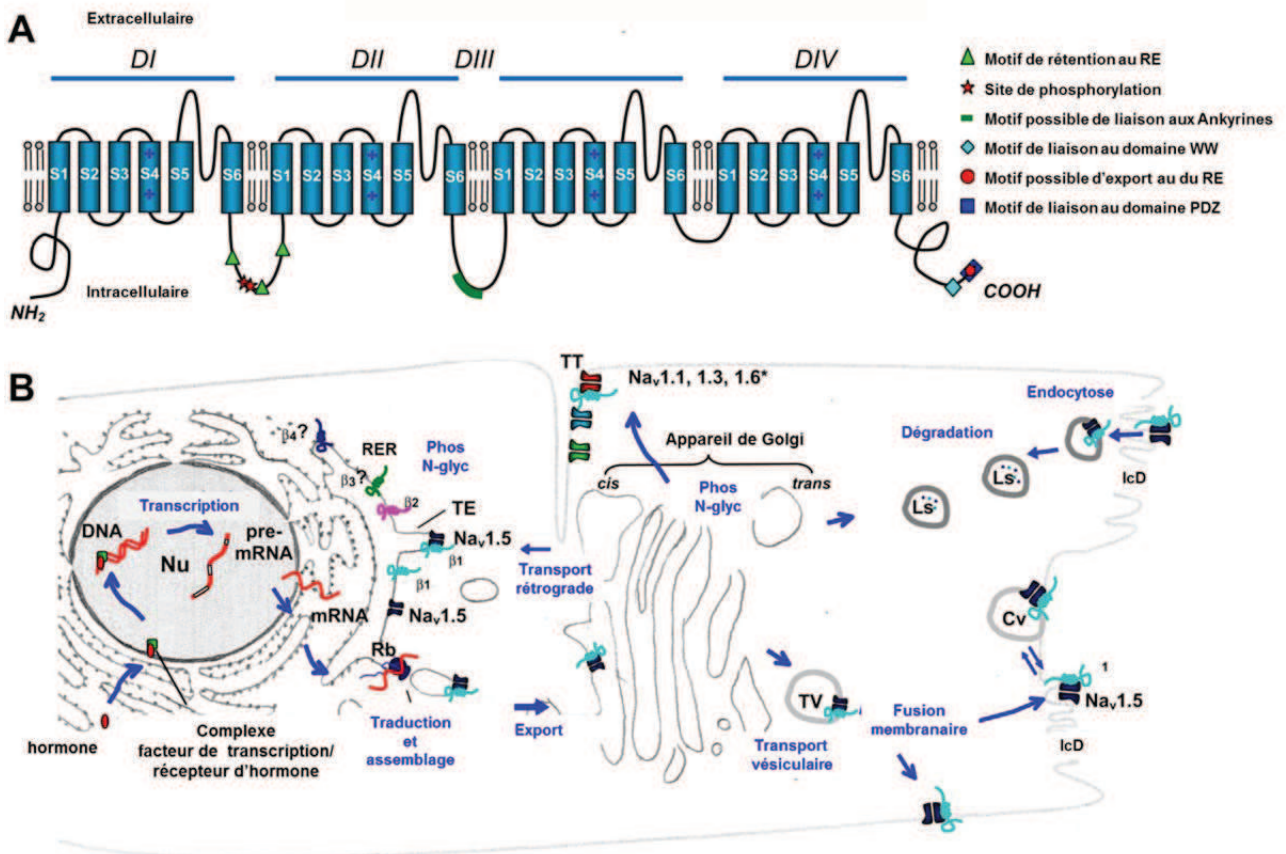


Figure 39 : Régulation de l'expression et du trafic intracellulaire du principal canal à sodium cardiaque $Na_v1.5$.

(adapté de Herfst et al., 2004)

A. Topologie de la sous-unité α de $Na_v1.5$ présentant les motifs de régulation, les sites de fixation potentiels des protéines accessoires et les sites de phosphorylation par les PKA.

B. Représentation schématique du transport et des principaux évènements de régulation. Les isoformes mineures cardiaques $Na_v1.1$, $Na_v1.3$ et $Na_v1.6$, responsables de moins de 5% du courant sodique cardiaque, sont aussi indiquées au niveau de la membrane.

βx : sous-unité β ; Cv: cavéoles ; IcD: disques intercalaires ; Ls: lysosome ; N-glyc: N-glycosylation ; Nu: noyau ; phos: phosphorylation ; RER: réticulum endoplasmique rugueux ; TE: éléments tubulaires ; TT: tubule transverse ; TV: vésicule de transport.

Le transport du réticulum endoplasmique (RE) à l'appareil de Golgi de la protéine Na_v1.5 (SCN5A) fait également l'objet d'une régulation. En effet, la présence de trois motifs de rétention au RE de type RXR au niveau de la principale boucle cytoplasmique reliant DI à DII de Na_v1.5 peut conduire à une inhibition du transport de ce canal vers le Golgi (Zhou *et al.*, 2002) (figure 39). De plus, la phosphorylation du second motif RXR par la protéine Kinase A (PKA) augmente le courant sodique, suggérant que cette phosphorylation du canal abolit sa rétention au niveau du RE. Cependant, la suppression du site RXR conduit à une diminution du courant sodique suggérant une fonction différente de ce site. Il pourrait alors réguler le recrutement du canal au niveau des cavéoles. D'autres motifs à l'extrémité C-terminale, tels que le motif DXE ou le motif liant le domaine PDZ, pourraient aussi être impliqués dans le transport du canal du RE au Golgi. En effet, le motif de Na_v1.5, liant le domaine PDZ, pourrait lier le domaine PDZ de la syntrophine γ 2, lui permettant ainsi d'interagir avec le cytosquelette d'actine (Herfst *et al.*, 2004). Il est à noter que des mutations des sites de régulation du trafic de Na_v1.5, qui entraînent un déficit en canal à la surface cellulaire, peuvent conduire à des défauts cardiaques tels que le syndrome de Brugada ou des troubles de la conduction cardiaque (CCD) (Baroudi *et al.*, 2001 ; Baroudi *et al.*, 2002 ; Bezzina *et al.*, 2003 ; Herfst *et al.*, 2003 ; Probst *et al.*, 2003).

Enfin, le nombre de canaux à la surface de la cellule peut être régulé par ubiquitinylation. En effet, il a été montré que l'expression de l'ubiquitine ligase Nedd4 réduit de 40% le courant sodique dans des cardiomyocytes de rat. *Via* son domaine WW (contenant deux tryptophanes), Nedd4 interagirait avec le motif PY (riche en proline) de Na_v1.5, entraînant son ubiquitinylation puis son internatation, ce qui conduirait à sa dégradation ou à son recyclage (Abriel *et al.*, 2000). L'observation d'une fraction de canaux Na_v1.5 ubiquitinylés dans le cœur de souris renforce ce modèle (van Bemmelen *et al.*, 2004).

- Régulation de l'activité du canal Na_v1.5 au niveau de la membrane

La concentration de calcium intracellulaire [Ca²⁺] régule l'activité des canaux Na_v1.5 *via* la calmoduline (CaM) et la CaMKII. En effet, la calmoduline peut interagir avec Na_v1.5 au niveau de deux sites : le motif IQ localisé en C-terminal de Na_v1.5, et le domaine CaMBD (CalModulin Binding Domain) localisé au niveau de la boucle intracellulaire reliant DIII à DIV. Lorsque la concentration de calcium intracellulaire est à un niveau basal, la CaM est en interaction avec le motif IQ du canal. Cependant, lorsque cette concentration augmente, le Ca²⁺ se fixe à la CaM entraînant des changements conformationnels et la CaM se lie alors aux

Protéine	Effets sur Na _v 1.5	Motifs de liaison sur Na _v 1.5
Syntrophine	adaptation au complexe dystrophine/ utrophine	motif en C-ter liant le domaine PDZ
SAP97	ancrage à la membrane plasmique	motif en C-ter liant le domaine PDZ
Ankyrine-G	ciblage à la membrane plasmique	boucle intracellulaire DII-DIII
MOG1	implication dans le transport à la membrane plasmique	boucle intracellulaire DII-DIII
α-actinine 2	implication dans le transport à la membrane plasmique	boucle intracellulaire DIII-DIV
Plakophiline-2	sa déplétion induit une réduction du courant sodique	ND
Desmogléine-2	réduction du courant sodique	ND
PTPH1	phosphorylation et modulation de l'activité du canal	motif en C-ter liant le domaine PDZ
Nedd4-like E3 ubiquitine ligase	ubiquitinylation et internalisation	motif PY en C-ter
Calmoduline kinase II	phosphorylation et modulation de l'activité du canal	boucle intracellulaire DI-DII
Protéines FGF	modulation de l'activité du canal et de la densité des canaux à la membrane	C-ter
Calmoduline	modulation de l'activité du canal en fonction de la [Ca ²⁺]	motif IQ en C-ter et domaine CaMBD
14-3-3η	modulation de l'inactivation du canal	boucle intracellulaire DI-DII
Cavéoline-3	mutation de la cavéoline-3 induit un courant sodique persistant	ND
GPD1-L	mutation de GPD1-L induit une diminution du courant sodique	ND
Téléthonine	modulation de l'activation dépendante du voltage	ND
ZASP	mutation de ZASP induit un retard d'activation du canal	ND

Tableau 9 : Récapitulatif des protéines régulant l'expression ou l'activité de SCN5A.

(adapté de Shy et al., 2013)

Les sous-unités β n'apparaissent pas dans ce tableau.

SAP97: Synapse-Associated Protein 97 ; PTPH1: Protein Tyrosine Phosphatase ; MOG1: Multi-copy suppressor Of Gsp1 ; FGF: Fibroblast Growth Factor ; GPD1-L: Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase-Like protein ; ZASP: Z-band-Alternatively Spliced-PDZ motif protein ; ND: Non Déterminé.

deux motifs IQ et CaMBD de Na_v1.5. Ceci réduit la capacité d'inactivation du canal Na_v1.5, augmentant ainsi le courant sodique (Sarhan *et al.*, 2009 ; Chagot *et al.*, 2011 ; Sorensen, 2013).

De même, la sérine-thréonine kinase dépendante de Ca²⁺/Calmoduline (CaMKII) régule le fonctionnement de Na_v1.5. En effet, à faible concentration de calcium intracellulaire, la CaMKII est sous forme d'holoenzyme inactive ; mais lorsque cette concentration augmente, le calcium se fixe à la CaM, qui interagit alors avec le domaine régulateur de la CaMKII et l'active. La CaM s'autophosphoryle puis phosphoryle la sérine S571 de la boucle reliant DI à DII de Na_v1.5, réduisant ainsi le courant sodique (Rokita and Anderson, 2012). Une augmentation de la phosphorylation de CaMKII et de Na_v1.5 a été observée dans des échantillons de cœur provenant de personnes atteintes d'insuffisance cardiaque (Koval *et al.*, 2012).

La protéine 14-3-3, connue pour être impliquée dans le transport à la membrane cellulaire de protéines membranaires, ne jouerait pas de rôle dans le transport de Na_v1.5. Cependant, cette protéine est capable d'interagir avec la partie N-terminale de la boucle intracellulaire liant DI à DII de Na_v1.5 et d'affecter ses propriétés biophysiques telles que son inactivation et son retour après inactivation (Abriel, 2010). De même, d'autres protéines telles que la Cavéoline 3, l' α 1 syntrophine, la GPD1L (« glycerol-3-phosphate deshydrogenase like »), la PTPH1 (« Protein tyrosine phosphatase 1 »), la téléthonine et la plakophiline-2 interagiraient et réguleraient l'activité du canal Na_v1.5. Par exemple, la plakophiline-2, localisée au niveau des desmosomes des disques intercalaires, interagirait avec le canal Na_v1.5 et la connexine 43, servant ainsi d'intermédiaire entre ces deux protéines. Toutefois, le rôle physiologique de ces interactants reste à démontrer (Abriel, 2010).

Enfin, il a été retrouvé chez un patient atteint du syndrome de Brugada, une mutation de Na_v1.5 au niveau de son domaine de liaison à l'ankyrine-G (*ANK3*), conduisant à la perte de liaison entre ces deux protéines. De plus, la déplétion de l'ankyrine-G, une protéine permettant l'attachement d'une protéine membranaire à la membrane plasmique, entraîne une diminution de l'expression de Na_v1.5 (Mohler *et al.*, 2004). L'ensemble de ces protéines régulant le canal Na_v1.5 est présenté dans le [tableau 9](#).

- Régulation de l'activité du canal Na_v1.5 par les sous-unités β

Les quatre sous-unités β modulent l'expression à la membrane plasmique ainsi que l'activité du canal Na_v1.5, d'où leur nom de sous-unités auxiliaires. En effet, il a été décrit que

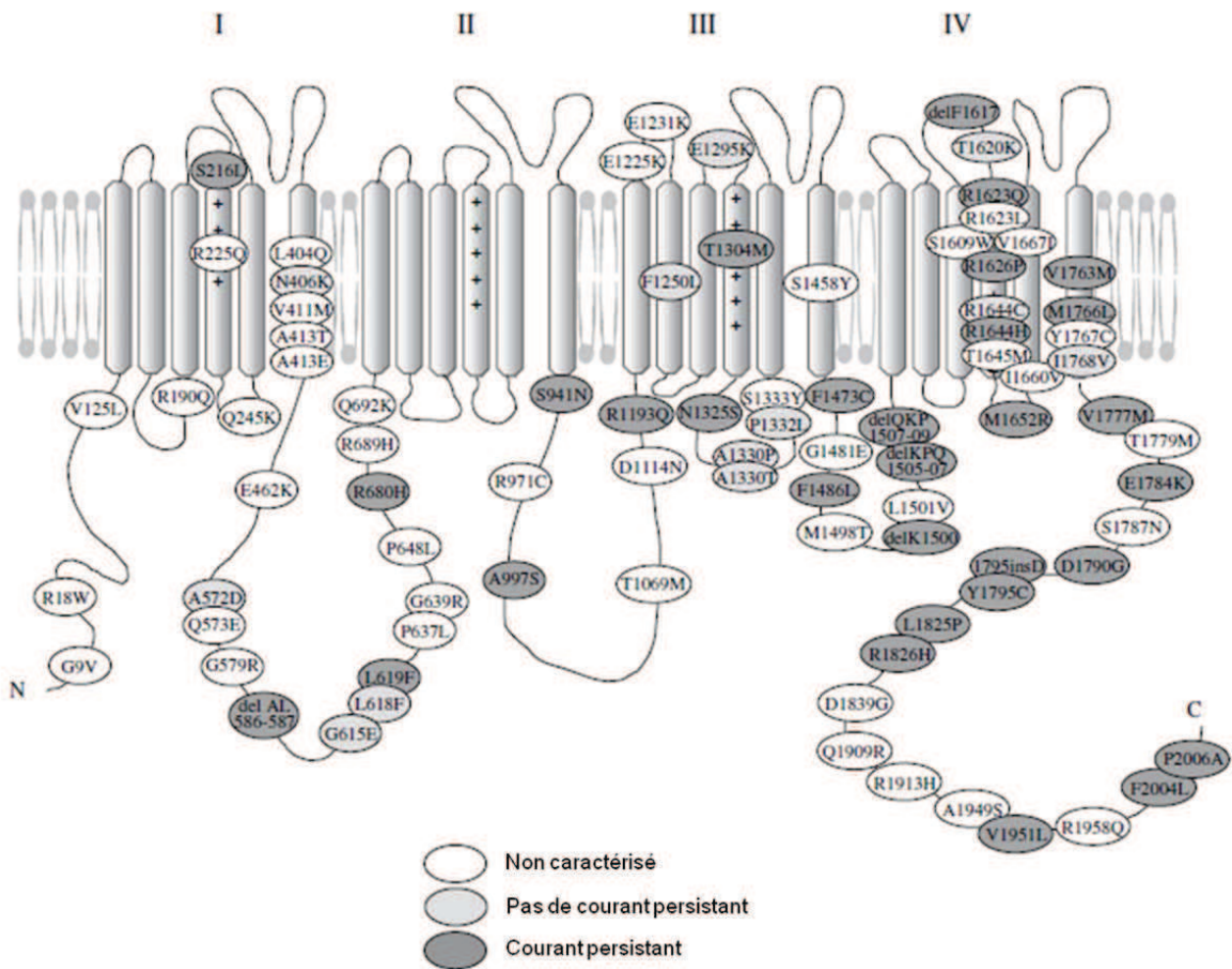


Figure 40 : Mutations de SCN5A associées au syndrome du QT long de type 3.

(adapté de Zimmer et al., 2008)

De nombreuses mutations conduisant à un courant persistant touchent des résidus au niveau du segment S4 du domaine IV (recevant le signal électrique qui permet le début de l'inactivation), de la boucle d'inactivation reliant le domaine DIII à DIV, et de la partie C-terminale intracellulaire du canal à sodium.

des mutations des sous-unités β conduisent à des troubles cardiaques liés à une altération de l'expression et l'activité du canal sodique. Les sous-unités $\beta 1$ et $\beta 1B$, interagissent avec la boucle reliant S5 et S6 des domaines DI et DIV de la sous-unité α du canal et augmenteraient le courant sodique. Ainsi, des mutations dans le gène *SCN1B*, conduisent à des CCD, des fibrillations auriculaires (AF) et au syndrome de Brugada (SB). Des mutations dans le gène *SCN2B* conduisent à des AF, celles dans le gène *SCN3B* à des fibrillations ventriculaires et SB, et celles dans le gène *SCN4B* conduisent au syndrome du QT long (Medeiros-Domingo *et al.*, 2007 ; Watanabe *et al.*, 2008 ; Watanabe *et al.*, 2009 ; Valdivia *et al.*, 2010 ; Rook *et al.*, 2012). En accord avec ces observations, les expériences de patch clamp montrent que la co-expression de la sous-unité $\beta 1$ avec $Na_v1.5$ entraîne une augmentation de la densité de courant, un déplacement négatif de la courbe d'activation (indiquant un gain de fonction de l'activité du canal), ainsi qu'un retard de la courbe d'inactivation (indiquant un gain de fonction de l'activité du canal). De même, la sous-unité $\beta 3$ conduit à une augmentation de la densité de courant passant par $Na_v1.5$. Au contraire, les sous-unités $\beta 2$ et $\beta 4$ ne présentent pas d'effet sur la densité de courant passant par $Na_v1.5$.

3.3. Les mutations de *SCN5A* à l'origine de symptômes cardiaques

Plus d'une centaine de mutations du gène *SCN5A* sont associées à des troubles du rythme et de la conduction cardiaque divers tels que le syndrome du QT long, certaines formes de fibrillation auriculaire, le syndrome de Brugada et des blocs sino-auriculaires congénitaux. Dans ce manuscrit, j'aborderai principalement les trois types de maladies les plus classiquement associées à des mutations de *SCN5A* : le syndrome du QT long de type 3, le syndrome de Brugada et le retard de conduction cardiaque (syndrome de Lèv-Lenègre ou CCD : « Cardiac Conduction Disease »).

- Le syndrome du QT long de type 3

Plus de quatre-vingt mutations dans *SCN5A* sont connues pour être reliées au syndrome du QT long de type 3 (LQT3) (figure 40). Comme son nom l'indique, le LQT3 est détectable au niveau de l'ECG par une prolongation de l'intervalle QT, et est caractérisé par une repolarisation ventriculaire prédisposant à des torsades de pointes. Les patients atteints de LQT3 présentent donc des syncopes récurrentes dues à des tachycardies ventriculaires qui peuvent conduire à une mort soudaine. Le syndrome du LQT3 est dû à des mutations au

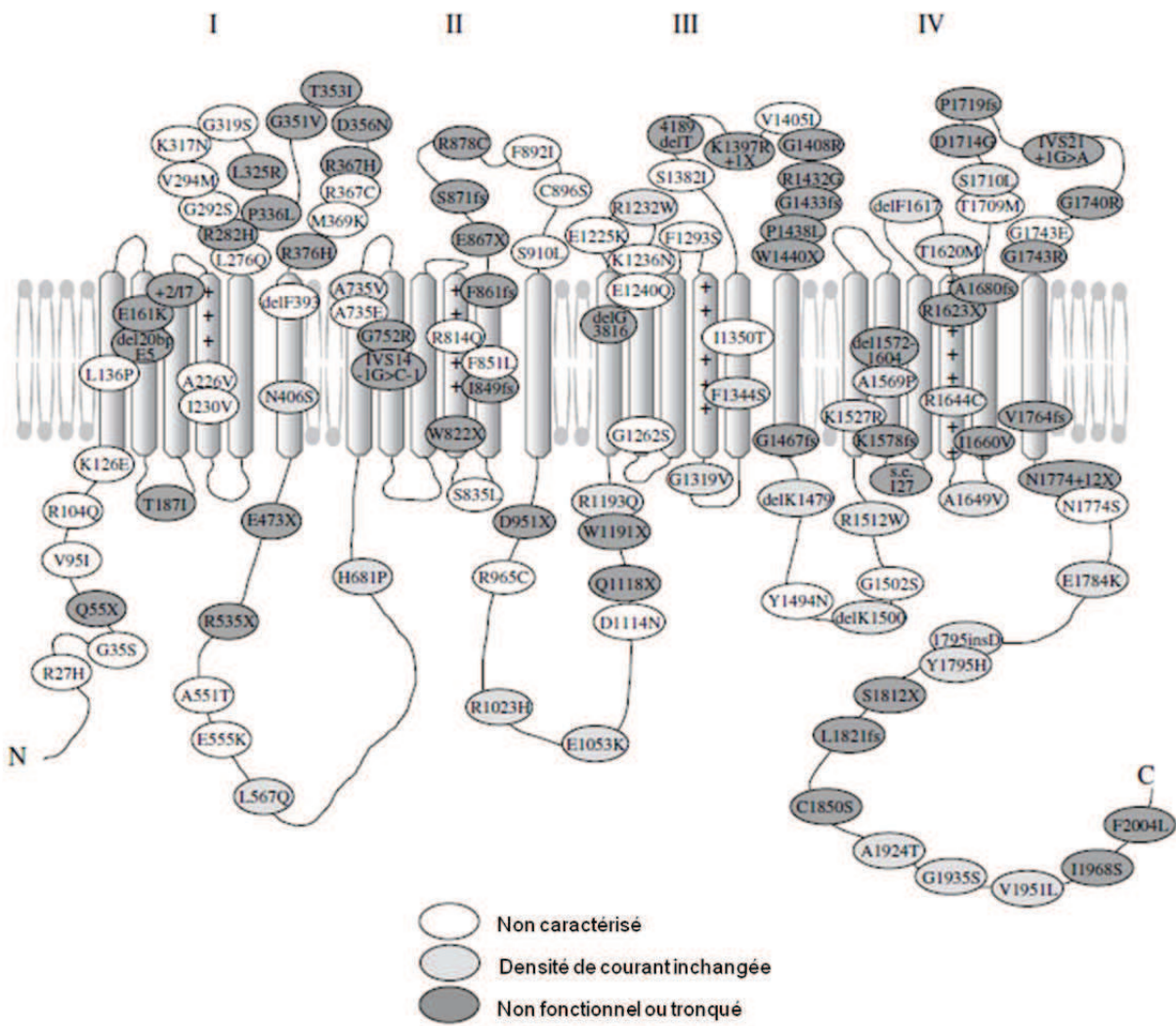


Figure 41 : Mutations de SCN5A associées au syndrome de Brugada.
 (adapté de Zimmer et al., 2008)

niveau de la boucle d'inactivation reliant les domaines DIII et DIV et la partie C-terminale du canal $Na_v1.5$. Ces mutations sont dites à « gain de fonction » du canal et empêchent l'inactivation de celui-ci, conduisant ainsi à une prolongation du courant sodique alors nommé « persistant » (Zimmer *et al.*, 2008).

- Le syndrome de Brugada

Le second groupe, composé de plus de 100 mutations dans le gène *SCN5A*, conduit au syndrome de Brugada (SB) (Wilde and Brugada, 2011; Lippi, 2012). Celui-ci est caractérisé par des tachycardies ventriculaires entraînant des syncopes et une mort soudaine, souvent lors du sommeil. Ce trouble cardiaque est caractérisé sur un ECG par une élévation du segment ST au niveau des dérives précordiales droites V1, V2 et V3. Les mutations de *SCN5A* à l'origine de ce syndrome sont réparties de façon homogène au niveau du canal (figure 41). Ces mutations sont dites à « perte de fonction » du canal, et altèrent soit l'activation du canal, soit la capacité d'inactivation du canal, conduisant ainsi à une réduction du courant sodique entrant (Zimmer *et al.*, 2008). Notons que le syndrome de mort subite inexplicée (SUNDS : « Sudden Unexpected Nocturnal Death Syndrome »), touchant principalement des jeunes hommes d'origine asiatique, est causé par des mutations similaires de *SCN5A*, et il est probable que ces deux appellations, le syndrome de Brugada dans des populations d'origine européenne, et le syndrome de mort subite inexplicée en Asie, décrivent une pathologie similaire (Vatta *et al.*, 2002). De même, le syndrome de mort subite du nourrisson (« SUDC Sudden Unexplained Death in Childhood » et « SIDS Sudden Infant Death Syndrome ») pourrait représenter des formes juvéniles du syndrome de Brugada.

- Le syndrome de Lev-Lenègre

Le dernier groupe de mutations de *SCN5A* est à l'origine de retard de conduction cardiaque, aussi appelé syndrome de Lev-Lenègre ou CCD (« Cardiac Conduction Disease »). Ce syndrome est caractérisé par des défauts de conduction du courant électrique au niveau des oreillettes et des ventricules. Ces mutations sont dites de « perte de fonction » du canal $Na_v1.5$ et entraînent soit une réduction drastique du courant sodique, soit une réduction du courant sodique associée à des déplacements des courbes d'activation ou d'inactivation. Cette maladie est définie comme une prolongation des paramètres de conduction dans le système de conduction His-Purkinje avec une prolongation de l'intervalle PQ et un étalement du

complexe QRS mais pas d'élévation du segment ST ou de prolongation de QT sur l'électrocardiogramme. Signalons qu'une même mutation de *SCN5A* peut conduire, dans la même famille, à des troubles de la conduction cardiaque chez certains patients, et à un syndrome de Brugada chez d'autres patients (Kyndt *et al.*, 2001 ; Probst *et al.*, 2006).

Pour conclure, le canal sodique cardiaque $Na_v1.5$, est soumis à de nombreuses régulations, notamment par épissage alternatif, et des mutations de ce gène conduisent à des troubles du rythme et de la conduction cardiaque proches de ceux observés chez les patients atteints de dystrophie myotonique.

OBJECTIFS DE LA THESE

A mon arrivée au laboratoire, les mutations et les mécanismes moléculaires à l'origine des dystrophies myotoniques étaient établis. En effet, les DM sont des maladies à gain de fonction d'ARN dont le modèle proposé fait intervenir respectivement une perte et un gain de fonction des facteurs d'épissage alternatif MBNL1 et CUGBP1. Ainsi, la dérégulation de ces deux protéines conduit à des altérations de l'épissage alternatif dont certains expliquent des symptômes des patients DM. Ainsi, l'altération de l'épissage alternatif du canal chlore (*CLCN1*) est responsable de la myotonie, tandis que celles de l'amphiphisine 2 (*BINI*) et du canal calcique squelettique Cav1.1 (*CACNA1S*) sont associées à la faiblesse musculaire.

Cependant, les causes moléculaires à l'origine des atteintes cardiaques des patients DM étaient inconnues. En effet, et bien qu'une altération de l'épissage alternatif de la troponine T cardiaque (*cTNT*) ait été identifiée dès 1999 dans le cœur des patients DM, celle-ci ne permet pas d'expliquer les défauts de conduction et de rythme cardiaques. C'est pourquoi, durant ma thèse, nous avons tenté de comprendre les causes moléculaires à l'origine de ces atteintes cardiaques. Pour cela, nous avons identifié par des approches de puces à ADN et de séquençage à haut débit de nouveaux ARNs codants et non codants dérégulés dans le cœur des patients DM.

Parmi ces différents ARNs, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'ARNm *SCN5A* et au miARN, miR-1. En effet, le rôle essentiel des miARNs dans le développement et le fonctionnement de différents tissus, dont le cœur, nous a conduits à orienter nos recherches sur les mécanismes moléculaires et les conséquences physiologiques de la dérégulation de miR-1.

Puis, je me suis intéressée à l'épissage alternatif des exons 6A/6B du principal canal sodique cardiaque *SCN5A*. Ce gène est particulièrement intéressant pour l'étude des DM car des mutations de *SCN5A* sont associées à des troubles de la conduction et du rythme cardiaque, qui s'apparentent aux signes cliniques observés chez les patients DM. J'ai alors étudié le mécanisme moléculaire de régulation de l'épissage des exons 6A et 6B de *SCN5A*, puis les conséquences physiologiques de cette altération pour le cœur des patients DM.

RESULTATS

Publication 1:

Mis-regulation of miR-1 processing is associated with heart defects in Myotonic Dystrophy

Frédérique Rau, Fernande Freyermuth, Charlotte Fugier, Jean-Philippe Villemin, Marie-Christine Fisher, Bernard Jost, Doulaye Dembele, Geneviève Gourdon, Annie Nicole, Denis Duboc, Karim Wahbi, John W. Day, Harutoshi Fujimura, Masanori P. Takahashi, Didier Auboeuf, Natacha Dreumont, Denis Furling, Nicolas Charlet-Berguerand.

Nature Structural & Molecular Biology

Accepté le 22 mars 2011

Paru le 19 juin 2011

Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy

Frédérique Rau¹⁻⁴, Fernande Freyermuth¹⁻⁴, Charlotte Fugier¹⁻⁴, Jean-Philippe Villemain⁵, Marie-Christine Fischer¹⁻⁴, Bernard Jost¹⁻⁴, Doulaye Dembele¹⁻⁴, Geneviève Gourdon⁶⁻⁸, Annie Nicole⁶⁻⁸, Denis Duboc^{8,9}, Karim Wahbi¹⁰⁻¹³, John W Day¹⁴, Harutoshi Fujimura¹⁵, Masanori P Takahashi¹⁶, Didier Auboeuf¹⁰, Natacha Dreumont¹⁻⁴, Denis Furling¹⁰⁻¹³ & Nicolas Charlet-Berguerand¹⁻⁴

Myotonic dystrophy is an RNA gain-of-function disease caused by expanded CUG or CCUG repeats, which sequester the RNA binding protein MBNL1. Here we describe a newly discovered function for MBNL1 as a regulator of pre-miR-1 biogenesis and find that miR-1 processing is altered in heart samples from people with myotonic dystrophy. MBNL1 binds to a UGC motif located within the loop of pre-miR-1 and competes for the binding of LIN28, which promotes pre-miR-1 uridylation by ZCCHC11 (TUT4) and blocks Dicer processing. As a consequence of miR-1 loss, expression of GJA1 (connexin 43) and CACNA1C (Cav1.2), which are targets of miR-1, is increased in both DM1- and DM2-affected hearts. CACNA1C and GJA1 encode the main calcium- and gap-junction channels in heart, respectively, and we propose that their misregulation may contribute to the cardiac dysfunctions observed in affected persons.

Myotonic dystrophy, which is the most common muscular dystrophy in adults, is characterized by multiple symptoms that include muscle weakness, myotonia, cardiac defects, cataracts, insulin resistance and neuropsychiatric impairment. Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is caused by an expansion of CTG repeats located within the 3' noncoding region of the *DMPK* gene¹⁻³, whereas myotonic dystrophy type 2 (DM2) is caused by an expansion of CCTG repeats located within the first intron of the *ZNF9* (also known as *CNBP*) gene⁴. The mutant RNA, which contains 100 to several thousand CUG or CCUG repeats, is retained in nuclear aggregates that sequester the MBNL1 RNA binding protein⁵⁻⁸. Furthermore, the expression of CUGBP1 (also known as *CELF1*) is increased in some tissues of DM1-affected people^{9,10}. MBNL1 and CUGBP1 are splicing regulators, and their alterations in people with myotonic dystrophy result in misregulation of the alternative splicing of several pre-mRNAs¹¹⁻¹³, including those encoded by the muscle chloride channel gene *CLCN1* and the insulin receptor gene *INSR*, resulting in myotonia and insulin resistance, respectively¹⁴⁻¹⁷. However, the molecular mechanisms underlying the cardiac defects, which affect 80% of people with DM1 and DM2 and represent the second most common cause of their death, are unclear. Cardiac involvements in affected persons¹⁸⁻²¹ and in mouse models^{22,23} are characterized by nonspecific changes such as interstitial fibrosis and fatty infiltration, which lead to degeneration of the conduction system and to fatal atrioventricular blocks.

Furthermore, people with myotonic dystrophy are also characterized by atrial and ventricular tachyarrhythmias of unknown causes, which may explain the occurrences of sudden cardiac death observed in these people despite pacemaker implants¹⁸⁻²¹.

MicroRNAs (miRNAs) are small, conserved, noncoding RNAs that are important components of post-transcriptional gene regulation and are involved in the control of many fundamental processes, including cardiac development and function. In particular, the expression of the miR-1 family, which comprises miR-1-1 and miR-1-2, is altered in mouse models and people with heart diseases²⁴⁻²⁷. Furthermore, overexpression of miR-1 in normal or infarcted rat heart exacerbates electrophysiological abnormalities²⁶, whereas ablation of the *miR-1-2* (*Mir1a-2*) gene in mice results in arrhythmias, cardiac conduction defects and sudden cardiac death²⁷, demonstrating that the heart needs tight regulation of miR-1. Here we set out to test whether or not miRNAs are misregulated in myotonic dystrophies.

RESULTS

The processing of miR-1 is altered in myotonic dystrophy

In a preliminary profiling analysis of the expression of miRNAs in primary differentiated muscle cells isolated from unaffected persons and those with DM1 (**Supplementary Fig. 1a,b** and **Supplementary Data**), we identified a robust misexpression of miR-1. Because inactivation of *miR-1-2* in mice did not result in an overt phenotype in

¹Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Illkirch, France. ²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U964, Illkirch, France. ³Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR7104, Illkirch, France. ⁴Strasbourg University, Illkirch, France. ⁵Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U590, Lyon, France. ⁶Necker Hospital, Paris, France. ⁷Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U781, Paris, France. ⁸Université Paris 5, Paris, France. ⁹Cochin Hospital, Paris, France. ¹⁰Université Pierre et Marie Curie (UM76), Paris, France. ¹¹Institut de Myologie, Paris, France. ¹²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U974, Paris, France. ¹³Centre National de la Recherche Scientifique UMR7215, Paris, France. ¹⁴University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota, USA. ¹⁵Department of Neurology, Toneyama Hospital, Osaka, Japan. ¹⁶Department of Neurology, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan. Correspondence should be addressed to N.C.-B. (ncharlet@igbmc.fr).

Received 14 September 2010; accepted 7 April 2011; published online 19 June 2011; doi:10.1038/nsmb.2067

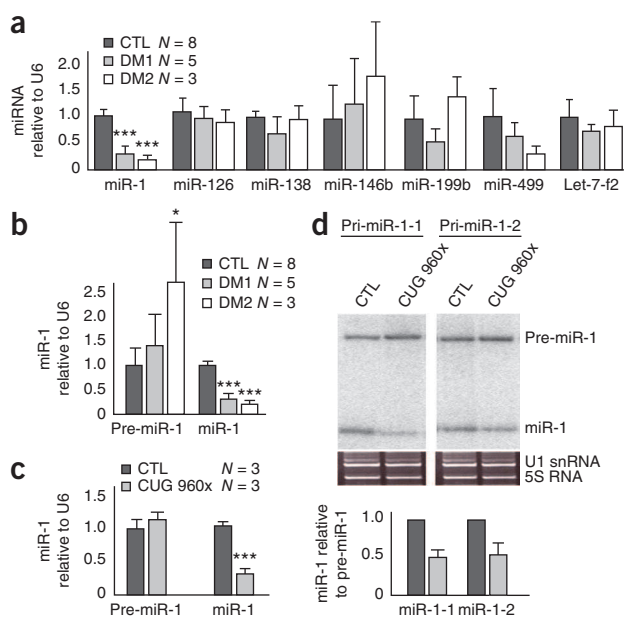


Figure 1 The processing of miR-1 is altered in myotonic dystrophies. (a) Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis of the expression of mature miR-1, miR-126, miR-138, miR-199 and miR-499 relative to the U6 small nuclear (sn) RNA in heart samples of adults with DM1 or DM2 and in control (CTL) heart samples from 2 unaffected persons, 1 person with dilated cardiomyopathy and 5 people with ALS. $***P < 0.001$. (b) qRT-PCR analysis of the expression of pre-miR-1 and mature miR-1 relative to the U6 snRNA in heart samples of control (2 unaffected, 1 with dilated cardiomyopathy and 5 with ALS), DM1-affected and DM2-affected subjects. $*P < 0.05$, $***P < 0.001$. (c) qRT-PCR analysis of the expression of pre-miR-1 and mature miR-1 in H9C2 rat cardiomyocytes differentiated for 6 days and infected with recombinant adenovirus (MOI 100) expressing GFP (CTL) or 960 CUG repeats (CUG). The mean of at least three independent infections is depicted as the percentage of mature or pre-miR-1 relative to the U6 snRNA. Error bars indicate s.d. $***P < 0.001$. (d) 5 μ g of total RNA extracted from HeLa cells co-transfected with ectopic pri-miR-1-1 or pri-miR-1-2 minigenes and a plasmid expressing either no (CTL) or 960 CUG repeats (CUG) were analyzed by northern blot analysis using an antisense miR-1 [γ - 32 P]-labeled probe. The mean of at least three independent transfections is depicted as the percentage of mature miR-1 relative to pre-miR-1. Ethidium bromide staining demonstrates equal loading. Error bars indicate s.d.

nonregenerating skeletal muscle but did cause cardiac dysfunction²⁷, we quantified miR-1 expression in heart samples from people with DM1 and in unaffected individuals. Quantitative RT-PCR demonstrated a significant reduction in expression of miR-1 ($P = 1.8 \times 10^{-6}$) in DM1 heart tissue (Fig. 1a), whereas the expression of miR-126, miR-138, miR-199, miR-208, miR-499 and Let-7-f2 was not altered. Additional northern blot analysis confirmed decreased expression of miR-1 in DM1 heart tissue (Supplementary Fig. 1c). Next, miR-1 expression was examined in myotonic dystrophy type 2, which undergoes cardiac alterations similar to those in DM1 (ref. 28). Quantitative RT-PCR demonstrated a significant ($P < 0.001$) reduction in expression of miR-1 in heart samples from people with DM1 and DM2 but no alteration in heart samples from those with amyotrophic lateral sclerosis (Fig. 1a), suggesting that the expression of miR-1 is specifically altered in both forms of myotonic dystrophy.

miRNAs are initially transcribed by RNA polymerase II as primary miRNAs (pri-miRNAs), which are processed into precursor miRNAs (pre-miRNAs) by Drosha complexed with DGCR8 (also called Pasha)^{29–31} and exported from the nucleus to the cytoplasm by exportin 5 (XPO5)^{32,33}. Pre-miRNAs are hairpin-shaped RNAs of approximately 70 nucleotides (nt) that are processed into mature miRNAs by Dicer^{34,35}, a cytoplasmic endoRNase of the RNase type III family. Expanded CUG or CCUG repeats interfere *in trans* with the alternative splicing of other pre-messenger RNAs^{14–17}. To investigate whether expanded CUG or CCUG repeats also interfere *in trans* with the processing of miR-1 in myotonic dystrophic heart tissues, we quantified the expression of pre-miR-1 and mature miR-1. Whereas the levels of pre-miR-1 were normal or slightly increased, the quantities of mature miR-1 were decreased in heart samples of people with DM1 and people with DM2 (Fig. 1b), suggesting that pre-miR-1 is normally produced but incorrectly processed in individuals with myotonic dystrophy. In contrast, the expression of pre- and mature miR-138 and pre- and mature Let7-f2 were normal, indicating that the misregulation of the processing of pre-miR-1 was specific and was not the result of a global alteration of miRNA biogenesis (Supplementary Fig. 1d).

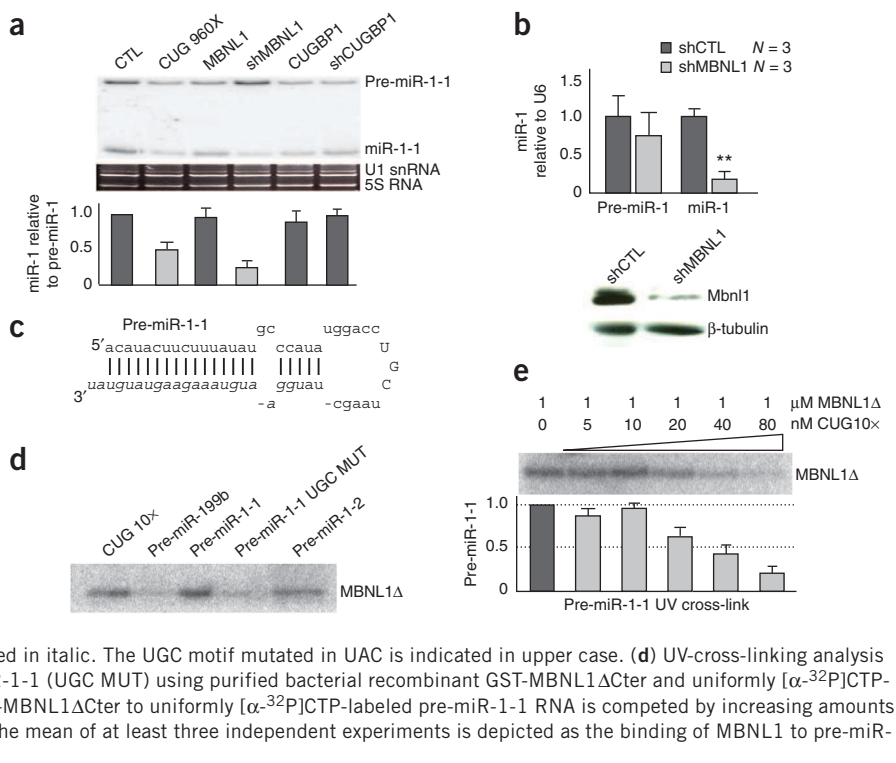
To test whether the expression of expanded CUG repeats directly altered the processing of pre-miR-1, we engineered an adenovirus expressing 960 expanded CUG repeats and infected rat H9C2

cardiomyocytes, which express endogenous miR-1. RNA FISH coupled to immunofluorescence analysis confirmed that >90% of the cardiomyocytes were infected and expressed expanded CUG repeats, which sequestered endogenous Mbn1 within nuclear aggregates (Supplementary Fig. 1e). In CUG-infected cardiomyocytes, the expression of mature miR-1 was decreased, whereas that of pre-miR-1 was not altered (Fig. 1c). This misregulation of pre-miR-1 processing was specific, as the expression of mature and pre-miR-138 or of mature and pre-Let7-f2 was normal (Supplementary Fig. 1f). The miR-1 family includes two paralogs expressed in heart tissue, miR-1-1 and miR-1-2, encoded by two different genes but expressing identical mature miRNAs, which cannot be differentiated by northern blot or quantitative PCR with reverse transcription (RT-qPCR) (Supplementary Fig. 1g). To rule out any transcriptional regulation and to determine whether expanded CUG repeats alter the processing of pre-miR-1-1, pre-miR-1-2 or both, we cloned human pri-miR-1-1 and pri-miR-1-2 under the control of a cytomegalovirus (CMV) promoter. Coexpression of ectopic pri-miR-1-1 or pri-miR-1-2 minigene in HeLa cells, which do not express endogenous miR-1, with a vector expressing expanded CUG repeats altered both pre-miR-1-1 and pre-miR-1-2 processing, resulting in decreased expression of mature miR-1-1 and miR-1-2 (Fig. 1d). As a negative control, expression of expanded CUG repeats had no substantial effect on the processing of the ectopically expressed pre-miR-16 (Supplementary Fig. 1h). Overall, these data demonstrate that the processing of the miR-1 family is altered in the hearts of people with DM1 or DM2, and that expression of expanded CUG repeats is sufficient to trigger that alteration.

MBNL1 regulates the processing of miR-1

Because expanded CUG repeats alter MBNL1 and CUGBP1 functions, we tested whether these proteins regulate the processing of pre-miR-1. Depletion of MBNL1 by short hairpin RNA (shRNA) mimicked the action of CUG repeats and altered the processing of ectopically expressed pri-miR-1-1 or pri-miR-1-2 minigenes, resulting in lower quantities of mature miR-1-1 or miR-1-2 (Fig. 2a and data not shown). These results were confirmed with two other shRNAs directed against *MBNL1* (Supplementary Fig. 2a). In contrast, overexpression or depletion of CUGBP1 had little effect on

Figure 2 MBNL1 regulates the processing of miR-1. **(a)** Northern blot analysis of RNA extracted from HeLa cells co-transfected with ectopic pri-miR-1-1 minigene and a plasmid expressing either no CTG (CTL), 960 CUG repeats (CUG), MBNL1, CUGBP1 or shRNA directed against *MBNL1* (shMBNL1 #1) or against *CUGBP1* (shCUGBP1). The mean of at least three independent transfections is depicted as the percentage of mature miR-1 relative to pre-miR-1. Error bars indicate s.d., and ethidium bromide staining demonstrates equal loading. **(b)** Top, qRT-PCR analysis of the expression of endogenous pre-miR-1 and mature miR-1 in H9C2 rat cardiomyocytes infected with recombinant adenovirus expressing an shRNA against *LacZ* (shCTL) or against *Mbn1* (shMBNL1). The mean of at least three independent infections is depicted as the percentage of mature or pre-miR-1 relative to the U6 snRNA. Error bars indicate s.d. $**P < 0.01$. Bottom, *Mbn1* depletion was confirmed by western blotting. **(c)** Sequence of the wild-type human pre-miR-1-1. Mature miR-1 is indicated in italic. The UGC motif mutated in UAC is indicated in upper case. **(d)** UV-cross-linking analysis of pre-miR-1-1, pre-miR-1-2 and mutated pre-miR-1-1 (UGC MUT) using purified bacterial recombinant GST-MBNL1 Δ Cter and uniformly [α - 32 P]CTP-labeled RNAs. **(e)** UV-cross-linking binding of GST-MBNL1 Δ Cter to uniformly [α - 32 P]CTP-labeled pre-miR-1-1 RNA is competed by increasing amounts of unlabeled RNA composed of 10 CUG repeats. The mean of at least three independent experiments is depicted as the binding of MBNL1 to pre-miR-1. Error bars indicate s.d.

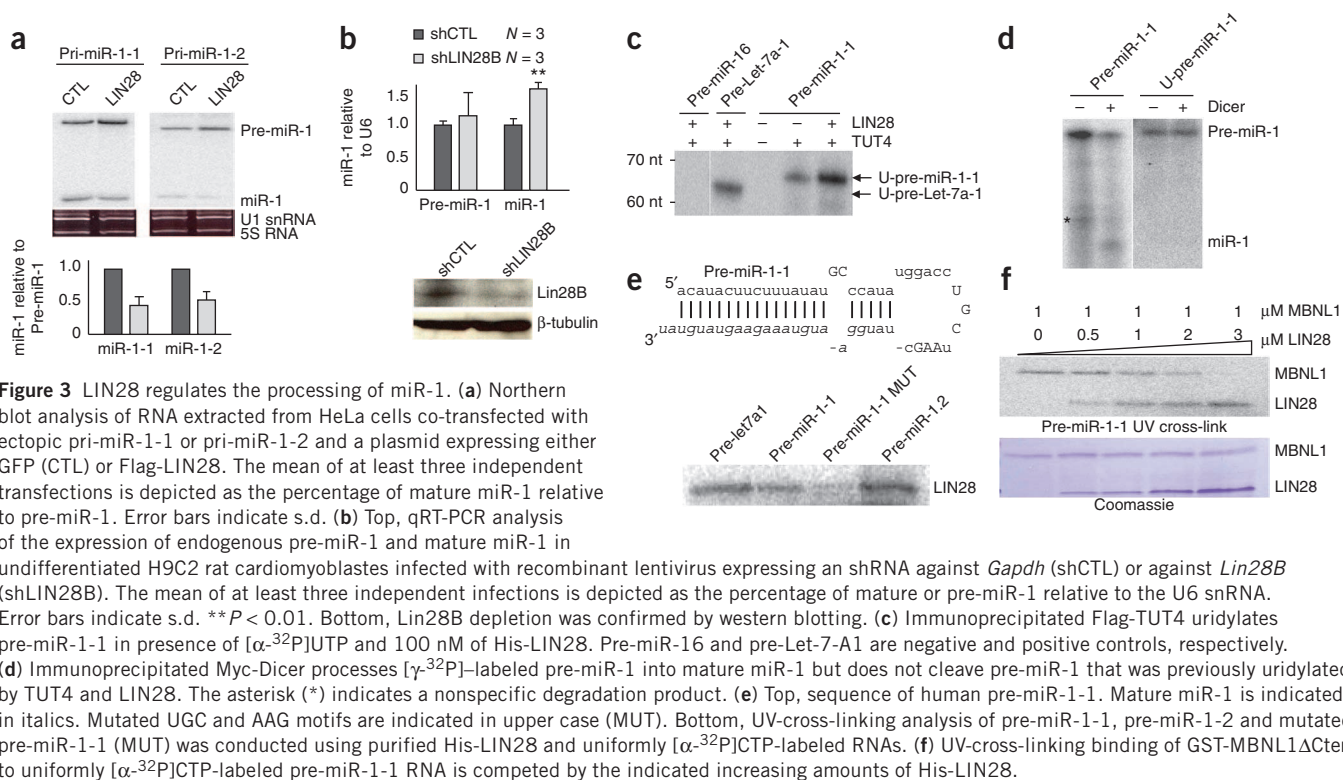


pre-miR-1 processing, suggesting that the sole depletion of MBNL1 is sufficient to mimic the action of expanded CUG repeats and to alter the processing of pre-miR-1. To test whether MBNL1 regulates the processing of endogenous pre-miR-1, we engineered an adenovirus expressing an shRNA directed against *Mbn1* to transduce rat H9C2 cardiomyocytes. Depletion of *Mbn1* in cardiomyocytes resulted in a significantly decreased quantity of mature miR-1 ($P < 0.01$), whereas the expression of pre-miR-1 was not altered (Fig. 2b), suggesting that MBNL1 regulates the processing of endogenous pre-miR-1. Levels of endogenous miR-126, miR-138, miR-199 and Let-7-f2, which were tested as negative controls, were not altered, suggesting that MBNL1 specifically regulates the processing of pre-miR-1 (Supplementary Fig. 2b). Next, we found that recombinant purified glutathione *S*-transferase (GST)-tagged MBNL1 binds to pre-miR-1-1 and to pre-miR-1-2 RNAs, and—consistent with previous studies^{36,37}—mutation of a UGC motif (Fig. 2c), which is located within the loop of pre-miR-1 and is conserved among species and miR-1 family members (Supplementary Fig. 2c), was sufficient to reduce MBNL1 binding in UV-cross-linking experiments (Fig. 2d), and in gel-shift analysis (Supplementary Fig. 2d). Finally, the binding of MBNL1 to pre-miR-1-1 RNA was outcompeted by an excess of unlabeled expanded CUG repeats (Fig. 2e), in accordance with the proposed model^{14–17} of myotonic dystrophy pathogenesis, in which an excess of expanded CUG repeats reduces the quantity of free MBNL1 and consequently the binding of MBNL1 to its physiological targets.

LIN28 regulates the processing of miR-1

To determine the mechanism underlying the alteration of pre-miR-1 processing, we examined pre-miR-1 localization and cleavage but found that neither expanded CUG repeats nor MBNL1 had a detectable effect on pre-miR-1 export or on Dicer localization and activity (Supplementary Fig. 3a and data not shown). Recent reports

demonstrated that the LIN28 and LIN28B RNA binding proteins regulate the expression of the Let-7 family of miRNA^{38–41}, raising the question of whether LIN28 may also regulate miR-1. Overexpression of LIN28 inhibited the processing of ectopically expressed pre-miR-1-1 or pre-miR-1-2, resulting in lower expression of mature miR-1-1 and miR-1-2 (Fig. 3a). Similar experiments conducted in the presence of actinomycin D, which inhibited *de novo* production of pre-miR-1, suggested that LIN28 blocked the processing of pre-miR-1 at the Dicer step (Supplementary Fig. 3b). To test whether LIN28 regulates the processing of endogenous pre-miR-1, rat H9C2 cardiomyoblasts were infected with lentiviral particles expressing an shRNA directed against *Lin28B* (*Lin28b*). Depletion of *Lin28B* stimulated the expression of endogenous mature miR-1, whereas the expression of pre-miR-1 was not substantially altered (Fig. 3b), confirming that LIN28 regulates the processing of pre-miR-1. Effect of *Lin28B* depletion was also tested on the expression of endogenous Let-7-f2 and miR-199, which were used as positive^{38,39} and negative controls, respectively (Supplementary Fig. 3c). Similar to pre-Let7 miRNAs^{40,41}, recombinant purified histidine (His)-tagged LIN28 promoted *in vitro* uridylation of pre-miR-1 by immunoprecipitated Flag-tagged ZCCHC11 (also called TUT4) (Fig. 3c and Supplementary Fig. 3d). Consistent with the discovery that uridylation of pre-Let-7 blocks Dicer processing⁴¹, uridylylated pre-miR-1 was not cleaved by immunoprecipitated Myc-tagged Dicer, whereas control nonuridylylated pre-miR-1 was processed into mature miR-1 (Fig. 3d). Next, using UV-cross-linking assays (Fig. 3e) and gel-shift analysis, we found that recombinant purified His-tagged LIN28 protein binds to pre-miR-1-1 and to pre-miR-1-2 RNAs, (Supplementary Fig. 3e). The pre-miR-1-1 loop possesses G- and A-rich motifs similar to the sequences recognized by LIN28 in the pre-Let-7-A1 loop³⁸, and mutation of an AAG motif in the pre-miR-1-1 loop reduced LIN28 binding (Fig. 3e). These data suggest that LIN28 and MBNL1 may bind the pre-miR-1 loop in a mutually exclusive pattern.

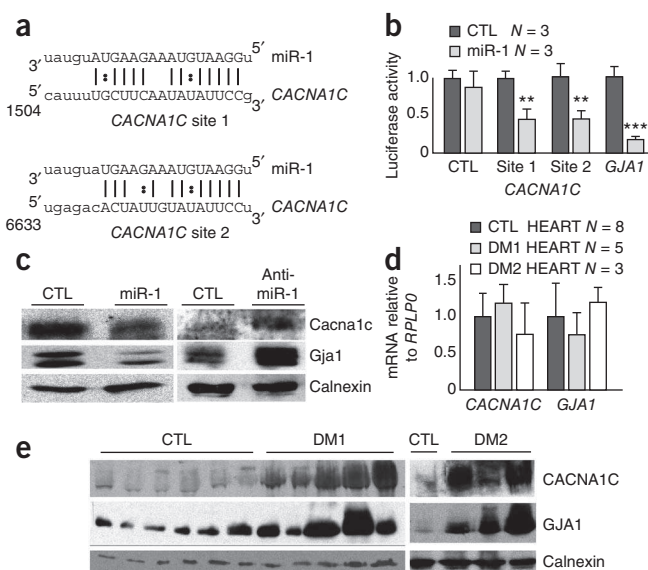


We confirmed this hypothesis and found that increasing amounts of recombinant purified LIN28 outcompeted MBNL1 binding to pre-miR-1-1 RNA (Fig. 3f). Both LIN28 and MBNL1 have been reported to be expressed in adult heart tissue^{42,43}, suggesting that competition may arise *in vivo*. Finally, we found that regulation of the processing of pre-miR-1 is a physiological process, which is controlled during rat H9C2 cardiomyocytes differentiation and correlates with a decreased expression of Lin28B (Supplementary Fig. 3f). This is consistent with splicing misregulation in myotonic dystrophy, which copies a undifferentiated state. Together, these data suggest that the LIN28 and ZCCHC11 pathway regulates the expression of miR-1 and that LIN28 and MBNL1 compete for binding to pre-miR-1-1,

which implies that a reduction of free MBNL1 in myotonic dystrophy would enable LIN28 to bind and to downregulate pre-miR-1.

Targets of miR-1 are upregulated in myotonic dystrophy

Finally, miR-1 regulates the post-transcriptional expression of various targets^{26,44–47}, which brings into question the consequences and importance of misregulation of miR-1 for myotonic dystrophy. Analysis with miRanda (<http://www.microrna.org/>) predicted various targets of miR-1, including the cardiac L-type calcium channel gene *CACNA1C* (*CAV1.2*) (Fig. 4a). *CACNA1C* is the main calcium channel in heart tissue, and gain-of-function mutations in the *CACNA1C* gene result in arrhythmias and sudden death⁴⁸. We confirmed that *CACNA1C* is regulated by miR-1, as co-transfection of miR-1 reduced the expression of a luciferase reporter plasmid containing part of the 3' UTR sequences of *CACNA1C* (Fig. 4b). In addition, overexpression of miR-1 in H9C2 cardiomyoblasts reduced the level of endogenous *CACNA1C* protein, whereas an antisense RNA oligonucleotide directed against miR-1



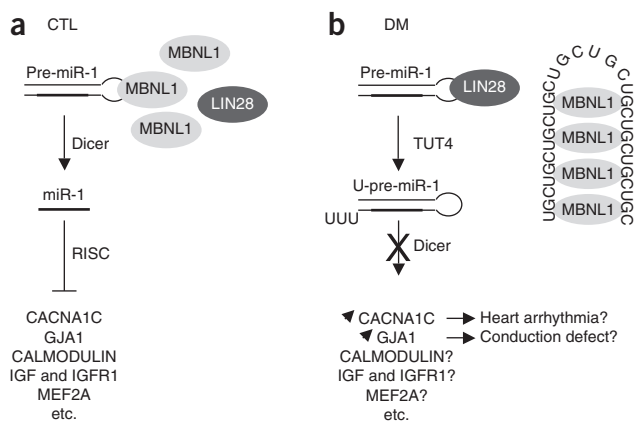


Figure 5 Model of miR-1 alteration in myotonic dystrophies. **(a)** MBNL1 and LIN28 compete for binding to pre-miR-1 loop. In presence of MBNL1, the processing of pre-miR-1 in mature miR-1 is favored and results in regulated expression of miR-1 targets. **(b)** In people with myotonic dystrophy, the sequestration of MBNL1 by expanded CUG or CCUG repeats allows LIN28 or LIN28B to bind to pre-miR-1, which promotes its consequent uridylation by TUT4. Uridylated pre-miR-1 is resistant to Dicer cleavage, which results in lower amounts of miR-1 and increased levels of its targets, GJA1 and CACNA1C.

increased the expression of endogenous CACNA1C (**Fig. 4c**). Notably, expression of CACNA1C protein was upregulated in DM1 and DM2 heart samples compared to control, whereas CACNA1C mRNA levels were not altered (**Fig. 4d,e**). Similarly, the expression of connexin 43 (GJA1), which is a known target of miR-1 (ref. 26) and is responsible for intracardiomyocyte conductance, was also upregulated at the protein level in heart samples of persons with DM1 or DM2 (**Fig. 4d,e**). These data demonstrate a post-transcriptional upregulation of miR-1 targets GJA1 and CACNA1C in people with myotonic dystrophy, which is consistent with a downregulation of the inhibitor, miR-1.

DISCUSSION

Our results suggest that mutant RNAs containing expanded CUG or CCUG repeats, which are known to modify the maturation of several pre-mRNAs, can also alter the processing of a pre-miRNA. Furthermore, we describe a previously unidentified function for MBNL1 as a cytoplasmic regulator of the biogenesis of pre-miR-1. Whether MBNL1 regulates the processing of other miRNAs remains to be determined, but we noted that UGC motifs are conserved in the loop of various pre-miRNAs (**Supplementary Table 1**). Furthermore, consistent with a report of LIN28 presence in the adult heart⁴², our data suggest that the LIN28 and ZCCHC11 pathway regulates the processing of miR-1. We propose a model (**Fig. 5**) in which depletion of free MBNL1 by expanded CUG or CCUG repeats enables LIN28 and ZCCHC11 to uridylate pre-miR-1, which blocks Dicer processing, resulting in decreased expression of mature miR-1 and increased levels of its targets, including CACNA1C and GJA1, in the heart of people with myotonic dystrophy. GJA1 and CACNA1C encode the main gap junction and calcium channels in the heart, respectively, and we propose that their misregulation may contribute to the cardiac conduction defects and arrhythmias observed in people with DM1 or DM2 (**Fig. 5**). Whether other known (calmodulin⁴⁴, MEF2A⁴⁴, PP2A⁴⁵, IGF1 (ref. 46), TWF1 (ref. 47), etc.) or predicted (KCNA5, triadin, CUGBP2, etc.) targets of miR-1 are also upregulated in people with myotonic dystrophy remains to be determined. Furthermore, the miR-1 family regulates muscle-cell differentiation^{49–53}, which is delayed in the severe congenital DM1 form^{54,55}, suggesting that

the alteration of pre-miR-1 processing may be involved in the manifestation of other symptoms of myotonic dystrophy. Finally, this work opens the possibility that the processing of specific miRNAs, which is highly regulated^{56–59}, can be altered and is involved in the development of human genetic diseases.

METHODS

Methods and any associated references are available in the online version of the paper at <http://www.nature.com/nsmb/>.

Note: Supplementary information is available on the Nature Structural & Molecular Biology website.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank T. Cooper (Baylor College of Medicine) for the gift of the DT960 and tgCUGBP1 plasmids, C. Branlant (National Center of Scientific Research) for the pGEX-MBNL1-Δ101 (MBNL1ΔCter) vector, M. Swanson (University of Florida) for the pGEX-6P-MBNL1-His vector, C. Thornton (University of Rochester) for the polyclonal antibody against MBNL1, N. Kim (University of Seoul) for the pri-miR-16, Flag-TUT4, His-LIN28 and Flag-LIN28 plasmids, P. Provost (Université Laval) for the gift of the Myc-Dicer plasmid and all members of the French Myotonic Dystrophy Network for fruitful discussion. This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) AVENIR (N.C.-B.), Agence nationale de la recherche (ANR) GENOPAT P007942 (N.C.B.), Association Française contre les Myopathies (AFM) MNM1-12982 (N.C.B.), the UPMC-emergence program (D.F.), US National Institutes of Health (NIH) P30 AR057220 (J.W.D.), Muscular Dystrophy Center Core Laboratories (J.W.D.), the Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche and AFM (F.R., F.F.) and the University of Strasbourg (F.R., F.F.).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Experiments were conducted by F.R., F.F., C.F., J.-P.V., D.D., N.D., M.-C.F., A.N., D.A. and B.J. Clinical samples and patient data were obtained from J.W.D., D.D., K.W., D.F., G.G., H.F., D.D., M.P.T. and from the Research Resource Network supported by the Research Grant for Nervous and Mental Disorders from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan. The study was designed and coordinated by N.D., D.F. and N.C.-B. The paper was written by N.C.-B.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Published online at <http://www.nature.com/nsmb/>.

Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>.

1. Brook, J.D. *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* **68**, 799–808 (1992).
2. Fu, Y.H. *et al.* An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* **255**, 1256–1258 (1992).
3. Mahadevan, M. *et al.* Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science* **255**, 1253–1255 (1992).
4. Liquori, C.L. *et al.* Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science* **293**, 864–867 (2001).
5. Miller, J.W. *et al.* Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)_n expansions associated with myotonic dystrophy. *EMBO J.* **19**, 4439–4448 (2000).
6. Kanadia, R.N. *et al.* A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science* **302**, 1978–1980 (2003).
7. Ho, T.H. *et al.* Muscleblind proteins regulate alternative splicing. *EMBO J.* **23**, 3103–3112 (2004).
8. Kanadia, R.N. *et al.* Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscleblind overexpression in a mouse poly(CUG) model for myotonic dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 11748–11753 (2006).
9. Philips, A.V., Timchenko, L.T. & Cooper, T.A. Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science* **280**, 737–741 (1998).
10. Kuyumcu-Martinez, N.M. *et al.* Increased steady-state levels of CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation. *Mol. Cell* **28**, 68–78 (2007).
11. Mankodi, A. *et al.* Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science* **289**, 1769–1773 (2000).
12. Lin, X. *et al.* Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 2087–2097 (2006).
13. Kalsotra, A. *et al.* A postnatal switch of CELF and MBNL proteins reprograms alternative splicing in the developing heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 20333–20338 (2008).

14. Savkur, R.S. *et al.* Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat. Genet.* **29**, 40–47 (2001).
15. Mankodi, A. *et al.* Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of CIC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. *Mol. Cell* **10**, 35–44 (2002).
16. Charlet-B., N. *et al.* Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol. Cell* **10**, 45–53 (2002).
17. Wheeler, T.M. *et al.* Correction of CIC-1 splicing eliminates chloride channelopathy and myotonia in mouse models of myotonic dystrophy. *J. Clin. Invest.* **117**, 3952–3957 (2007).
18. Groh, W.J. *et al.* Electrocardiographic abnormalities and sudden death in myotonic dystrophy type 1. *N. Engl. J. Med.* **358**, 2688–2697 (2008).
19. Pelargonio, G. *et al.* Myotonic dystrophy and the heart. *Heart* **88**, 665–670 (2002).
20. Phillips, M.F. & Harper, P.S. Cardiac disease in myotonic dystrophy. *Cardiovasc. Res.* **33**, 13–22 (1997).
21. Lazarus, A. *et al.* 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 (2002).
22. Wang, G.S. *et al.* 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 (2007).
23. Mahadevan, M.S. *et al.* Reversible model of RNA toxicity and cardiac conduction defects in myotonic dystrophy. *Nat. Genet.* **38**, 1066–1070 (2006).
24. Sayed, D. *et al.* MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* **100**, 416–424 (2007).
25. Carè, A. *et al.* MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat. Med.* **13**, 613–618 (2007).
26. Yang, B. *et al.* The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat. Med.* **13**, 486–491 (2007).
27. Zhao, Y. *et al.* Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1–2. *Cell* **129**, 303–317 (2007).
28. Schoyer, B.G. *et al.* Sudden cardiac death in myotonic dystrophy type 2. *Neurology* **63**, 2402–2404 (2004).
29. Lee, Y. *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**, 415–419 (2003).
30. Denli, A.M. *et al.* Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* **432**, 231–235 (2004).
31. Han, J. *et al.* The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* **18**, 3016–3027 (2004).
32. Lund, E. *et al.* Nuclear export of microRNA precursors. *Science* **303**, 95–98 (2004).
33. Yi, R. *et al.* Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* **17**, 3011–3016 (2003).
34. Zhang, H. *et al.* Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* **118**, 57–68 (2004).
35. Chendrimada, T.P. *et al.* TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* **436**, 740–744 (2005).
36. Goers, E.S. *et al.* MBNL1 binds GC motifs embedded in pyrimidines to regulate alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* **38**, 2467–2484 (2010).
37. Yuan, Y. *et al.* Muscleblind-like 1 interacts with RNA hairpins in splicing target and pathogenic RNAs. *Nucleic Acids Res.* **35**, 5474–5486 (2007).
38. Heo, I. *et al.* Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA. *Mol. Cell* **32**, 276–284 (2008).
39. Rybak, A. *et al.* A feedback loop comprising Lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment. *Nat. Cell Biol.* **10**, 987–993 (2008).
40. Hagan, J.P. *et al.* Lin28 recruits the TUTase Zcchc11 to inhibit let-7 maturation in mouse embryonic stem cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 1021–1025 (2009).
41. Heo, I. *et al.* TUT4 in concert with Lin28 suppresses microRNA biogenesis through pre-microRNA uridylation. *Cell* **138**, 696–708 (2009).
42. Yang, D.H. & Moss, E.G. Temporally regulated expression of Lin-28 in diverse tissues of the developing mouse. *Gene Expr. Patterns* **3**, 719–726 (2003).
43. Kalsotra, A. *et al.* A postnatal switch of CELF and MBNL proteins reprograms alternative splicing in the developing heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 20333–20338 (2008).
44. Ikeda, S. *et al.* MicroRNA-1 negatively regulates expression of the hypertrophy-associated calmodulin and Mef2a genes. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 2193–2204 (2009).
45. Terentyev, D. *et al.* miR-1 overexpression enhances Ca²⁺ release and promotes cardiac arrhythmogenesis by targeting PP2A regulatory subunit B56 α and causing CaMKII-dependent hyperphosphorylation of RyR2. *Circ. Res.* **104**, 514–521 (2009).
46. Elia, L. *et al.* Reciprocal regulation of microRNA-1 and insulin-like growth factor-1 signal transduction cascade in cardiac and skeletal muscle in physiological and pathological conditions. *Circulation* **120**, 2377–2385 (2009).
47. Li, Q. *et al.* Attenuation of microRNA-1 derepresses the cytoskeleton regulatory protein twinfilin-1 to provoke cardiac hypertrophy. *J. Cell Sci.* **123**, 2444–2452 (2010).
48. Splawski, I. *et al.* Ca_v1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell* **119**, 19–31 (2004).
49. Hirai, H. *et al.* MyoD regulates apoptosis of myoblasts through microRNA-mediated down-regulation of Pax3. *J. Cell Biol.* **191**, 347–365 (2010).
50. Chen, J.F. *et al.* microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. *J. Cell Biol.* **190**, 867–879 (2010).
51. Cacchiarelli, D. *et al.* MicroRNAs involved in molecular circuitries relevant for the Duchenne muscular dystrophy pathogenesis are controlled by the dystrophin / nNOS pathway. *Cell Metab.* **12**, 341–351 (2010).
52. Chen, J.F. *et al.* The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat. Genet.* **38**, 228–233 (2006).
53. Yan, D. *et al.* MicroRNA-1/206 targets c-Met and inhibits rhabdomyosarcoma development. *J. Biol. Chem.* **284**, 29596–29604 (2009).
54. Furling, D., Lemieux, D., Taneja, K. & Puymirat, J. Decreased levels of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) and delayed differentiation in human myotonic dystrophy myoblasts. *Neuromuscul. Disord.* **8**, 728–735 (2001).
55. Furling, D. *et al.* Defective satellite cells in congenital myotonic dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 2079–2087 (2001).
56. Guil, S. & Cáceres, J.F. The multifunctional RNA-binding protein hnRNP A1 is required for processing of miR-18a. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 591–596 (2007).
57. Davis, B.N. *et al.* Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA maturation by Drosha. *Mol. Cell* **39**, 373–384 (2010).
58. Trabucchi, M. *et al.* The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of microRNAs. *Nature* **459**, 1010–1014 (2009).
59. Yang, W. *et al.* Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 13–21 (2006).

ONLINE METHODS

Samples. All samples were from heart left ventricles. Heart samples from unaffected persons (CTL #1 and #2) were purchased at Ambion and Stratagene, respectively. CTL #3 was from a person suffering from familial dilated cardiomyopathy. CTL #4–8 were from ALS-affected subjects described previously⁶⁰. DM1 #1 was from a 45-year-old patient suffering from DM1 with an expansion of 166 CTG repeats in the blood who underwent a cardiac transplantation for end-stage heart failure and dilated cardiomyopathy with conduction system disease. DM1 #2–5 were from previously described subjects (DM1 #9–11 in ref. 60) with expansion of 4,300 (female, 58 years), 4,800 (male, 63 years), 5,800 (female, 56 years) and ~6,000 CTG repeats in the heart. Subjects with DM2 were described previously²⁸.

RT-qPCR. miRNAs RT-qPCR analyses were conducted using the miScript reverse transcription kit (Qiagen), the specific miScript primer and precursor assays (Qiagen) and an miScript Sybr green PCR kit (Qiagen) in a Lightcycler 480 (Roche) for 15 min at 94 °C, followed by 50 cycles of 15 s at 94 °C, 20 s at 55 °C and 20 s at 72 °C. U6 snRNA was used as the standard. *GJA1* (fwd: 5'-TTCCATCCACTTGCACAATA3', rev: 5'-GGCTTGATTCCCTGACT-3') and *CACNA1C* (fwd: 5'-TTCGTGTCCCTCTTCAACC-3', rev: 5'-GTTGCTCAAGGAGTTCAGTA-3') RT-qPCR analyses were conducted using the Transcriptor Reverse Transcriptase Kit (Roche) and the QuantiTect SYBR Green PCR kit (QIAGEN) in a Lightcycler 480 (Roche) for 15 min at 94 °C, followed by 50 cycles of 15 s at 94 °C, 20 s at 58 °C and 20 s at 72 °C. *RPLP0* (fwd: 5'-GAAGTACTGTGCCAGCCCA-3', rev: 5'-GAAGGTGTAATCCGTCTCCA-3') was used as the standard. Data were analyzed using Lightcycler 480 analysis software and the $\Delta\Delta C_t$ method.

Northern blotting. HeLa cells were co-transfected using JetPei (Polyplus) in DMEM, 1 g l⁻¹ glucose, 5% fetal calf serum and gentamycin at 37 °C, 5% (v/v) CO₂. 24 h after transfection, total RNA was extracted using Tri Reagent, treated with DNase, extracted with phenol-chloroform and precipitated with ethanol. 5 μ g of RNA were electrophoresed on a 12% acryl-urea gel, transferred on nylon membrane, prehybridized 90 min at 42 °C in 6 \times SSPE, 0.1% (v/v) SDS, 2 \times Denhardt, hybridized overnight at 42 °C with 50 ng of antisense miR-1 (5'-ATACATACTTCTTTACATTCCA-3') or U6 snRNA (5'-ATA TGGAACGCTTACGAATT-3') [γ -³²P]ATP-labeled probe, washed three times in SSPE 6 \times , SDS 0.1% (v/v), and revealed using a Typhoon scanner.

Lentiviral and adenoviral infection of H9c2 cells. Lentivirus expressing an shRNA against LIN28B were ordered from OpenBiosystems (V3LHS_327847) H9c2 cells were grown in DMEM, 1 g l⁻¹ glucose, 10% (v/v) fetal calf serum and gentamycin at 37 °C, 5% (v/v) CO₂ and infected at a multiplicity of infection (MOI) of 20 during 48 h. Adenovirus expressing shMBNL1 or 960 CUG repeats were cloned into pAD-DEST (Invitrogen) and produced according to manufacturer's instructions. H9c2 cells were grown in DMEM, 1 g l⁻¹ glucose, 10% fetal calf serum and gentamycin at 37 °C, 5% (v/v) CO₂. Confluent H9c2 cells were differentiated for 6 d in DMEM, 1 g l⁻¹ glucose, 2% (v/v) horse serum and

gentamycin at 37 °C, 5% (v/v) CO₂ and transduced with recombinant CUG^{960x} or shMBNL1 adenovirus (MOI 100). Medium was replaced 24 h after infection, and cells were analyzed 48 h after infection.

In vitro uridylation. HeLa cells were collected 24 h after transfection with Flag-TUT4, incubated at 4 °C in 300 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8.0, 1% (v/v) Triton X-100 for 20 min, sonicated and centrifuged 10 min at 21,000g at 4 °C. Supernatant was incubated with 30 μ l of anti-Flag M2 affinity gel (Sigma) with constant rotation for 2 h at 4 °C. Beads were washed 3 times in 200 mM KCl, 10 mM Tris, pH 8.0, and incubated with 5 pmol of synthetic pre-miR-16, pre-miR-1-1 or pre-Let-7a-1 RNA (Sigma), 3.2 mM MgCl₂ and 125 nM [α -³²P]UTP at 37 °C for 1 h and analyzed on 12% (v/v) acryl, 8 M urea gel.

In vitro Dicer processing. HeLa cells were harvested 24 h after transfection with Myc-Dicer, incubated at 4 °C in lysis buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8.0, 0.1% (v/v) Triton X-100) for 20 min, sonicated and centrifuged for 10 min at 21,000g. Supernatant was incubated with 30 μ l of anti-Myc antibody bound to protein G-Sepharose with constant rotation for 2 h at 4 °C. Beads were washed three times in lysis buffer and incubated with [γ -³²P]ATP-labeled pre-miR-1-1 or previously uridylated pre-miR-1-1 in 6.4 mM MgCl₂, 1 mM DTT, for 30 min at 37 °C and analyzed in 12% (v/v) acrylamide, 8 M urea gel.

Luciferase assays. 40-nt fragments encompassing miR-1 binding sites within the 3' UTR of human *CACNA1C* or *GJA1* were inserted in triplicate within the XbaI-NotI sites of pRLTK. HeLa cells were plated in a 24-well plate and transfected with 100 ng of luciferase vectors and 20 pmol of mimic miR-1 (Qiagen), using Lipofectamine2000 and assayed for luciferase activities 24 h after transfection, using the Dual Luciferase Reporter Assay kit (Promega).

Western blotting. Total- and membrane-protein extraction were done as previously described¹⁷, and the product was separated on 7% (v/v) or 10% (v/v) SDS-PAGE gel, transferred onto nitrocellulose membranes, blocked with 5% (v/v) nonfat dry milk (NFM) in TBS, incubated with GJA1 (rabbit polyclonal, Sigma, 1:20,000), *CACNA1C* (rabbit polyclonal, Alomone, 1:100), MBNL1 (rabbit polyclonal, 1:100, gift from C. Thornton), LIN28B (rabbit polyclonal ab71415, Abcam) or calnexin (rabbit polyclonal, Stressgen, 1:1,000) antibody overnight in TBS and 5% (v/v) NFM, washed and incubated with Donkey anti-rabbit peroxidase antibody (Jackson Immunoresearch, 1:10,000) for 1 h in TBS and 5% (v/v) NFM, 0.1% (v/v) Tween 20, which was followed by autoradiographic revelation.

Additional methods. Information on miRNA expression profiling, bioinformatic analysis, RNA fluorescence *in situ* hybridization (FISH), immunofluorescence, recombinant protein production and purification, UV-cross-linking assays, gel-shift assay constructions and primer sequences is available in the **Supplementary Methods**.

60. Nakamori, M. *et al.* Aberrantly spliced α -dystrobrevin alters α -syntrophin binding in myotonic dystrophy type 1. *Neurology* **70**, 677–685 (2008).

SUPPLEMENTARY INFORMATIONS

Mis-regulation of miR-1 processing is associated with heart defects in Myotonic Dystrophy.

Frédérique Rau¹, Fernande Freyermuth¹, Charlotte Fugier¹, Jean-Philippe Villemin², Marie-Christine Fischer¹, Bernard Jost¹, Doulaye Dembele¹, Geneviève Gourdon³, Annie Nicole³, Denis Duboc⁴, Karim Wahbi⁵, John W. Day⁶, Harutoshi Fujimura⁷, Masanori P. Takahashi⁸, Didier Auboeuf², Natacha Dreumont¹, Denis Furling⁵, Nicolas Charlet-Berguerand¹

1 IGBMC, INSERM U964, CNRS UMR7104, Strasbourg University, Illkirch, France.

2 INSERM U590, Centre Léon Bérard, Lyon, France.

3 Necker Hospital, INSERM U781, University Paris 5, Paris, France.

4 Cochin Hospital, University Paris 5, Paris, France.

5 UPMC Univ Paris 06, UM 76, Institut de Myologie and INSERM, U974 and CNRS, UMR7215, F-75013, Paris, France.

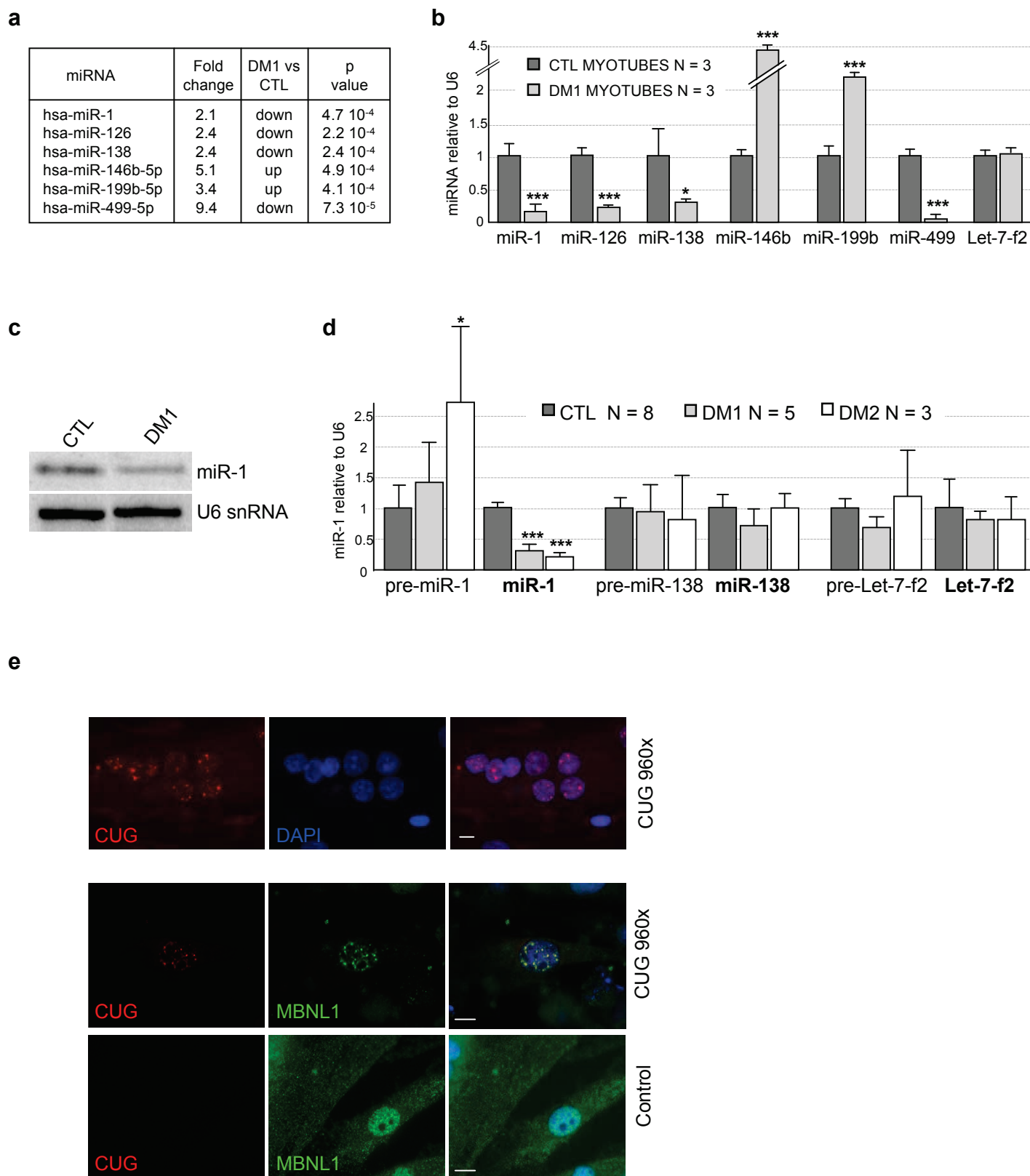
6 University of Minnesota, Minneapolis, MN 55455, USA.

7 Department of Neurology, Toneyama Hospital, Osaka, Japan.

8 Department of Neurology, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan.

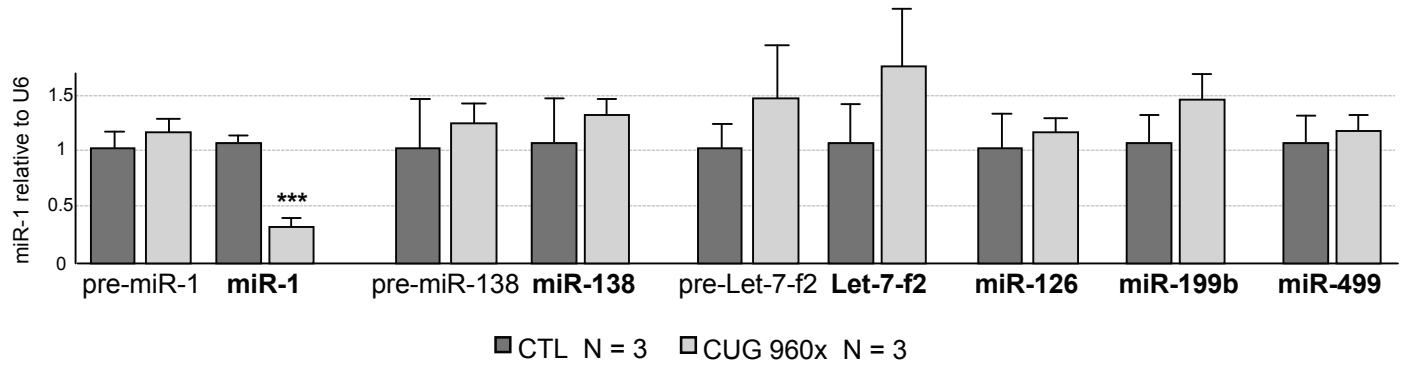
Correspondence to: Nicolas Charlet-Berguerand, Department of Neurobiology and Genetics, IGBMC, 1 rue Laurent Fries, Illkirch, F-67400, France. Tel: +33 388 653 309, Fax: +33 388 653 201, Email : ncharlet@igbmc.fr

Supplementary Figure 1

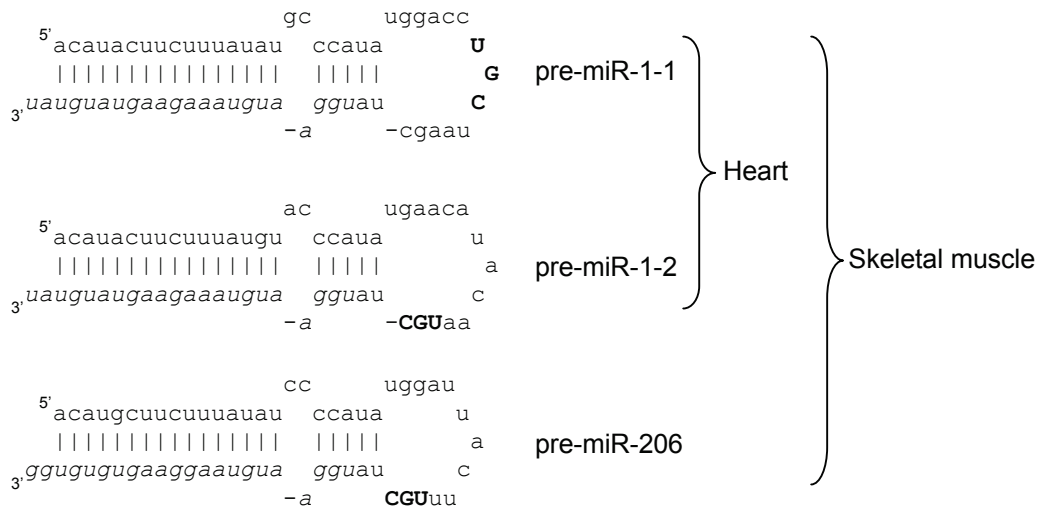


Supplementary Figure 1

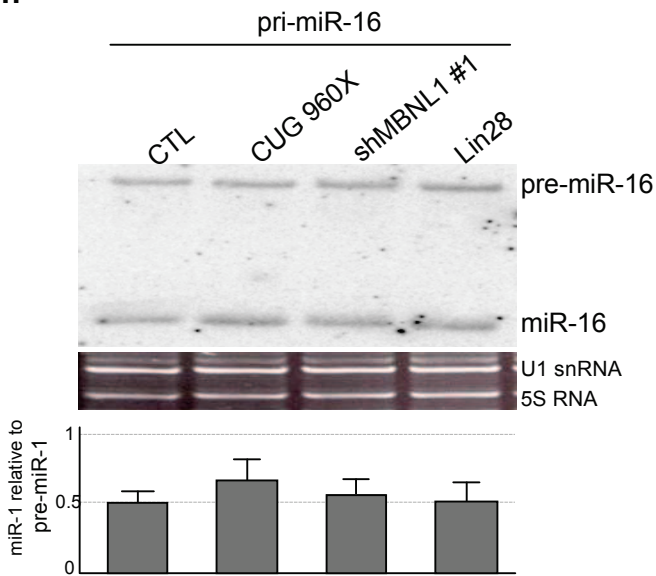
f



g



h

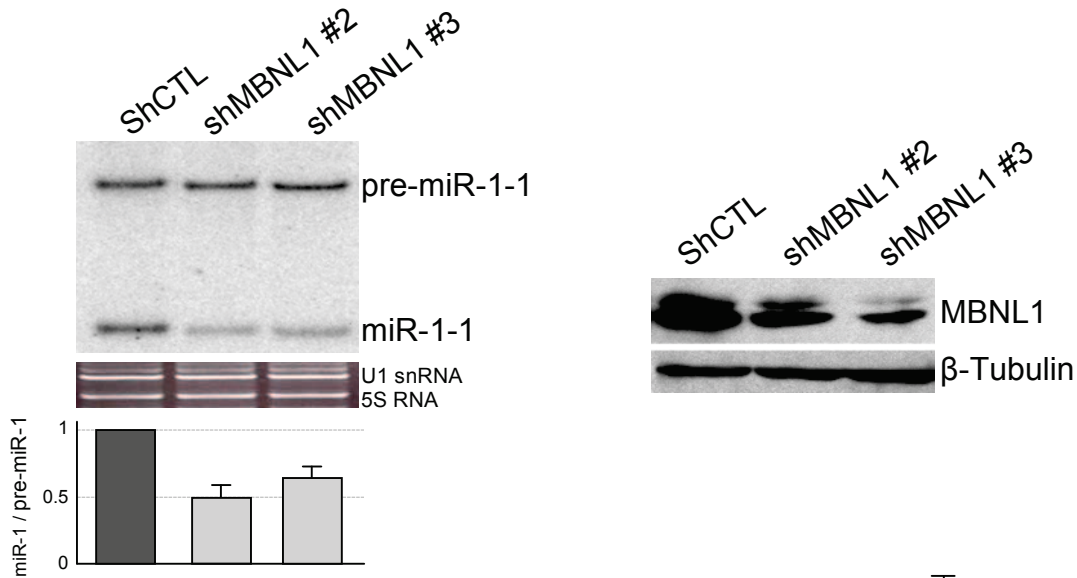


Supplementary Figure 1.

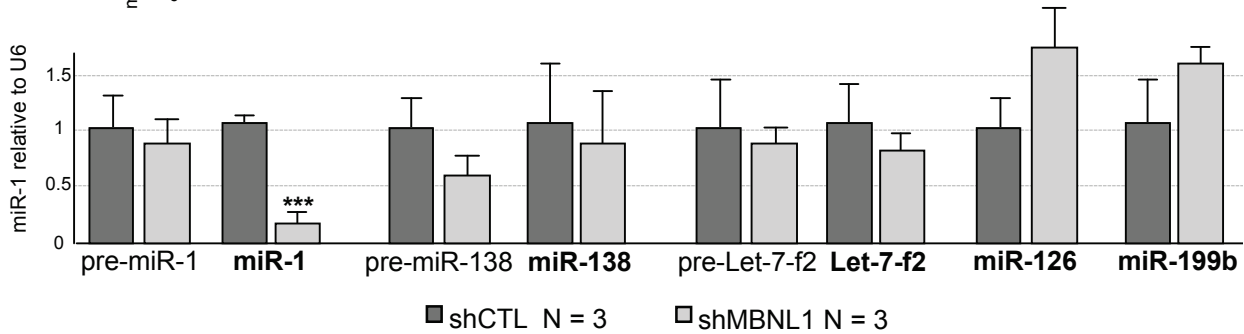
The processing of miR-1 is altered in Myotonic Dystrophic patients. **(a)** Cultures of primary skeletal muscle cells isolated from control and DM1 (2000 CTG repeats) muscle biopsies were differentiated into myotubes for 10 days. RNA was extracted from three independent cultures, hybridized on Agilent miRNA microarrays and revealed that miR-1, miR-126, miR-138, mir-146, miR-199 and miR-499 were significantly mis-regulated (Fold change > 2, corrected P value <0.05). **(b)** qRT-PCR analysis confirmed mis-expression of miR-1, miR-126, miR-138, mir-146, miR-199 and miR-499 relative to U6 snRNA in 10 days differentiated control and DM1 muscle cells. Mature Let-7-f2 was tested as a negative control. * p<0.05, *** p<0.001. **(c)** 5 µg of total RNA extracted from control or DM1 heart samples were analyzed by Northern-blotting using antisense miR-1 and U6 snRNA γ P³²-labeled probes. **(d)** qRT-PCR analysis showed mis-expression of mature miR-1 relative to U6 snRNA in heart samples of control, DM1 and DM2 patients. In contrast, expression of pre-miR-1 was normal, suggesting an alteration of pre-miR-1 processing. Mature and pre-mir-138 and Let-7-f2 were tested as negative control. qPCR for pre-miR-126, pre-miR-146, pre-miR-199 and pre-miR-499 were not successful due to low specificity or efficiency of the corresponding primers. *** p<0.001. **(e)** RNA FISH using a Cy3-(CAG)_{10x} DNA probe demonstrate formation of CUG aggregates in ~90% of rat H9C2 cardiomyocytes infected (MOI 100) by an adenovirus expressing 960 CUG repeats. RNA FISH coupled to immunofluorescence using a monoclonal antibody against MBNL1 (clone 3A4, Sigma) demonstrate co-localization of endogenous MBNL1 with CUG aggregates. Scale Bar: 10 µm. **(f)** qRT-PCR analysis demonstrated mis-expression of mature miR-1 in rat H9C2 cardiomyocytes infected (MOI 100) by an adenovirus expressing 960 CUG repeats. In contrast, expression of pre-miR-1, pre-miR-138, pre-Let-7-f2 and mature miR-126, miR-138, miR-199, miR-499 and Let-7f2 were unchanged. *** p<0.001. **(g)** Sequence of the pre-miR-1 family, which comprises pre-miR-1-1, pre-miR-1-2 and pre-miR-206. All three are expressed in skeletal muscles, where there are crucial for the differentiation of skeletal muscle cells and satellite muscle cells (Chen et al., Nat. Genet. 2006; Chen et al., JCB 2010). In contrast, only miR-1-1 and miR-1-2 are expressed in the cardiac muscle. **(h)** 5 µg of total RNA extracted from HeLa cells co-transfected with an ectopic pri-miR-16 minigene and a plasmid expressing either GFP (CTL), 960 CUG repeats, a shRNA directed against MBNL1 (shMBNL1 #1) or LIN28 were analyzed by northern-blotting using an antisense miR-16 γ P³²-labeled probe.

Supplementary Figure 2

a



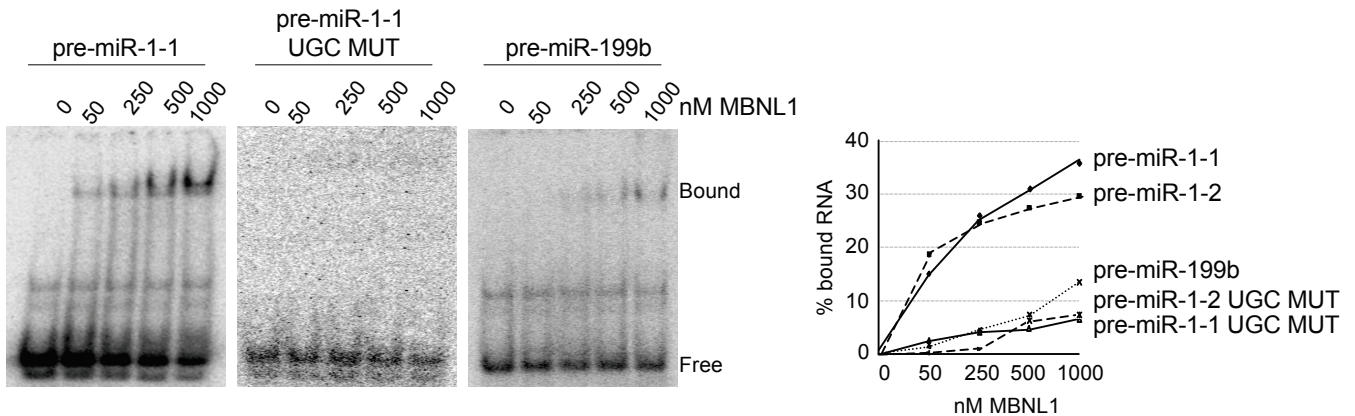
b



c

<i>passenger strand</i>	<i>loop</i>	<i>mature miRNA</i>	
ACAUACUUCUUUAUAUGCCCAUAUGGACCC	UGC	UAAGCUAUGGAAUGUAAAAGAAGUAUGUAU	hsa-miR-1-1
ACAUACUUCUUUAUAUGCCCAUAUGAACCC	UGC	UAAGCUAUGGAAUGUAAAAGAAGUAUGUAU	mmu-miR-1-1
ACAUACUUCUUUAUGUACCCCAUAUGAACAUACAA	UGC	UAUGGAAUGUAAAAGAAGUAUGUAU	hsa-miR-1-2
ACAUACUUCUUUAUGUACCCCAUAUGAACAUUCAG	UGC	UAUGGAAUGUAAAAGAAGUAUGUAU	mmu-miR-1-2
ACAUACUUCUUUAUGUACCCCAUAUGAACAUAGAA	UGC	UAUGGAAUGUAAAAGAAGUGUGUAU	rno-miR-1
ACAUGCUUCUUUAUAUCCCCCAUAUGGAUUACUU	UGC	UAUGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG	hsa-miR-206
ACAUGCUUCUUUAUAUCCUCAUAGAUUUCUCA	GC	UAUGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG	mmu-miR-206
ACAUGCUUCUUUAUAUCCUCAUAGAUUUCAC	UGC	GCUAUGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG	rno-miR-206

d

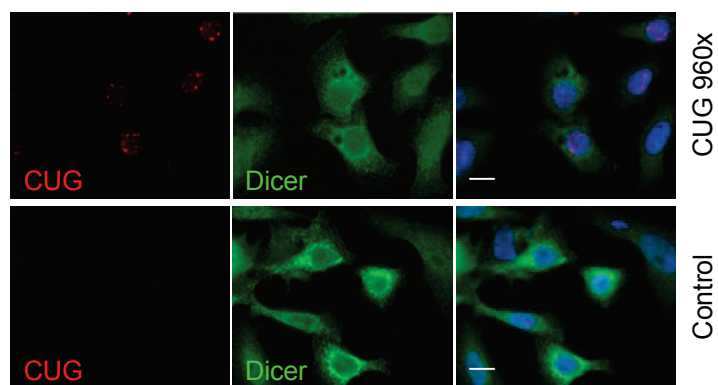


Supplementary Figure 2.

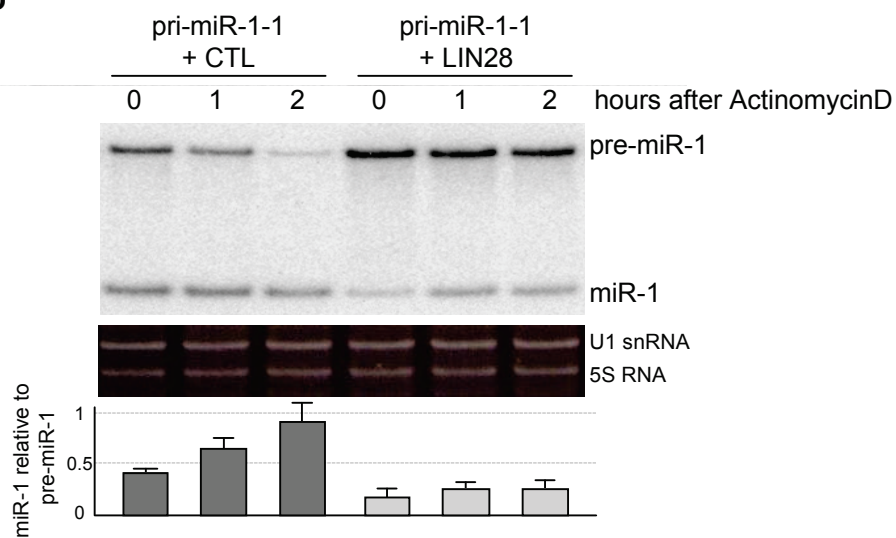
MBNL1 regulates the processing of miR-1. **(a)** Left panel: northern-blotting analysis of 5 μ g of total RNA extracted from HeLa cells co-transfected with a pri-miR-1-1 minigene and a plasmid expressing either a control shRNA directed against *LacZ* or a shRNA directed against *MBNL1*. shMBNL1 #1 is directed against the *MBNL1* sequence 5'-aacacggaatgtaaattgca-3' (from a siRNA used in Ho et al., EMBO 2004), shMBNL1 #2 is directed against the *MBNL1* sequence 5'-aacactggaagtatgtagaga-3' (from a siRNA used in Paul et al., EMBO 2006) and shMBNL1 #3 is directed against the *MBNL1* sequence 5'-ggaattcctcaagctgtact (from a siRNA used in Vajda et al., Dev. Dyn. 2009). Right panel: the efficiency of MBNL1 depletion was confirmed by western-blotting using a polyclonal antibody against MBNL1 (gift from Charles Thornton). **(b)** qRT-PCR analysis demonstrated mis-expression of mature miR-1 in rat H9C2 cardiomyocytes infected (MOI 100) by an adenovirus expressing an shRNA against *MBNL1* (shMBNL1 #1). In contrast, expression of pre-miR-1, pre-miR-138, pre-Let-7-f2 and mature miR-126, miR-138, miR-199 and Let-7f2 were unchanged. *** $p < 0.001$. **(c)** Sequence alignment of human (hsa), mouse (mmu) and rat (rno) pre-miR-1-1, pre-miR-1-2 and pre-miR-206. The mature miRNA is indicated in italic, while the UGC motif required for MBNL1 binding is indicated in bold. **(d)** Left panel: gel-shift analysis of recombinant purified GST-tagged MBNL1 Δ Cter to 5000 cpm of α P³²-CTP-labeled pre-miR-1-1, pre-miR-199 and mutant pre-miR-1-1 in which the UGC motif in pre-miR-1-1 loop was replaced by a UAC motif. Right panel: quantification of the gel-shifts. Note that similar results were obtained with pre-miR-1-1 and pre-miR-1-2. Estimation of the apparent KD suggest a low affinity of MBNL1 for pre-miR-1-1 or pre-miR-1-2 compared to other targets of MBNL1 (Goers et al., NAR 2010), which is consistent with one UGC motif located in pre-miR-1 loop compared to two or more UGC motifs found in other targets of MBNL1 (Goers et al., NAR 2010).

Supplementary Figure 3

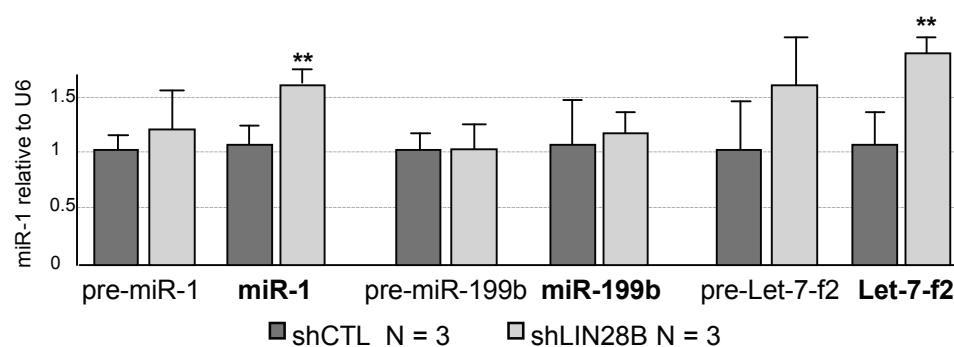
a



b

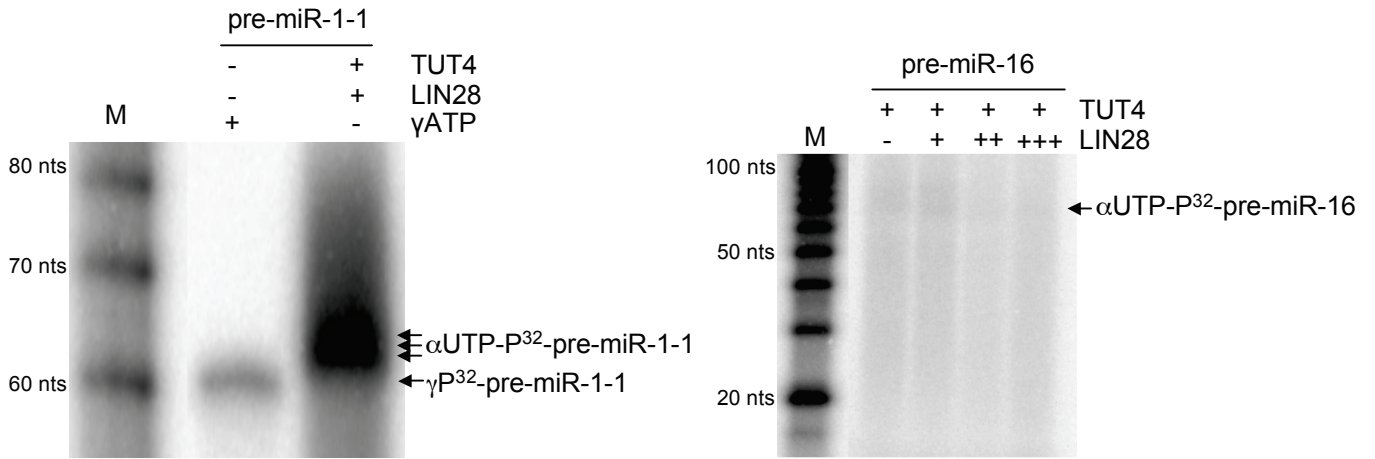


c

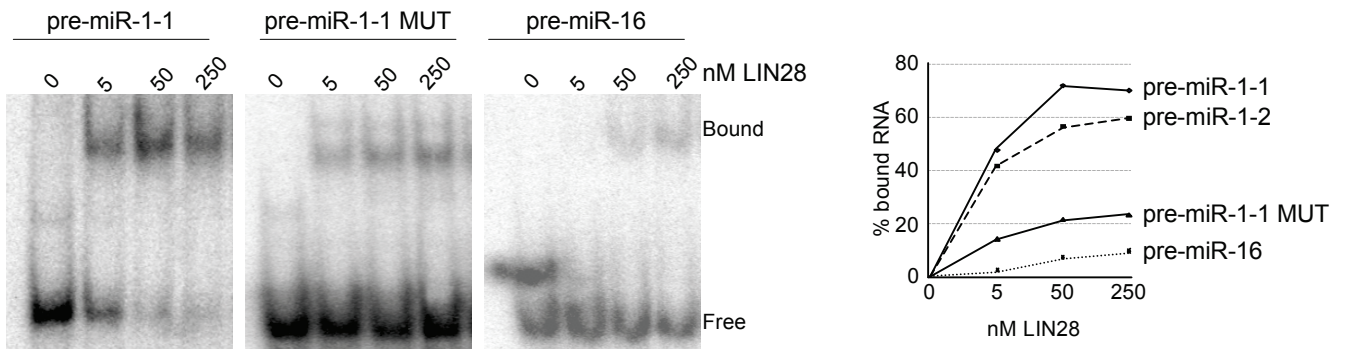


Supplementary Figure 3

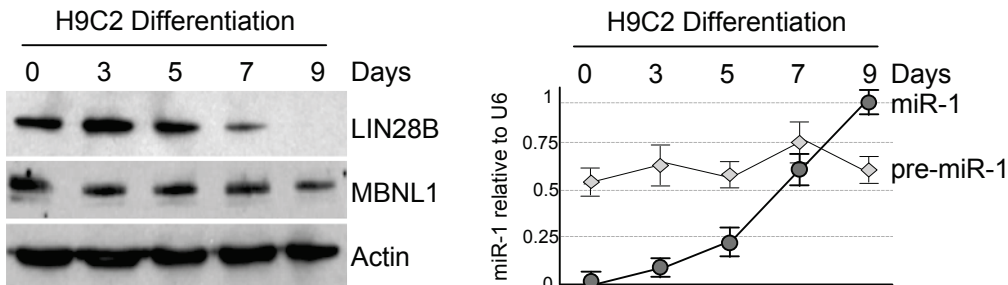
d



e



f



Supplementary Figure 3.

LIN28 regulates the processing of miR-1. **(a)** RNA FISH using a Cy3-(CAG)₁₀x DNA probe coupled to immunofluorescence against Dicer demonstrate formation of CUG aggregates, which do not co-localize with Dicer, in HeLa cells transfected with a plasmid expressing 960 CUG repeats. Scale Bar: 10 μ m. **(b)** Northern-blotting analysis of 5 μ g of total RNA extracted from HeLa cells co-transfected with ectopic pri-miR-1-1 and a plasmid expressing either GFP (CTL) or Flag-LIN28. Cells were treated with actinomycin D 12 hours after transfection and RNA was collected at the indicated time point after actinomycin treatment. Actinomycin D blocks transcription and allows the study of ectopic pre-miR-1 processing in absence of *de novo* production of pre-miRNA. **(c)** qRT-PCR analysis demonstrated mis-expression of mature miR-1 and Let-7-f2 in rat H9C2 cardiomyoblasts infected (MOI 20) by a lentivirus expressing a shRNA directed against LIN28B (pGIPZ V3LHS_327847, OpenBiosystems). In contrast, expression of pre-miR-1, pre-miR-199, pre-Let-7-f2 and mature miR-199 were unchanged. ** $p < 0.01$. **(d)** Left panel: immunoprecipitated Flag-TUT4 (*ZCCHC11*) adds 1 to 3 uridines to pre-miR-1-1 in presence of α P³²-UTP and 100 nM of purified bacterial recombinant HIS-LIN28. Right panel, negative control: immunoprecipitated Flag-TUT4 did not uridylylate pre-miR-16 in presence of α P³²-UTP and 100 nM (+), 200 nM (++) or even 400 nM (+++) of purified recombinant HIS-LIN28. **(e)** Gel-shift analysis confirmed that recombinant purified HIS-tagged LIN28 binds to pre-miR-1-1 and premiR-1-2. Pre-miR-16 was used as negative control. **(f)** Left panel: Western blotting analysis of LIN28B, MBNL1 and Actin during H9C2 differentiation. No detectable level of LIN28 (*LIN28A*) was found in H9C2 cells (data not shown). Right panel: qRT-PCR analysis of the expression of pre-miR-1 and mature miR-1 in H9C2 rat cardiomyocytes during differentiation.

Supplementary Table 1

Name	pre-miRNA loop sequence	mature miRNA sequence	Name	pre-miRNA loop sequence	mature miRNA sequence
rno-miR-1 mmu-miR-1-1 hsa-miR-1-1 mmu-miR-1-2 hsa-miR-1-2	AUAUGAACAUAGAAUGCUA UGAACCUUGCUAAGCUA AUAUGGACCUGCUAAGCUA UGAACAUUCAGUGCUA AUAUGAACAUACAUGCUA	UGGAAUGUAAAAGAGUGUGUAU UGGAAUGUAAAAGAGUAGUAU UGGAAUGUAAAAGAGUAGUAU UGGAAUGUAAAAGAGUAGUAU UGGAAUGUAAAAGAGUAGUAU	rno-miR-500 mmu-miR-500 hsa-miR-500a hsa-miR-500b	UGCUAUCUCAUUGC GCUAUCUCAUUGC GUGCGUCUCGAAUGCA GAGAGUGCUUUCUGAAUGCAGUGC	AAUGCACCUUGGGCAAGGGUJCA AAUGCACCUUGGGCAAGGGUJCA UAUCCUUGCUACCUUGGGUGAGA AAUCCUUGCUACCUUGGGU
rno-miR-9-3 mmu-miR-9-3 hsa-miR-9-3	GUGCCACAGAGCCGUC GUGCCACAGAGCCGUC GUGCCACAGAGCCGUC	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA	rno-miR-501 mmu-miR-501 hsa-miR-501	AAUUGCUAUUUUGUAUGC AUGCUAUUUUGUAUGC GUGCUUUUCUGAUGC	AAUCCUUUGUCCUUGGGUGA AAUCCUUUGUCCUUGGGUGAA AAUCCUUUGUCCUUGGGUGAGA
mo-miR-17-1 mmu-miR-17 hsa-miR-17	UGGUGUGUGCAUCU UGAUUGUGCAUCU UGAUUGUGCAUCU	CAAAGUGCUUACAGUCGAGGUAG CAAAGUGCUUACAGUCGAGGUAG CAAAGUGCUUACAGUCGAGGUAG	rno-miR-503 mmu-miR-503 hsa-miR-503	UGAGUGUUUGGUGCCCU UGAGUGUUUGGUGCCCU UGAGCGAUCGUGCU	UAGCAGCGGGAACAGUACUGCAG UAGCAGCGGGAACAGUACUGCAG UAGCAGCGGGAACAGUACUGCAG
rno-miR-19b-1 mmu-miR-19b-1 hsa-miR-19b-1	CUGUAUAUUAUUCUGC UGUAUAUUAUUCUGC UGUGUGAUUAUUCUGC	UGUGCAAUCCAUGCAAAAACUGA UGUGCAAUCCAUGCAAAAACUGA UGUGCAAUCCAUGCAAAAACUGA	rno-miR-505 mmu-miR-505 hsa-miR-505	UCUGCCAGGUUAGC UCUGCCAGGUUAGC UUCUGCCAGUUUAG	GUCAACACUUGUGGUUUCC GGGAGCCAGGAAGUAUUGAUGU GGGAGCCAGGAAGUAUUGAUGU
rno-miR-23a mmu-miR-23a hsa-miR-23a	GAUCCAGUCACAA GAUCCAGUCACAA UGAGCCCAUAC	AUCACAUUGCCAGGGAUUCC AUCACAUUGCCAGGGAUUCC AUCACAUUGCCAGGGAUUCC	rno-miR-542 mmu-miR-542 hsa-miR-542	GAUACCACUGCCACU GAUACCACUGCCCU UACCAGUGUGCACU	CUCGGGAUCAUCAUGCACGA CUCGGGAUCAUCAUGCACGA UCGGGAUCAUCAUGCACAGAGA
mo-miR-25 mmu-miR-25 hsa-miR-25	UGGACGUGCCUUGGG UGGACGUGCCUUGGG UGGACGUGCCUUGGG	CAUUGCACUUGUCUCGGUCUGA CAUUGCACUUGUCUCGGUCUGA CAUUGCACUUGUCUCGGUCUGA	rno-miR-598 mmu-miR-598 hsa-miR-598	CUGAAAUGGGCUGC UGAAAUGGGCUGC AGCUGGAAUUGGGGUGC	GCGGUGAUGCCGAGUGGCGAG GCGGUGAUGCCGAGUGGCGAGC UACGUAUCGUUGUAUCUGCUA
rno-miR-26a mmu-miR-26a-1 hsa-miR-26a-1 rno-miR-26b mmu-miR-26b hsa-miR-26b	GUGCAGGUCCCAAGGGG GUGCAGGUCCCAAGGGG GUGCAGGUCCCAAGGGG UGUGGUGCUGGCCAG UGUGGUGCUGGCCAG UGUGGUGCUGGCCAG	UUAAGUAUCCAGGUAUGGCU UUAAGUAUCCAGGUAUGGCU UUAAGUAUCCAGGUAUGGCU UUAAGUAUCCAGGUAUGGCU UUAAGUAUCCAGGUAUGGCU UUAAGUAUCCAGGUAUGGCU	rno-miR-615 mmu-miR-615 hsa-miR-615	UCGAGGGUGCUUUAUUGUUCG UCGAGGGUGCUUUAUUGUUCG UCGAGGGUGCUUUAUUGUUCG	GGGGUCCCGGUGUCUGGAUC GGGGUCCCGGUGUCUGGAUC GGGGUCCCGGUGUCUGGAUC
rno-miR-103-1 mmu-miR-103-1 hsa-miR-103-1	UGCAUAUUGGAUCA UUGCAUAUUGGAUCA UUGUUGCAUAUUGGAUCA	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	rno-miR-758 mmu-miR-758 hsa-miR-758	CUAUUUUGUGCCG CUAUUUUGUGCCG CGUUUUUUUGUGCCG	UUUGUGACCUUGGUCACUAACC UUUGUGACCUUGGUCACUAACC UUUGUGACCUUGGUCACUAACC
rno-miR-105 mmu-miR-105 hsa-miR-105-1	GGCUGCUUAUGU GGCUGCUUAUGC GGCUGCUUAUGCACC	CAAGUGCUCAGAUUCUGUGGU CAAGUGCUCAGAUUCUGUGGU UCAAAUGCUCAGAUUCUGUGGU	rno-miR-764 mmu-miR-764 hsa-miR-764	UGCCUACACAUACUG CCAUGCUUUAUAAUACAUUG CCAUGCUUUGGAAAUGGAGGG	GGGUCUCACAUUGUCCUCCA GGGUCUCACAUUGUCCUCCA CGAGGUCUCACAUUGUCCUCCA
mo-miR-106b mmu-miR-106b hsa-miR-106b	AGUGGUCCUCUCUGGCUA AGUGGUCCUCUCUGGCUA AGUGGUCCUCUCUGGCUA	UAAAGUGCUCAGAGUCGAGAU UAAAGUGCUCAGAGUCGAGAU UAAAGUGCUCAGAGUCGAGAU	mo-miR-218-1 mmu-miR-218-1 hsa-miR-218-1	GCUUGCGAGGUUAGAGUA GCUUGCGAGGUUAGAGUA GGUUGCGAGGUUAGAGUA	UUUGUCUUGAUCUAACCAUGU UUUGUCUUGAUCUAACCAUGU UUUGUCUUGAUCUAACCAUGU
rno-miR-134 mmu-miR-134 hsa-miR-134	CGUGCACUUAUUGUACCC CGUGCACUUAUUGUACCC CAUGCACUUAUUGUACCC	UGUGACUGGUUUGACAGAGGGG UGUGACUGGUUUGACAGAGGGG UGUGACUGGUUUGACAGAGGGG	mo-miR-219-2 mmu-miR-219-2 hsa-miR-219-2	UGUACGAGUCUGCGGCCAACCCG UGUACGAGUCUGCGGCCAACCCG UGUACGAGUCUGCGGCCAACCCG	UGAUUGUCUCAAACGAAUUCU UGAUUGUCUCAAACGAAUUCU UGAUUGUCUCAAACGAAUUCU
mmu-miR-135a-1 hsa-miR-135a-1 mo-miR-135b mmu-miR-135b hsa-miR-135b	UUCUUAUUGCUCGCUA UUCUUAUUGCUCACUCA UUGCUGUUCGGAACUC UUGCUGCUCGGAACUC UUGCUGUCCCAAACUC	UAUGGCUUUUUUAUUCUUAUGUGA UAUGGCUUUUUUAUUCUUAUGUGA UAUGGCUUUUUUAUUCUUAUGUGA UAUGGCUUUUUUAUUCUUAUGUGA UAUGGCUUUUUUAUUCUUAUGUGA	rno-miR-224 mmu-miR-224 hsa-miR-224	AGUAGAUUGUUUUUGCAUUGUUJCA UAGUAGAUUGUUUUUGCAUUGUUJCA UAGUAGAUUGUUUUUGCAUUGUUJCA	CAAGUCACUAGUGGUUCCGUUU UAAGUCACUAGUGGUUCCGUUU CAAGUCACUAGUGGUUCCGUUU
rno-miR-138-1 mmu-miR-138-1 hsa-miR-138-1	UUGCCAAUCAGAGAA UUGCCAAUCAGAGAA UUGCCAAUCAGAGAACG	AGCUGGUGUUGUGAAUCAGGCCG AGCUGGUGUUGUGAAUCAGGCCG AGCUGGUGUUGUGAAUCAGGCCG	mo-miR-300 mmu-miR-300 hsa-miR-300	GUGUUUGCUUUAACGGAAAUGAA GUGUUUGCUUUAACGGAAAUGAA UUUGCUUUUACUUGCAUUGAU	UUGAAGAGAGGUUUAUCCUJUGU UUGAAGAGAGGUUUAUCCUJUGU UUAACAAGGGCAGACUCUCUCU
mo-miR-140 mmu-miR-140 hsa-miR-140	GUUACAUAUGCUGUUC GUUACAUAUGCUGUUC GUUACAUAUGCUGUUC	CAGUGGUUUUACCCUAUGGUAG CAGUGGUUUUACCCUAUGGUAG CAGUGGUUUUACCCUAUGGUAG	mo-miR-301b mmu-miR-301b hsa-miR-301b	GUGCUGUGGAAAG GUGCUGUGAGAAG UGCUCUGAGAAG	CAGUGCAAUGGUUUAUGCAAAGC CAGUGCAAUGGUUUAUGCAAAGC CAGUGCAAUGGUUUAUGCAAAGC
rno-miR-145 mmu-miR-145 hsa-miR-145	UGGAUGCUAAGAUUGG UGGAUGCUAAGAUUGG UAGAUGCUAAGAUUGG	GUCCAGUUUUCCAGGAAUCCCU GUCCAGUUUUCCAGGAAUCCCU GUCCAGUUUUCCAGGAAUCCCU	mo-miR-326 mmu-miR-326 hsa-miR-326	GGCGGGUUAUGCUCAGAUCCG GGUUAUGCUCAGAUCCG AAGCGGGUGGUGCUCAGAUCCG	CCUCUGGGCCUUCUCCAGU CCUCUGGGCCUUCUCCAGU CCUCUGGGCCUUCUCCAGU
rno-miR-187 mmu-miR-187 hsa-miR-187	CGGGCGUGCUCUGACCCC CGCUGCUCUGACCCC CGCUGCUCUGACCCC	UCGUGUCUUGUGUUGCAGCCGG UCGUGUCUUGUGUUGCAGCCGG UCGUGUCUUGUGUUGCAGCCGG	mo-miR-337 mmu-miR-337 hsa-miR-337	UGCACAGCCA GAUUGCACAGCCA GAUCCACAGUUUCCAG	UUCAGUCUUAUUAUGUCCUUU GAACGGCGUCAUGCAGAGUU GAACGGCGUCAUGCAGAGUU
mo-miR-194-2 mmu-miR-194-1 mmu-miR-194-2 hsa-miR-194-2	AGUGCCACUGAUU CUGUGCUCGGAUU AGUGCCACUGGUU AGUGCCACUGGUU	UGUAACAGCAACUCCAUGUGGA UGUAACAGCAACUCCAUGUGGA UGUAACAGCAACUCCAUGUGGA UGUAACAGCAACUCCAUGUGGA	rno-miR-346 mmu-miR-346 hsa-miR-346	CUGUUGCUCUGAA CUGUUGCUCUGAAGG CUGUUGCUCUGAA	UGUCUGCCUGAGUGCCUCCUCU UGUCUGCCUGAGUGCCUCCUCU UGUCUGCCUGAGUGCCUCCUCU
mo-miR-199a mmu-miR-199a-2 hsa-miR-199a-2	AGGACAAUGCCGUUGU AGGACAAUGCCGUUGU AGGACAAUGCCGUUGU	CCCAGUGUUCAGACUACCCUUGU CCCAGUGUUCAGACUACCCUUGU CCCAGUGUUCAGACUACCCUUGU	rno-miR-362 mmu-miR-362 hsa-miR-362	GCUGCUUCAGUGC GCUGCUUCAGUGC GCUAUUUCAGUGC	AAUCCUUGGAACCUAGGUGUGAAU AAUCCUUGGAACCUAGGUGUGAAU AAUCCUUGGAACCUAGGUGUGAAU
mo-miR-200c mmu-miR-200c hsa-miR-200c	GGUGCUGGUUGGGAGUCUC GUGCUGGUUGGGAGUCUC GUGCUGGUUGGGAGUCUC	UAAUACUGCCGGUUAUUGAUG UAAUACUGCCGGUUAUUGAUGGA UAAUACUGCCGGUUAUUGAUGGA	mo-miR-487b mmu-miR-487b hsa-miR-487b	CUUACAUUAUGCCG CUUACAUUAUGCCG CGUUUUGCUCUUGGUC	AAUCGUACAGGGUCAUCCACU AAUCGUACAGGGUCAUCCACU AAUCGUACAGGGUCAUCCACU
rno-miR-206 hsa-miR-206	AGAUUAUCACUGCCGUA AUAUGGAUAUUAUUGCUA	UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUG UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUG	mo-miR-493 mmu-miR-493 hsa-miR-493	CAUUGUUUGCACAUCGCG AUUACUUUUUUGCACAUCGCG CAUUCGUUUUGCACAUCGCG	UGAAGGUUCUACUGUUGGCCAG UGAAGGUUCUACUGUUGGCCAG UGAAGGUUCUACUGUUGGCCAG
rno-miR-210 mmu-miR-210 hsa-miR-210	CGUUGCUCGGACCCA CGUUGCUCGGACCCA UGCCGUGCCCCAGACCCA	CUGUGCGUGUGACAGCCGUGA CUGUGCGUGUGACAGCCGUGA CUGUGCGUGUGACAGCCGUGA			

UGC motifs in pre-miRNA loops.

Bio-informatics analysis revealed that 42 miRNAs possess at least one UGC motif in the loop of their pre-miRNAs, which is conserved among human, mouse and rat.

SUPPLEMENTARY DATA (excel file).

Microarray data. (a) Analysis using the Agilent GeneSpring GX Software of miRNA microarray performed on RNA extracted from three independent cultures of primary muscle cultures (differentiated 10 days) derived from controls and age-matched DM1 patients. Among the various miRNA with a mis-regulation of fold change >2 only, miR-1, miR-126, miR-138, miR-146, miR-199 and miR-499 had a corrected p value < 0.05 . (b) Raw data and crude analysis using excel. Data are accessible through NCBI GEO GSE24109.

SUPPLEMENTARY METHODS.

miRNA expression profiling. Control or DM1 myoblasts (2000 CTG repeats) were grown and differentiated 10 days as previously described (Furling D. et al., 2001). Total RNA was extracted using Trizol reagent and samples were prepared using the miRNA Complete Labeling and Hyb Kit (Agilent, 5190-0456). Briefly, 100 ng of total RNA was dephosphorylated with Calf Intestinal Alkaline Phosphatase at 37°C for 30 min, denatured with DMSO at 100°C for 10 min, and labelled with Cy3-pCp using T4 RNA ligase at 16°C for 2 h. The labeled RNAs were hybridized to Human miRNA V2 8x15K microarrays (G4470B, Agilent) at 55°C for 20 h in a Agilent rotating oven. After washing, the arrays were scanned with an Agilent Microarray Scanner (G2565B) using extended dynamic range as specified by the manufacturer. Agilent Feature Extraction 9.5 Software was used to extract the microarray data. Data are accessible through NCBI GEO GSE24109.

Bio-informatic analysis. miRNA hairpins and mature miRNA sequences from human, mouse and rat were downloaded from miRBase (<http://www.mirbase.org/ftp.shtml>) and stored in a MySQL Database. UGC motifs were searched in the miRNA hairpin sequences being flanked by the corresponding mature miRNA sequences. Among 947 human (hsa), 575 mouse (mmu), and 375 rat (rno) analyzed sequences, 205, 136, and 84, respectively, contain at least one UGC motif, among which 42 were conserved in all three species. Putative targets of miR-1, including CACNA1C, were identified using miRanda 09/2008 (<http://www.microrna.org>).

Constructions. Human pri-miR-1-1 was PCR amplified from human genomic DNA using the oligonucleotides FWD: ggatccgctcttggaaactgcatgcagactgcc and REV: gaattcgggtgtggagtgccctcagtgcggcgag. Human pri-miR-1-2 was PCR amplified from human genomic DNA using the oligonucleotides FWD: ggatccgctgaatgttctactaacaataaga and REV: gaattcggtcattcacgtagaaagaagc. Pri-miR-1-1 and pri-miR-1-2 were inserted within the BamHI and EcoRI restriction sites of pcDNA3.1. shRNA against *MBNL1* or *CUGBP1* mRNAs were cloned in the pBlockit vector (Invitrogen). shMBNL1 #1 is directed against the *MBNL1* sequence 5'-aacacggaauguaaaauugca-3', shMBNL1 #2 is directed against the *MBNL1* sequence 5'-aacacuggaaguauguagaga-3', shMBNL1 #3 is directed against the *MBNL1* sequence 5'-ggaauuccucaagcuguacu-3' and shCUGBP1 is directed against the *CUGBP1* sequence 5'-guuacgacaauccuguuuc-3'. The cDNA of human MBNL1 (isoform 40kDa) was inserted in pEGFP (Clontech), the plasmids expressing expanded CUG repeats (DT960) and

Publication 2 en préparation:

Mis-regulation of alternative splicing of the cardiac sodium channel SCN5A is associated with cardiac conduction delay and arrhythmia in Myotonic Dystrophy

Fernande Freyermuth, Yosuke Kokunai, Eric Wang, Thomas Linke, Chantal Sellier, Christelle Thibault, Bernard Jost, Adolfo Lopez de Munain, Bjarne Udd, John W. Day, Denis Duboc, Karim Wahbi, François Deryckere, Didier Auboeuf, Christopher Burge, Denis Furling, Thomas Zimmer, Masanori P. Takahashi, Nicolas Charlet-Berguerand

Misregulation of alternative splicing of the cardiac sodium channel *SCN5A* is associated with cardiac conduction delay and arrhythmia in myotonic dystrophy.

Fernande Freyermuth¹, Yosuke Kokunai², Eric Wang³, Thomas Linke⁴, Chantal Sellier¹, Christelle Thibault¹, Bernard Jost¹, Adolfo Lopez de Munain⁵, Bjarne Udd⁶⁻⁸, John W. Day⁹, Denis Duboc¹⁰, Karim Wahbi¹⁰, François Deryckere¹¹, Didier Auboeuf¹², Christopher Burge³, Denis Furling¹⁰, Thomas Zimmer⁴, Masanori P. Takahashi², Nicolas Charlet-Berguerand^{1#}

1. Department of Translational Medicine, IGBMC, INSERM U964, Illkirch, France.
2. Department of Neurology, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan.
3. Department of Brain and Cognitive Sciences, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, USA
4. Department of Physiology, Friedrich Schiller University, Jena, Germany.
5. Department of Neurology, Hospital Ntra. Sra. Aránzazu, San Sebastián, Spain.
6. Department of Neurology, Neuromuscular Research Center, Tampere, Finland.
7. Department of Medical Genetics, Folkhälsan Institute of Genetics, Helsinki, Finland.
8. Department of Neurology, Vaasa Central Hospital, Vaasa, Finland.
9. Department of Neurology, Stanford University, San Francisco, USA.
10. Myology Institute, UPMC University Paris 06 UM76, INSERM U974, CNRS UMR7215, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France.
11. CNRS UMR7175, Ecole Supérieure de Biotechnologies de Strasbourg, Illkirch, France.
12. Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France ;

Correspondence to: Nicolas Charlet-Berguerand, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR7104, INSERM U964, University of Strasbourg, 1 rue Laurent Fries, Illkirch, F-67404, France. Tel: +33 388 653 309, Fax: +33 388 653 201, Email: ncharlet@igbmc.fr

ABSTRACT:

Myotonic dystrophy (DM) is the most common muscular dystrophy in adults and the first recognized example of a RNA-mediated disease. DM is caused by the expression of mutant RNAs containing expanded CUG or CCUG repeats. These mutant RNAs sequester the splicing regulator Muscleblind-like-1 (MBNL1), resulting in misregulation of alternative splicing of pre-mRNAs targets of MBNL1. Cardiac involvement, which is the second cause of death of DM patients, is characterized by cardiac conduction delays and tachyarrhythmia of unknown causes. Using massive parallel sequencing, we identified various novel splicing alterations in heart samples of DM patients, among which, a robust alteration of the alternative splicing of the sodium channel *SCN5A* pre-mRNA. Mutations in *SCN5A* cause a variety of arrhythmic disorders, including Cardiac Conduction Disease and Brugada Syndrome, two features of myotonic dystrophy. We found that MBNL1 binds to the *SCN5A* pre-mRNA and regulates its alternative splicing. Depletion of MBNL1 activity reproduces the misregulation of *SCN5A* splicing observed in DM. The splicing isoform of *SCN5A* produced in DM presents a pronounced shift of steady-state activation towards depolarized potentials and reduced peak current densities. These results demonstrate that altered splicing of *SCN5A* mRNA results in expression of a less active form of this channel, resulting in reduced sodium current, which may contribute to the cardiac dysfunctions observed in patients with myotonic dystrophy.

TEXT:**INTRODUCTION:**

Myotonic dystrophy is the most common adult-onset muscular dystrophy and comprises two genetically distinct forms. Myotonic dystrophy of type 1 (DM1) and its severe congenital form (CDM1) are caused by an expansion of CTG repeats in the 3'-untranslated region of the *DMPK* gene¹⁻³. In contrast, myotonic dystrophy of type 2 (DM2) is caused by an expansion of CCTG repeats within the first intron of the *ZNF9* (also known as CNBP) gene⁴.

The molecular mechanism of DM pathologies involves a RNA gain-of-function mechanism caused by expression of mutant RNAs containing hundred to thousand of CUG or CCUG repeats that interfere with the splicing of other pre-mRNAs through dysfunction of two classes of RNA binding proteins⁵⁻⁷. Muscleblind-like proteins (MBNL1, MBNL2 and MBNL3) are sequestered within nuclear RNA aggregates formed by expanded CUG and CCUG repeats⁸⁻¹⁰, whereas expression and phosphorylation of CUG-binding protein 1 (CUGBP1) are increased in DM1 heart samples¹¹. MBNL and CUGBP1 proteins are RNA splicing factors, and alterations of their functional levels in myotonic dystrophic tissues results in reversion to embryonic splicing patterns for several mRNAs, such as the insulin receptor (*INSR*)¹², the muscle chloride channel (*CLCN1*)^{13,14} and key components of the skeletal muscle excitation-contraction coupling process, including Amphiphysin2 (*BINI*)¹⁵, ryanodine receptor 1 (*RYR1*)¹⁶, sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase SERCA1 (*ATP2A1*)¹⁶ and the muscle calcium channel CAV1.1 (*CACNA1S*)¹⁷. Misregulation of the alternative splicing of the chloride channel *CLCN1* is responsible for the myotonia^{13,14,18}; while alterations of the alternative splicing of *BINI*, *RYR1*, *ATP2A1* and *CACNA1S* contribute to the skeletal muscle weakness observed in DM patients¹⁵⁻¹⁷.

In contrast, the molecular mechanisms underlying the cardiac defects, which affect 80% of DM patients and represent the second cause of their death, are unclear. Cardiac involvements in patients with myotonic dystrophy are characterized by cardiac conduction delay resulting in fatal atrio-ventricular blocks, and by atrial or ventricular tachycardia resulting in sudden death of these patients¹⁹⁻²². Both aspects are reminiscent of Cardiac Conduction Disease (also known as Lev-Lenègre disease) and Brugada Syndrome²³, which are caused by mutations in the *SCN5A* gene²⁴⁻²⁷. Nav1.5, encoded by *SCN5A*, is the alpha-subunit of the cardiac voltage-gated Na⁺ channel and plays a key role in the excitability of cardiomyocytes and for rapid

propagation of the impulse through the cardiac conduction system. Mutations in *SCN5A* lead to a variety of arrhythmic disorders, including long QT, atrial standstill, Sick Sinus Syndrome, Sudden Unexplained Death Syndrome, progressive and non-progressive Cardiac Conduction Disease, Brugada Syndrome and numerous overlapping syndromes²⁴⁻²⁷. Furthermore, alterations in *SCN5A* expression and/or sodium current density have been frequently noticed in acquired cardiac disorders²⁴⁻²⁷.

Using transcriptomic approaches, we identified various novel splicing changes in heart samples of DM1 patients, which present enrichment for MBNL binding sites, but not for CUGBP1 binding sites. Among these novel splicing alterations, we identified a robust misregulation of alternative splicing of *SCN5A* pre-mRNA in CDM1, DM1 and DM2 heart samples. MBNL1 binds to *SCN5A* pre-mRNA and depletion of MBNL1 activity recapitulates the misregulation of *SCN5A* splicing observed in DM patients. This splicing alteration results in expression of a less active form of *SCN5A*, presenting a pronounced shift of steady-state activation towards depolarized potentials and reduced peak current densities. Of importance, these alterations are similar to that of loss-of-function mutations of *SCN5A* causing Cardiac Conduction Disease or Brugada Syndrome. These results suggest that altered splicing of *SCN5A* mRNA may contribute to cardiac conduction delay and arrhythmias observed in patients with myotonic dystrophy.

RESULTS:

Identification of splicing changes in heart samples of myotonic dystrophy.

To determine novel splicing abnormalities in heart samples of myotonic dystrophic patients, we first used whole-genome microarrays (GeneChip Human Exon 1.0 ST array) on left ventricle samples of three DM1 patients compared to three controls. Paired comparisons predicted 25 significant (PSI >2, p-value <0.1) alternative splicing changes between controls and DM1 (Supplemental Table 1), including a splicing alteration in *SCN5A*, the main sodium channel in heart whose alterations lead to cardiac conduction defects and heart arrhythmias²⁴⁻²⁷. Additional analysis using Genespring software resulted in similar prediction, with 24 significant (Fold Change >1.5, p-value <0.001) exons altered between control and DM samples (Supplemental Table 2). To extend this analysis, we performed paired-end RNA sequencing (RNA-seq) on the same DM1 and control heart samples, yielding 1,990 million uniquely mapped 100-base reads. DEXSeq²⁸, which tests differential exon usage between two conditions, predicted 61 significant (Fold Change >1.5, p-value <0.1) splicing changes

between control and DM1 samples (supplemental Table 3). MISO²⁹, which computes the fraction of mRNA that include a given cassette alternative exon, predicted 259 significant ($\Delta\text{PSI} > 0.3$; $Z\text{-score} > 1.2$) changes between DM1 and control heart samples (Figure 1A and supplemental Table 4), including some that have been previously identified in heart (*TNNT2*)⁵, skeletal muscle (*TNNT3*, *LDB3*, *PDLIM3*, *MYOM1*, *NCOR2*, *MBNL1*, *MBNL2*)³⁰⁻³³ and brain (*CLASP*, *MAPT*)³⁴⁻³⁶ of DM patients, and thus validated our method. MISO and DEXSeq predictions largely overlapped, with some rare exceptions, such as the skipping of the consecutive exons 18, 19 and 20 of *CAMK2B* determined by DEXSeq but not by MISO; or the shift of *SCN5A* exon 6B toward exon 6A identified by MISO but not by DEXSeq. These differences are inherent to their computation models, since MISO does not detect alterations of successive exons and DEXSeq does not identify mutually exclusive exons. Overall, RNA-seq analyzes confirmed microarrays data and predicted numerous novel splicing alteration in heart of DM patients, including a robust splicing misregulation of *SCN5A* (Figure 1B). RT-PCR analyzes confirmed these predictions and revealed various novel splicing alterations in heart samples of DM patients (Figure 1C).

Exons alternatively spliced in DM patients are enriched for MBNL binding sites.

Mutants RNAs containing expanded CUG or CCUG repeats interfere with the functional levels of CUGBP1 and MBNL proteins. Earlier studies determined that MBNL proteins bind to YGC RNA motifs (where Y is a pyrimidine)³⁷⁻⁴¹, while CUGBP1 binds to UGU-enriched sequences⁴²⁻⁴⁴. To determine whether these RNA motifs are indeed present in the vicinity of exons mis-regulated in DM patients, we determined all 4-mer RNA motifs enriched within, upstream or downstream of the top 400 exons found mis-regulated in DM1 heart samples, compared to 2000 control exons (Figure 2A). Most RNA motifs significantly enriched ($p\text{-value} < 1.0 \cdot 10^{-7}$) contained YGC sequences, while none were found to contain UGU sequences. Furthermore, YGC sequences were enriched upstream of exons abnormally included in DM1, while YGC motifs were enriched downstream of exons repressed in DM1. These results matched MBNL splicing regulatory map determined by CLIP experiments and where binding of MBNL upstream of an exon tend to inhibit exon inclusion, whereas binding of MBNL downstream of an exon generally stimulate exon inclusion^{36,45}. These data suggest that the principal component of splicing misregulation in DM patients is the sequestration of MBNL proteins, while CUGBP1 overexpression misregulates only a sub-set of splicing events.

Previous analyzes indicated that alternative splicing changes in mouse models DM resume a fetal splicing pattern that persist in adult tissues^{36,45-47}. Thus, splicing misregulations identified in heart of adult DM1 patients were tested in fetal and adult control heart samples (Figure 2B). Similarly to mouse models, alternative splicing changes in adult DM1 resume a fetal pattern of splicing. Overall, these data confirm, in human samples, a model in which DM is due to loss-of-function of a developmental splicing regulator binding to YGC RNA motifs.

Alternative splicing of *SCN5A* is misregulated in heart of DM patients.

Both microarrays and RNA-seq identified a misregulation of alternative splicing of *SCN5A* pre-mRNA in heart samples of DM1 patients. Splicing of *SCN5A* is developmentally regulated^{48,49} such as exon 6A, which is included in fetal heart, is rapidly replaced by exon 6B after birth (Figure 3A). Exons 6A and 6B are mutually exclusive exons encoding the voltage sensor segment 4 located in the domain I of the sodium channel (Figure 3B). This is a key segment for the electrical activity of *SCN5A*, and inclusion of either exon 6A or exon 6B results in channel variants with different electrophysiological properties⁵⁰⁻⁵². RT-PCR confirmed that *SCN5A* exon 6B is replaced by its mutually exclusive exon 6A in heart samples of individuals with myotonic dystrophy (Figure 3C). *SCN5A* misregulation correlated with disease severity, since adult exon 6B was mostly replaced by fetal exon 6A in severe congenital CDM1, but partially replaced in the milder adult DM1 and DM2 forms (Figure 3D). Misregulation of *SCN5A* splicing was specific to myotonic dystrophy, as we did not observe inclusion of exon 6A in heart samples from people with amyotrophic lateral sclerosis (Figure 3D). Finally, quantitative RT-PCR analysis showed no alteration of the global level of *SCN5A* expression (data not shown). Overall, these results indicate a specific misregulation of alternative splicing of *SCN5A* resulting in expression of a fetal form of this channel in DM patients.

Alternative splicing of *SCN5A* is regulated by MBNL1.

To determine the mechanisms underlying misregulation of *SCN5A* splicing, we first determined its splicing pattern in primary cultures of differentiated muscle cells from control and DM1 patients. RT-PCR experiments determined a switch of exon 6B toward exon 6A in DM1 muscle cells compared to control (Figure 4A). Depletion of MBNL1 by an siRNA-mediated approach mimicked the effect of CUG repeats and repressed exon 6B inclusion, recapitulating the misregulation observed in DM cells and patients (Figure 4B). As controls for reduction in MBNL1 activity, we determined MBNL1 expression by western blotting, as

well as the splicing pattern of *ATP2A1* (SERCA), *DMD* and *BINI*, which are physiological targets of MBNL1 and are misregulated in DM^{15,16} (Figure 4C). These results indicate that MBNL1 is a regulator of *SCN5A* exons 6A/6B splicing. Next, to determine whether MBNL1 regulation is direct or indirect, we constructed a minigene containing exons 6A and 6B of *SCN5A* bordered by their intronic regions. Expression of this construct in mouse C2C12 myoblasts reproduced a fetal pattern with inclusion of exon 6A. Since exon 6B was repressed, reduction of Mbnl1 activity through siRNA or expression of expanded CUG repeats had no further repressive effect on exon 6B. In contrast, expression of GFP-tagged MBNL1 promoted inclusion of exon 6B, while expression of CUGBP1 or CUGBP2 (ETR3/CELF2) had no effect (Figure 4D). Next, gel-shift assays determined that recombinant purified GST-tagged MBNL1 bound to UGC RNA motifs located upstream of exon 6A (Figure 4E). Of interest, this YGC stretch was not conserved in mouse, suggesting that alternative splicing of exons 6A/6B is not regulated by Mbnl proteins in mice (data not shown). Mutation of these UGC motifs abolished MBNL1 binding (Figure 4F), as well as the regulatory effect of MBNL1 on a mutant *SCN5A* minigene (Figure 4F). Mutations of MBNL1 binding sites also reduced the regulatory effect of expanded CUG repeats, indicating that the trans-dominant effect of expanded CUG repeats on *SCN5A* splicing requires functional MBNL1 binding sites. Overall, these results established that MBNL1 regulates directly alternative splicing of *SCN5A* exons 6A/6B.

Alternative splicing of *SCN5A* generates isoforms with different properties.

SCN5A is the main cardiac voltage-gated sodium channel and mutations of *SCN5A* lead to a variety of arrhythmic disorders, including Cardiac Conduction Disease and Brugada Syndrome; two features identified in DM patients. Furthermore, exons 6A and 6B differ at seven amino acid positions, resulting in channel variants with different electrophysiological properties⁵⁰⁻⁵². To investigate the consequences of *SCN5A* exon 6B switch to exon 6A for myotonic dystrophy, we first examined the Na⁺ currents generated by *SCN5A* splice variant containing either exon 6A or exon 6B (Figure 5A and supplemental Table 5). Quantifications of the peak current indicated a 50% decrease of current amplitude for the splicing isoform of *SCN5A* found in myotonic dystrophic patients compared to the normal *SCN5A* exon 6B form (Figure 5B). Since, the extend of splicing misregulation varies according patients, with some, typically CDM1, presenting little exon 6B left, while other, such as DM2, present milder splicing changes; we tested the voltage current generated by a mix of *SCN5A* forms (Figure 5A). Expression of an equimolar mix of each channel resulted in a reduction of 30% of the

current amplitude compared to the normal SCN5A exon 6B form (Figure 5B). Quantification of the current-voltage relationships confirmed that the sodium channel expressed in DM is a lesser active form (Figure 5C). Next, patch-clamp recording confirmed previous studies⁵⁰⁻⁵² and revealed that the steady-state activation of the SCN5A splicing isoform expressed in DM and containing exon 6A was shifted towards hyperpolarized potential compared to the control SCN5A exon 6B form (Figure 5D). An equimolar mix of DM (exon 6A) and control (exon 6B) SCN5A isoforms, which more faithfully reflects the situation in adult DM1 and DM2 patients, confirmed that the splicing form expressed in DM present a reduced excitability (Figure 5D). A result confirmed by measure of the inactivation time constants (Figure 5E). In contrast, no significant differences were obtained regarding steady-state inactivation and recovery from inactivation whether SCN5A contained exon 6A or exon 6B (data not shown). Overall, these results demonstrate that the splicing form of the sodium channel expressed in DM patients, SCN5A exon 6A, presents a reduced excitability, which is consistent with conduction delay and ventricular fibrillation observed in these patients.

DISCUSSION:

In patient and mouse models of DM, expansions of CUG or CCUG repeats interfere with the splicing of other pre-mRNAs through increase expression of CUGBP1 and sequestration of the MBNL proteins⁸⁻¹¹. Using RNA-seq we identified numerous novels splicing misregulations in heart samples of DM1 patients. Identification of RNA motifs enriched in vicinity of these misregulated exons revealed presence of YGC motifs located upstream and within exons abnormally included in DM, while these motifs are located downstream of exons excluded in DM. UGC and CGC RNA motifs are known binding sites for MBNL proteins³⁷⁻⁴¹ and their localization, downstream or upstream of misregulated exons, match Mbnl splicing regulatory maps determined by CLIP experiments in mouse cells or tissues^{36,45}. We also noted an enrichment for a CCCC RNA sequence upstream of exons enhanced in DM. PolyC are binding sites for hnRNP K, a RNA binding protein involved in Spinocerebellar ataxia 10 (SCA10), an RNA gain-of-function disease caused by expansion of AUUCU repeats⁵³. However, we found no significant enrichment of CCC sequences downstream of excluded exons in DM patients, no colocalization of hnRNP K within CUG or CCUG RNA aggregates (data not shown) and CCC RNA motifs were not reported enriched in RNA-seq analyzes of DM models^{36,45}, thus relevance of hnRNP K for DM pathology remains to be determined. In contrast to YGC sequences, no enriched motifs contained UGU sequences, which are CUGBP1 binding sites⁴²⁻⁴⁴. Similarly, no enrichment for binding site to hnRNP H, rbFOX or

PTB proteins was identified. These results support a model in which the main cause of splicing change in DM is the sequestration of MBNL proteins, while the overexpression of CUGBP1 misregulates only a subset of splicing. This model, supported by minigene analyzes in cell models⁵⁴, by transcriptomic data in mouse models^{36,45,46} and by rescue experiments also in mice⁵⁵, is now verified by RNA-seq results in human patients.

Cardiac defects affect 80% of DM patients and represent the second cause of their death. However, the molecular mechanisms responsible of cardiac conduction delay and/or ventricular tachycardia in DM are unclear. Using microarrays and RNA-seq we identified various novel splicing misregulations in heart samples of DM1 patients. Among these changes, the splicing switch from adult exon 6B to fetal exon 6A in *SCN5A* mRNA is of special interest. Mutations in *SCN5A* lead to a variety of cardiac disorders, including Cardiac Conduction Disease and Brugada Syndrome²⁴⁻²⁷. Cardiac Conduction Disease, also known as Lev-Lenègre disease, is characterized by prolongation of the P wave and PR segment duration associated with ventricular fibrosis of the His-Purkinje system conduction system resulting in fatal atrio-ventricular and bundle branch blocks. Brugada Syndrome is characterized by ventricular conduction abnormalities and covered-type ST-segment elevation in the anterior precordial leads resulting in high risk for sudden cardiac death secondary to ventricular tachycardia or fibrillation. Of interest, an overlap exists between Cardiac Conduction Disease and Brugada Syndrome, since (1) decreased sodium conductance accounts for both clinical entities^{56,57}, (2) conduction defect is a striking feature of patients carrying a mutation of *SCN5A* responsible of Brugada Syndrome⁵⁸ and (3) an identical mutation in *SCN5A* can lead either to Brugada Syndrome or to Cardiac Conduction Disease depending on individuals^{59,60}. Cardiac defects in DM patients are characterized by cardiac conduction delay and by atrial or ventricular tachycardia resulting in sudden death of these patients¹⁹⁻²². Both aspects are evocative of a dysfunction of the *SCN5A* channel in DM patients. Electrophysiological studies confirm that hypothesis and reveal that the splicing isoform of *SCN5A* found in DM and that contains the fetal exon 6A, possesses a reduced excitability compared to the normal adult *SCN5A* isoform. Of importance, electrophysiological features of the isoform of *SCN5A* expressed in DM are similar to that of mutations of *SCN5A* causing Brugada Syndrome or Cardiac Conduction Disease. These results suggest that misregulation of splicing of *SCN5A* in heart of DM patients results in expression of a lesser active channel, which is associated with the cardiac symptoms observed in these patients. A model also supported by clinical evidences, such as similarities in electrocardiogram recording between individuals affected by

DM, Brugada Syndrome and Cardiac Conduction Disease; or by the remarkable higher prevalence of Brugada Syndrome in DM individuals compared to general population^{22,23}. Also, these finding may have some clinical importance such as reconsidering treatment with pharmaceutical agents reducing SCN5A activity, such as mexiletine or flecainide antiarrhythmic, in DM; or suggesting implantation of cardioverter defibrillator acting both as pacemaker and defibrillator, since SCN5A dysfunction may results in atrial and ventricular tachyarrhythmias causing sudden death despite pacemaker implants in DM patients.

Finally, RNA-seq predicts various other splicing misregulations, including some that can be of interest for DM pathology beyond heart defects. For example, invalidation of the *Socs7* gene in mouse results in insulin resistance⁶¹; whether splicing change of *SOCS7* in DM patients is also involved in insulin resistance is an attractive hypothesis that remains to be tested. Similarly, SUN1 and SUN2 proteins⁶² represent interesting candidates to the central localization of nuclei in DM skeletal muscles. FCGRT (also named FCRN) is involved in IGG recycling⁶³, RNA-seq predicts an increased intron retention in FCGRT; whether this may contribute to the decreased IGG level in blood of DM patients remains to be tested. Also, RNA-seq predicts a misregulation of CUGBP1 splicing, which may contribute to the increase expression of CUGBP1 in DM1 hearts.

ACKNOWLEDGMENTS:

We thank Tom Cooper (Baylor College of Medicine, Houston, USA) for the gift of the DT960 and tgCUGBP1 plasmids, Christiane Branlant (CNRS, Nancy, France) for the gift of the pGEX-MBNL1 Δ 101 vector, Maurice Swanson (University of Florida, Gainesville, USA) for the gift of the pGEX-6P-MBNL1-His vector, the IGBMC facilities for assistance and all members of the French DM Network for fruitful discussion.

FUNDING CONTRIBUTIONS

This work was supported by INSERM (NCB), ANR and E-RARE “HEART DM” (NCB), ERC “RNA DISEASES” (NCB).

AUTHOR CONTRIBUTIONS:

Experiments were performed by F.F., Y.K., T.L., C.S., C.T. and B.J. Bioinformatic analyzes were performed by E.W., C.B. and D.A. Clinical samples and patient data were obtained from A.L.M., B.U., J.W.D., D.D., K.W. and F.D. Data were collected and analyzed by D.F., T.Z., M.P.T and N.C.B. The study was designed, coordinated and written by D.F., M.P.T and N.C.B.

FIGURE LEGENDS:**Figure 1.**

Identification of novel splicing misregulations in DM hearts. (A) Δ -PSI versus Z-score plot of exon cassettes misregulations predicted by MISO analysis. (B) Exons structure and coverage of RNA-seq reads across *SCN5A* exon 5 to 7 show increased inclusion of exon 6A and decreased inclusion of exon 6B in heart samples of DM patients (bottom, blue) versus control (top, red). (C) Validation of RNA-seq predictions by RT-PCR analyzes of various mRNAs from human heart samples of normal adult individuals (CTL, black) versus adult DM1 patients (red).

Figure 2.

MBNL binding sequences are enriched in vicinity of misregulated exons. (A) Sequence and p-value of 4-mer RNA motifs enriched downstream, within and upstream of exons misregulated in DM1 heart samples. Sequences enriched in exons excluded in DM are indicated in red, while sequences enriched in exons included in DM are indicated in blue. (B) Representative RT-PCR analyzes of various mRNAs from human heart samples of non-DM fetuses (20, 24 and 35 weeks, red) versus adult control individuals (black).

Figure 3.

***SCN5A* exon 6A is abnormally included in myotonic dystrophic patients.** (A) Schematic representation of mutually exclusive exons 6A and 6B of *SCN5A*. *SCN5A* mRNA includes exon 6A (red) in fetal heart, while *SCN5A* mRNA expresses exon 6B (blue) in adult heart. (B) Schematic presentation of *SCN5A* topology expressing exon 6A (red). Exon 6A or 6B encodes part of segment 3, connecting loop between S3 and S4 and most part of the voltage-sensitive segment 4 of domain 1 of *SCN5A*. (C). Representative RT-PCR analysis of endogenous *SCN5A* mRNA from human heart samples of normal adult individuals (Control), CDM1 fetuses, DM1 and DM2 adult patients. (D) Graphical representation of RT-PCR analysis depicting the percentage of *SCN5A* mRNA including exon 6A in heart samples from normal adults, non-DM myopathies (amyotrophic lateral sclerosis), non-DM fetuses (20, 24 and 35 weeks), CDM1 (fetuses from 22, 25 and 28 weeks), DM1 and DM2 (adults) individuals.

Figure 4.

MBNL1 regulates alternative splicing of *SCN5A*. (A) Upper panel, RT-PCR analysis of endogenous *SCN5A* mRNA from primary cultures of muscle cells from control or DM1 individuals differentiated 7 days. Lower panel, quantification of the percentage of *SCN5A* mRNA including exon 6A. (B) Upper panel, RT-PCR analysis of endogenous *SCN5A* mRNA from primary cultures of muscle cells from control individuals differentiated 5 days and transfected with a scrambled siRNA (siCTL) or a siRNA targeting *MBNL1* mRNA (siMBNL1). Lower panel, percentage of *SCN5A* mRNA including exon 6A. (C) Upper panels, control immunoblots for MBNL1 and GAPDH of panel B. Lower panels, control RT-PCR assays for alternative splicing of SERCA (*ATP2A1*) exon 22, *BINI* exon 11 and *DMD* exon 78. Same RNA than in B. (D) Upper panel, RT-PCR analysis of exogenous *SCN5A* mRNA from C2C12 muscle cells differentiated 2 days and co-transfected with a *SCN5A* minigene containing exons 6A and 6B bordered by their introns and with either a plasmid expressing 960 CTG repeats, GFP-MBNL1, GFP-CUGBP1 or GFP-CUGBP2, or with a siRNA directed against *MBNL1*, *CUGBP1* or *CUGBP2*. # Indicates an artificial PCR band due to usage of a cryptic splice site inherent to the minigene. Lower panel, percentage of *SCN5A* mRNA including exon 6A. (E) Upper panel, schematic representation of *SCN5A* minigene, including the UGC rich sequence used for binding assays. Lower panel, Gel-shift assays were performed using 5 to 1000 nM of purified bacterial recombinant GST-MBNL1 Δ and a uniformly 32 P-CTP labeled RNA. (F) Upper panel, schematic representation of mutant *SCN5A* minigene, including the mutant sequence used for binding assays. Lower panel, Gel-shift assays performed as in panel E. (G) Upper panel, RT-PCR analysis of exogenous *SCN5A* mRNA from C2C12 muscle cells differentiated 2 days and co-transfected with mutant *SCN5A* minigene, presented in F, and with a plasmid expressing 960 CTG repeats or GFP-MBNL1 or with a siRNA directed against *MBNL1*. # Indicates an PCR band due to usage of a cryptic splice site inherent to the minigene. Lower panel, percentage of *SCN5A* mRNA including exon 6A. Bars indicate s.e.m. *** indicates $p < 0.001$.

Figure 5.**The splicing form of *SCN5A* expressed in myotonic dystrophic patients is less active.**

(A) Representative Na⁺ currents generated by expression of *SCN5A* containing exon 6A or exon 6B or by expression of a mix of *SCN5A* isoforms (50% *SCN5A* expressing exon 6A and 50% expressing exon 6B) in *Xenopus* oocytes. (B) Peak current amplitudes at the test potential of -10 mV of cRNA injected as in panel A. (C) Current-voltage relationships. (D)

Steady-state activation curves. (E) Inactivation time constants (ms) at different test pulses. Bars indicate s.e.m. *** indicates $p < 0.005$.

Supplemental Table 1.

Alternative splicing changes predicted by paired comparisons analysis of GeneChip Human Exon 1.0 ST array of 3 controls and 3 DM1 heart samples. Only the most significant (PSI > 2 , p-value < 0.1) misregulations are presented.

Supplemental Table 2.

Alternative splicing changes predicted by Genespring analysis of GeneChip Human Exon 1.0 ST array of 3 controls and 3 DM1 heart samples. Most significant (Fold Change > 1.5 , p-value < 0.001) misregulations are presented.

Supplemental Table 3.

Alternative splicing changes predicted by DEXSeq analysis of paired-end RNA sequencing of 3 controls and 3 DM1 heart samples. Most significant (Fold Change > 1.5 , p-value < 0.1) misregulations are presented.

Supplemental Table 4.

Alternative splicing changes predicted by MISO analysis of paired-end RNA sequencing of 3 controls and 3 DM1 heart samples. Most significant (Δ PSI > 0.3 ; Z-score > 1.2) misregulations are presented.

Supplemental Table 5.

Electrophysiological properties of SCN5A channel containing either exon 6A or exon 6B expressed in *Xenopus* oocytes.

Supplemental Table 6.

Human primers used to analyze the alternative spliced exons in human heart samples.

METHODS

Samples

All samples were heart left ventricles. Non affected heart samples (CTL #1 and #2) were purchased at Ambion and Stratagene, respectively. CTL #3 was a patient suffering from familial dilated cardiomyopathy of uncharacterized genetic origin. CTL #4 to #6 were ALS patients described previously (Nakamori *et al.*, *Neurology* 70(9):677–685, 2008). DM1 patient #1 and 2 were from cardiac transplantation for end stage heart failure with conduction system disease in a 45-year-old male and a 48-year-old female suffering from DM1. DM1 patient #3 to #5 have been described previously (Nakamori *et al.*, *Neurology* 70:677–685, 2008) with expansion of 4300 (female, 58 years), 4800 (male, 63 years), 5800 (female, 56 years) and ~6000 CTG repeats in heart. DM2 patients were described previously (Schoser *et al.*, *Neurology* 63(12):2402-4, 2004).

mRNA sequencing

After isolation of total cellular RNA from human heart samples, libraries of template molecules suitable for high throughput DNA sequencing were created using “TruSeq™ RNA Sample Preparation v2 Kit” (Illumina). Briefly, mRNA was purified from 1 µg total RNA using poly-T oligo-attached magnetic beads and fragmented using divalent cations at 94°C for 8 minutes. The cleaved mRNA fragments were reverse transcribed to cDNA using random primers then the second strand of the cDNA was synthesized using DNA Polymerase I and RNase H. The double stranded cDNA fragments were blunted using T4 DNA polymerase, Klenow DNA polymerase and T4 PNK. A single ‘A’ nucleotide was added to the 3’ ends of the blunt DNA fragments using a Klenow fragment (3’ to 5'exo minus) enzyme. The cDNA fragments were ligated to double stranded adapters using T4 DNA Ligase. The ligated products were enriched by PCR amplification (30 sec at 98°C; [10 sec at 98°C, 30 sec at 60°C, 30 sec at 72°C] x 12 cycles; 5 min at 72°C). Then surplus PCR primers were removed by purification using AMPure XP beads (Agencourt Biosciences Corporation). DNA libraries were checked for quality and quantified using 2100 Bioanalyzer (Agilent). The libraries were loaded in the flow cell at 7pM concentration and clusters were generated in the Cbot and sequenced in the Illumina Hiseq 2000 as paired-end 2x100 base reads. FASTQ files were generated with CASAVA v1.8.2.

RT-PCR analysis of *SCN5A*.

Total RNA isolated from samples of control and DM1 ventricular heart was subjected to RT-PCR analysis using primers located within human *SCN5A* exon 5 (FWD: 5'-CTTCTGCCTGCACGCGTTCAC-3') and *SCN5A* exon 7 (REV: 5'-CAGAAGACTGTGAGGACCATC-3')/ The PCR products were digested by BstBI enzyme, resulting in PCR products of 240 bp (+ex6B) and 115 bp + 125 bp (+ex6A).

***SCN5A* minigene construction and analysis.**

The exons 5, 6A, 6B and 7 were PCR amplified from human DNA (Clontech) with FWD : 5'-AAAAGCTAGCGTACACCTTCACCGCCATTTACACC-3' and REV: 5'-AAAAGCGGCCGCGGATCACTGAGGTAAAGGTCCAGG-3', and inserted between the NheI and NotI restriction sites of pCDNA3.1+ Neo (Invitrogen). Mutations in *SCN5A* intron 5 were introduced by primer-directed PCR mutagenesis. C2C12 cells plated in 6-well plates were co-transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions with *SCN5A* minigene and DMPKS DT960, V5-CUGBP1, V5-MBNL1 40 kDa (NM_207292) and siRNA directed against MBNL1 (5'-CACGGAAUGUAAAUUUGCAAdTdT-3'; Eurogentec) or against CUGBP1 (NM_198700; NM_006560; NM_001025596; NM_001172640; NM_001172639; Thermo Scientific), or against CUGBP2 (NM_001110228, NM_001110230; NM_001110232; NM_001160292; NM_010160; NM_001110231; NM_001110229; NM_001160293; Thermo Scientific) in DMEM medium containing 1g/l glucose and 2% horse serum (37°C, 5% CO₂) during 24 hours. Total RNAs were extracted using Tri Reagent (MRC) and subjected to reverse-transcription using Transcriptor Reverse Transcriptase kit (Roche). PCR were performed using Taq polymerase (Roche), one denaturation step at 94°C for 2 min, 26 cycles of amplification 94°C for 1 min, 58°C for 30 sec., 72°C for 45 sec., and a final step at 72°C for 7 minutes using the forward primer (5'- CTTCTGCCTGCACGCGTTCAC-3') and the reverse (5'-acgggcctctagactcg-3') specific to pCDNA3.1- *SCN5A* minigene. The PCR products were digested by BstBI enzyme. PCR products of mRNAs including exon 6A and 6B are of 116 + 71 bp and 187 bp, respectively. PCR products were precipitated, analyzed by electrophoresis on 6,5% polyacrylamide gel, BET labeled and quantified using Typhoon scanner.

Recombinant protein production and purification.

E. coli BL21(RIL) pRARE competent cells (Invitrogen) were transformed with peGEX-MBNL1- Δ 101 (MBNL1 Δ cter, gift from Dr C. Branlant), grown at 37°C in 400 ml of LB medium supplemented with Kanamycin until OD₆₀₀=0.5, 0.5 mM IPTG was added and the culture was further incubated 4 hours at 30°C. Harvested cells were sonicated in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 5% glycerol, 1 mM DTT, 5 mM EDTA, centrifuged 20 min at 20000 g and recombinant GST-MBNL1- Δ 101, protein was purified using GST-Kits (Novagen) and store in 20% glycerol.

***in vitro* RNA transcription.**

Templates for transcription were obtained by PCR with pCDNA3.1-SCN5A or pCDNA3.1-SCN5A mutant minigenes and the primers (FWD: TAATACGACTCACTATAGGGCCATGGAACTGGCTGGACTTT and REV: AGAAAGAGAGGGGTGGTCG). Transcription reaction was performed using T7 transcription kit (Ambion) in presence of 1 μ l of α P³²-CTP (10 μ Ci, 800 Ci/mmmole, Perkin Elmer), analyzed on 8% denaturing polyacrylamide and quantified with LS-6500 counter (Beckman). After transcription, 1 unit of DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA) was added, and the sample was incubated for additional 30 min at 37°C. Transcribed RNAs were then purified by micro Bio-Spin 6 chromatography columns (Bio-rad) according to the manufacturer's instructions. The sizes of RNAs were checked by gel electrophoresis on a denaturing 6% polyacrylamide gel.

Gel Shift assays.

1 μ L of labeled RNA was annealed in binding buffer (BB, 50 mM Tris-HCl (pH 7.0), 75.0 mM NaCl, 37.5 mM KCl, 5.25 mM DTT, 0.1 mg/mL BSA, 0.1 mg/mL Bulk tRNA) at 90°C for 5 min. and allowed to cool to room temperature by placing on a bench top. After cooling, MgCl₂ and RNasin were added to a final concentration of 0.75 mM and 0.4 U/ μ L respectively. GST-MBNL1- Δ 101 protein was then added to the above solution and the mixture was incubated on ice for 20 min. The solution mixture was loaded onto a non-denaturing 6.0% (w/v) polyacrylamide gel (acrylamide/bisacrylamide, 40:1, w/w) containing 0.5X TBE (1X TBE is 90 mM Tris-base, 89 mM Boric acid and 2 mM EDTA (pH 8.0)), which had been pre-electrophoresed at 110 V for 20 min. at 4°C. The gel was electrophoresed at 110 V at 4°C for 3 hours. The gel was then dried and exposed to a phosphorimager screen and imaged using a Typhoon 9410 variable mode imager. The data were fit to the following

equation: $y = \min + ((\max - \min) / (1 + (x / IC50)^{-HillSlope}))$ where y is the percentage of RNA bound to MBNL1, x is the concentration of MBNL1, min and max are the minimum and maximum percentage of RNA bound to MBNL1 (0-100%) and IC50 is the concentration where 50% of maximum binding is achieved.

Expression in *Xenopus laevis* oocytes.

For *in vitro* transcription, the coding regions of all constructs were recloned into the pSP64Poly(A) vector (Promega, WI, USA). The preparation of oocytes from *Xenopus laevis*, *in vitro* transcription and cRNA injection were performed according to established procedures [Zimmer T, Benndorf K (2002) The human heart and rat brain IIA Na⁺ channels interact with different molecular regions of the beta1 subunit. J Gen Physiol 120: 887–895]. For current comparisons, the cRNA concentration for each variant was adjusted to ~0.04 µg/µL (40 and 60 nL per oocyte) by dilution. After 3 days of incubation at 18°C in Barth medium, the whole-cell hNa_v1.5 peak current amplitude was usually between 0.5 and 6.0 µA. Measurements were repeated for at least 5 different batches of oocytes. Whole-oocyte Na⁺ currents were recorded with the two-microelectrode voltage clamp technique using an OC725C amplifier (Warner Instruments, Hamden, CT, USA). The glass microelectrodes were filled with 3 mol/L KCl. The microelectrode resistance was between 0.2 and 0.5 MΩ. The bath solution contained (in mmol/L): NaCl 96, KCl 2, CaCl₂ 1.8, HEPES 10, pH 7.2 (KOH). All experiments involving *Xenopus laevis* oocytes were prior-approved by the local government office (Thüringer Landesamt Weimar, Fachgebiet Tierschutz, no. 740-2684-04-02-73/96), and conformed to both institutional and NIH guidelines.

Pulse protocols and evaluation of electrophysiological data from oocytes

Steady-state activation was determined by applying test potentials from –120 to 50 mV in 5 mV or 10 mV increments at a pulsing frequency of 0.5 Hz. Data were fitted to the Boltzmann equation $G_{Na} = [1 + \exp((V_{1/2} - V)/k)]^{-1}$ where $V_{1/2}$ is the half-maximal voltage, k is the slope factor, and the Na⁺ conductance G_{Na} is defined by $G_{Na} = I_{Na,norm}/(V - V_{rev})$. Here, $I_{Na,norm}$ is the normalized peak current, and V_{rev} is the reversal potential.

Steady-state inactivation was determined with a double pulse protocol consisting of 500 ms prepulses from the holding potential of –120 mV (or –140 mV for R1632H only) to voltages between –140 and –20 mV (or –160 and –20 mV for R1632H only), followed by a constant test pulse of 20 ms duration to –20 mV at a pulsing frequency of 0.5 Hz. The amplitude of peak current I_{Na} during the test pulse was normalized to the maximum peak current $I_{Na,max}$ and plotted against the prepulse potential. Data were fitted with the Boltzmann function $I_{Na} = I_{Na,max}[1 + \exp((V_{1/2} - V)/k)]^{-1}$, where V is the test potential, and $V_{1/2}$ and k are as defined above.

Recovery from inactivation was determined with a double pulse protocol consisting of 500 ms prepulses to –20 mV, followed by variable recovery intervals at –120 mV, and a constant 20

ms test pulse to -20 mV at a pulsing frequency of 0.25 Hz (or 0.15 Hz for R1632H only). The normalized peak current amplitude ($I_{Na, norm} = I_{Na} / I_{Na, max}$) elicited by the test pulse was plotted against the recovery interval. Data were fitted with 2 exponentials: $I_{Na, norm} = A_f [1 - \exp(-t/\tau_f)] + A_s [1 - \exp(-t/\tau_s)]$, where t is the recovery time interval, τ_f and τ_s represent fast and slow time constants respectively, and A_f and A_s represent fractional amplitudes of fast and slow recovery components, respectively.

REFERENCES

1. Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, Buckler AJ, Church D, Aburatani H, Hunter K, Stanton VP, Thirion JP, Hudson T, *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 Feb 21;68(4):799-808.
2. Fu YH, Pizzuti A, Fenwick RG Jr, King J, Rajnarayan S, Dunne PW, Dubel J, Nasser GA, Ashizawa T, de Jong P, *et al.* An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science*. 1992 Mar 6;255(5049):1256-8.
3. Mahadevan M, Tsilfidis C, Sabourin L, Shutler G, Amemiya C, Jansen G, Neville C, Narang M, Barceló J, O'Hoy K, *et al.* Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science*. 1992 Mar 6;255(5049):1253-5.
4. Liquori CL, Ricker K, Moseley ML, Jacobsen JF, Kress W, Naylor SL, Day JW, Ranum LP. Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science*. 2001 Aug 3;293(5531):864-7.
5. Philips AV, Timchenko LT, Cooper TA. Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science*. 1998 May 1;280(5364):737-41.
6. Mankodi A, Logigian E, Callahan L, McClain C, White R, Henderson D, Krym M, Thornton CA. Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science*. 2000 Sep 8;289(5485):1769-73.
7. Seznec H, Agbulut O, Sergeant N, Savouret C, Ghestem A, Tabti N, Willer JC, Ourth L, Duros C, Brisson E, Fouquet C, Butler-Browne G, Delacourte A, Junien C, Gourdon G. Mice transgenic for the human myotonic dystrophy region with expanded CTG repeats display muscular and brain abnormalities. *Hum Mol Genet*. 2001 Nov 1;10(23):2717-26.
8. Miller JW, Urbinati CR, Teng-Umnuay P, Stenberg MG, Byrne BJ, Thornton CA, Swanson MS. Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)_n expansions associated with myotonic dystrophy. *EMBO J*. 2000 Sep 1;19(17):4439-48.
9. Kanadia RN, Johnstone KA, Mankodi A, Lungu C, Thornton CA, Esson D, Timmers AM, Hauswirth WW, Swanson MS. A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science*. 2003 Dec 12;302(5652):1978-80.
10. Ho TH, Charlet-B N, Poulos MG, Singh G, Swanson MS, Cooper TA. Muscleblind proteins regulate alternative splicing. *EMBO J*. 2004 Aug 4;23(15):3103-12.
11. Kuyumcu-Martinez NM, Wang GS, Cooper TA. Increased steady-state levels of CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation. *Mol Cell*. 2007 Oct 12;28(1):68-78.

12. Savkur RS, Philips AV, Cooper, TA. Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat Genet.* 2001 Sep;29(1):40-7.
13. Mankodi A, Takahashi MP, Jiang H, Beck CL, Bowers WJ, Moxley RT, Cannon SC, Thornton CA. Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of CIC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. *Mol Cell.* 2002 Jul;10(1):35-44.
14. Charlet-B N, Savkur RS, Singh G, Philips AV, Grice EA, Cooper TA. Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol Cell.* 2002 Jul;10(1):45-53.
15. Fugier C, Klein AF, Hammer C, Vassilopoulos S, Ivarsson Y, Toussaint A, Tosch V, Vignaud A, Ferry A, Messaddeq N, Kokunai Y, Tsuburaya R, de la Grange P, Dembele D, Francois V, Precigout G, Boulade-Ladame C, Hummel MC, Lopez de Munain A, Sergeant N, Laquerrière A, Thibault C, Deryckere F, Auboeuf D, Garcia L, Zimmermann P, Udd B, Schoser B, Takahashi MP, Nishino I, Bassez G, Laporte J, Furling D, Charlet-Berguerand N. Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy. *Nat Med.* 2011 Jun;17(6):720-5.
16. Kimura T, Nakamori M, Lueck JD, Pouliquin P, Aoike F, Fujimura H, Dirksen RT, Takahashi MP, Dulhunty AF, Sakoda S. Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet.* 2005 Aug 1;14(15):2189-200.
17. Tang ZZ, Yarotskyy V, Wei L, Sobczak K, Nakamori M, Eichinger K, Moxley RT, Dirksen RT, Thornton CA. Muscle weakness in myotonic dystrophy associated with misregulated splicing and altered gating of Ca(V)1.1 calcium channel. *Hum Mol Genet.* 2012 Mar 15;21(6):1312-24.
18. 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. *The Journal of clinical investigation.* 2007 117(12):3952-7.
19. Groh WJ, Groh MR, Saha C, Kincaid JC, Simmons Z, Ciafaloni E, Pourmand R, Otten RF, Bhakta D, Nair GV, Marshdeh MM, Zipes DP, Pascuzzi RM. Electrocardiographic abnormalities and sudden death in myotonic dystrophy type 1. *N Engl J Med.* 2008 Jun 19;358(25):2688-97.
20. Pelargonio G, Dello Russo A, Sanna T, De Martino G, Bellocchi F. Myotonic dystrophy and the heart. *Heart.* 2002 Dec;88(6):665-70.

21. Phillips MF and Harper PS. Cardiac disease in myotonic dystrophy. *Cardiovasc Res.* 1997 Jan;33(1):13-22.
22. Lazarus A, Varin J, Babuty D, Anselme F, Coste J, Duboc D. Long-term follow-up of arrhythmias in patients with myotonic dystrophy treated by pacing: a multicenter diagnostic pacemaker study. *J Am Coll Cardiol.* 2002 Nov 6;40(9):1645-52.
23. Rudnik-Schöneborn S, Schaupp M, Lindner A, Kress W, Schulze-Bahr E, Zumhagen S, Elbracht M, Zerres K. Brugada-like cardiac disease in myotonic dystrophy type 2: report of two unrelated patients. *Eur J Neurol.* 2011, 18: 191–194.
24. Wilde AA, Brugada R. Phenotypical manifestations of mutations in the genes encoding subunits of the cardiac sodium channel. *Circ Res.* 2011 Apr 1;108(7):884-97.
25. Abriel H. Cardiac sodium channel Na(v)1.5 and interacting proteins: Physiology and pathophysiology. *J Mol Cell Cardiol.* 2010 Jan;48(1):2-11
26. Ruan Y, Liu N, Priori SG. Sodium channel mutations and arrhythmias. *Nat Rev Cardiol.* 2009 May;6(5):337-48.
27. Remme CA, Bezzina CR. Sodium channel (dys)function and cardiac arrhythmias. *Cardiovasc Ther.* 2010 Oct;28(5):287-94.
28. Anders S, Reyes A, Huber W. Detecting differential usage of exons from RNA-seq data. *Genome Res.* 2012 Oct;22(10):2008-17.
29. Katz Y, Wang ET, Airoidi EM, Burge CB. Analysis and design of RNA sequencing experiments for identifying isoform regulation. *Nat Methods.* 2010 Dec;7(12):1009-15.
30. Yamashita Y, Matsuura T, Shinmi J, Amakusa Y, Masuda A, Ito M, Kinoshita M, Furuya H, Abe K, Ibi T, Sahashi K, Ohno K. 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.* 2012 Jun;57(6):368-74
31. Koebis M, Ohsawa N, Kino Y, Sasagawa N, Nishino I, Ishiura S. Alternative splicing of myomesin 1 gene is aberrantly regulated in myotonic dystrophy type 1. *Genes Cells.* 2011 Sep;16(9):961-72.
32. Vihola A, Bachinski LL, Sirito M, Olufemi SE, Hajibashi S, Baggerly KA, Raheem O, Haapasalo H, Suominen T, Holmlund-Hampf J, Paetau A, Cardani R, Meola G, Kalimo H, Edström L, Krahe R, Udd B. Differences in aberrant expression and splicing of sarcomeric proteins in the myotonic dystrophies DM1 and DM2. *Acta Neuropathol.* 2010 Apr;119(4):465-79.
33. Ohsawa N, Koebis M, Suo S, Nishino I, Ishiura S. Alternative splicing of PDLIM3/ALP, for α -actinin-associated LIM protein 3, is aberrant in persons with myotonic dystrophy.

Biochem Biophys Res Commun. 2011 May 27;409(1):64-9.

34. Suenaga K, Lee KY, Nakamori M, Tatsumi Y, Takahashi MP, Fujimura H, Jinnai K, Yoshikawa H, Du H, Ares M Jr, Swanson MS, Kimura T. Muscleblind-like 1 knockout mice reveal novel splicing defects in the myotonic dystrophy brain. *PLoS One*. 2012;7(3):e33218.
35. Dhaenens CM, Schraen-Maschke S, Tran H, Vingtdoux V, Ghanem D, Leroy O, Delplanque J, Vanbrussel E, Delacourte A, Vermersch P, Maurage CA, Gruffat H, Sergeant A, Mahadevan MS, Ishiura S, Buée L, Cooper TA, Caillet-Boudin ML, Charlet-Berguerand N, Sablonnière B, Sergeant N. Overexpression of MBNL1 fetal isoforms and modified splicing of TAU in the DM1 brain: two individual consequences of CUG trinucleotide repeats. *Exp Neurol*. 2008 Apr;210(2):467-78.
36. Charizanis K, Lee KY, Batra R, Goodwin M, Zhang C, Yuan Y, Shiue L, Cline M, Scotti MM, Xia G, Kumar A, Ashizawa T, Clark HB, Kimura T, Takahashi MP, Fujimura H, Jinnai K, Yoshikawa H, Gomes-Pereira M, Gourdon G, Sakai N, Nishino S, Foster TC, Ares M Jr, Darnell RB, Swanson MS. Muscleblind-like 2-mediated alternative splicing in the developing brain and dysregulation in myotonic dystrophy. *Neuron*. 2012 Aug 9;75(3):437-50.
37. Yuan, Y. *et al.*, Muscleblind-like 1 interacts with RNA hairpins in splicing target and pathogenic RNAs. *Nucleic Acids Res*. 35, 5474-86 (2007).
38. Kino Y, Mori D, Oma Y, Takeshita Y, Sasagawa N, Ishiura S. Muscleblind protein, MBNL1/EXP, binds specifically to CHHG repeats. *Hum Mol Genet*. 2004 Mar 1;13(5):495-507.
39. Warf MB, Berglund JA. MBNL binds similar RNA structures in the CUG repeats of myotonic dystrophy and its pre-mRNA substrate cardiac troponin T. *RNA*. 2007 Dec;13(12):2238-51.
40. Goers ES, Purcell J, Voelker RB, Gates DP, Berglund JA. MBNL1 binds GC motifs embedded in pyrimidines to regulate alternative splicing. *Nucleic Acids Res*. 2010 Apr;38(7):2467-84.
41. Teplova M, Patel DJ. Structural insights into RNA recognition by the alternative-splicing regulator muscleblind-like MBNL1. *Nat Struct Mol Biol*. 2008 Dec;15(12):1343-51.
42. Marquis J, Paillard L, Audic Y, Cosson B, Danos O, Le Bec C, Osborne HB. CUG-BP1/CELF1 requires UGU-rich sequences for high-affinity binding. *Biochem J*. 2006 Dec 1;400(2):291-301.
43. Vlasova IA, Tahoe NM, Fan D, Larsson O, Rattenbacher B, Sternjohn JR, Vasdewani J, Karypis G, Reilly CS, Bitterman PB, Bohjanen PR. Conserved GU-rich elements mediate mRNA decay by binding to CUG-binding protein 1. *Mol Cell*. 2008 Feb 1;29(2):263-70.

44. Teplova M, Song J, Gaw HY, Teplov A, Patel DJ. Structural insights into RNA recognition by the alternate-splicing regulator CUG-binding protein 1. *Structure*. 2010 Oct 13;18(10):1364-77.
45. Wang ET, Cody NA, Jog S, Biancolella M, Wang TT, Treacy DJ, Luo S, Schroth GP, Housman DE, Reddy S, Lécuyer E, Burge CB. Transcriptome-wide regulation of pre-mRNA splicing and mRNA localization by muscleblind proteins. *Cell*. 2012 Aug 17;150(4):710-24.
46. Du H, Cline MS, Osborne RJ, Tuttle DL, Clark TA, Donohue JP, Hall MP, Shiue L, Swanson MS, Thornton CA, Ares M Jr. Aberrant alternative splicing and extracellular matrix gene expression in mouse models of myotonic dystrophy. *Nat Struct Mol Biol*. 2010 Feb;17(2):187-93.
47. Lin X, Miller JW, Mankodi A, Kanadia RN, Yuan Y, Moxley RT, Swanson MS, Thornton CA. Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet*. 2006 Jul 1;15(13):2087-97.
48. Murphy LL, Moon-Grady AJ, Cuneo BF, Wakai RT, Yu S, Kunic JD, Benson DW, George AL Jr. Developmentally regulated SCN5A splice variant potentiates dysfunction of a novel mutation associated with severe fetal arrhythmia. *Heart Rhythm*. 2012 Apr;9(4):590-7.
49. Chioni AM, Fraser SP, Pani F, Foran P, Wilkin GP, Diss JK, Djamgoz MB. A novel polyclonal antibody specific for the Na(v)1.5 voltage-gated Na(+) channel 'neonatal' splice form. *J Neurosci Methods*. 2005 Sep 30;147(2):88-98.
50. Schroeter A, Walzik S, Blechschmidt S, Haufe V, Benndorf K, Zimmer T. Structure and function of splice variants of the cardiac voltage-gated sodium channel Na(v)1.5. *J Mol Cell Cardiol*. 2010 Jul;49(1):16-24.
51. Onkal R, Mattis JH, Fraser SP, Diss JK, Shao D, Okuse K, Djamgoz MB. Alternative splicing of Nav1.5: an electrophysiological comparison of 'neonatal' and 'adult' isoforms and critical involvement of a lysine residue. *J Cell Physiol*. 2008 Sep;216(3):716-26.
52. Murphy LL, Moon-Grady AJ, Cuneo BF, Wakai RT, Yu S, Kunic JD, Benson DW, George AL Jr. Developmentally regulated SCN5A splice variant potentiates dysfunction of a novel mutation associated with severe fetal arrhythmia. *Heart Rhythm*. 2012 Apr;9(4):590-7
53. White MC, Gao R, Xu W, Mandal SM, Lim JG, Hazra TK, Wakamiya M, Edwards SF, Raskin S, Teive HA, Zoghbi HY, Sarkar PS, Ashizawa T. Inactivation of hnRNP K by expanded intronic AUUCU repeat induces apoptosis via translocation of PKCdelta to mitochondria in spinocerebellar ataxia 10. *PLoS Genet*. 2010 Jun 10;6(6):e1000984.
54. Dansithong W, Paul S, Comai L, Reddy S. MBNL1 is the primary determinant of focus formation and aberrant insulin receptor splicing in DM1. *J Biol Chem*. 2005 Feb

18;280(7):5773-80.

55. Kanadia, R. *et al.*, 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*. 2006 Aug 1;103(31):11748-53.

56. Tan HL, Bink-Boelkens MT, Bezzina CR, Viswanathan PC, Beaufort-Krol GC, van Tintelen PJ, van den Berg MP, Wilde AA, Balsler JR. A sodium-channel mutation causes isolated Cardiac Conduction Disease. *Nature*. 2001 Feb 22;409(6823):1043-7.

57. Schott JJ, Alshinawi C, Kyndt F, Probst V, Hoorntje TM, Hulsbeek M, Wilde AA, Escande D, Mannens MM, Le Marec H. Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A. *Nat Genet*. 1999 Sep;23(1):20-1.

58. Probst V, Allouis M, Sacher F, Pattier S, Babuty D, Mabo P, Mansourati J, Victor J, Nguyen JM, Schott JJ, Boisseau P, Escande D, Le Marec H. Progressive cardiac conduction defect is the prevailing phenotype in carriers of a Brugada Syndrome SCN5A mutation. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2006 Mar;17(3):270-5.

59. Kyndt F, Probst V, Potet F, Demolombe S, Chevallier JC, Baro I, Moisan JP, Boisseau P, Schott JJ, Escande D, Le Marec H. Novel SCN5A mutation leading either to isolated cardiac conduction defect or Brugada Syndrome in a large French family. *Circulation*. 2001 Dec 18;104(25):3081-6.

60. Postema PG, Van den Berg M, Van Tintelen JP, Van den Heuvel F, Grundeken M, Hofman N, Van der Roest WP, Nannenbergh EA, Krapels IP, Bezzina CR, Wilde A. Founder mutations in the Netherlands: SCN5a 1795insD, the first described arrhythmia overlap syndrome and one of the largest and best characterised families worldwide. *Neth Heart J*. 2009 Nov;17(11):422-8.

61. Banks AS, Li J, McKeag L, Hribal ML, Kashiwada M, Accili D, Rothman PB. Deletion of SOCS7 leads to enhanced insulin action and enlarged islets of Langerhans. *J Clin Invest*. 2005 Sep;115(9):2462-71.

62. Padmakumar VC, Libotte T, Lu W, Zaim H, Abraham S, Noegel AA, Gotzmann J, Foisner R, Karakesisoglou I. The inner nuclear membrane protein Sun1 mediates the anchorage of Nesprin-2 to the nuclear envelope. *J Cell Sci*. 2005 Aug 1;118(Pt 15):3419-30.

63. Wani MA, Haynes LD, Kim J, Bronson CL, Chaudhury C, Mohanty S, Waldmann TA, Robinson JM, Anderson CL. Familial hypercatabolic hypoproteinemia caused by deficiency of the neonatal Fc receptor, FcRn, due to a mutant beta2-microglobulin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Mar 28;103(13):5084-9.

Figure 1

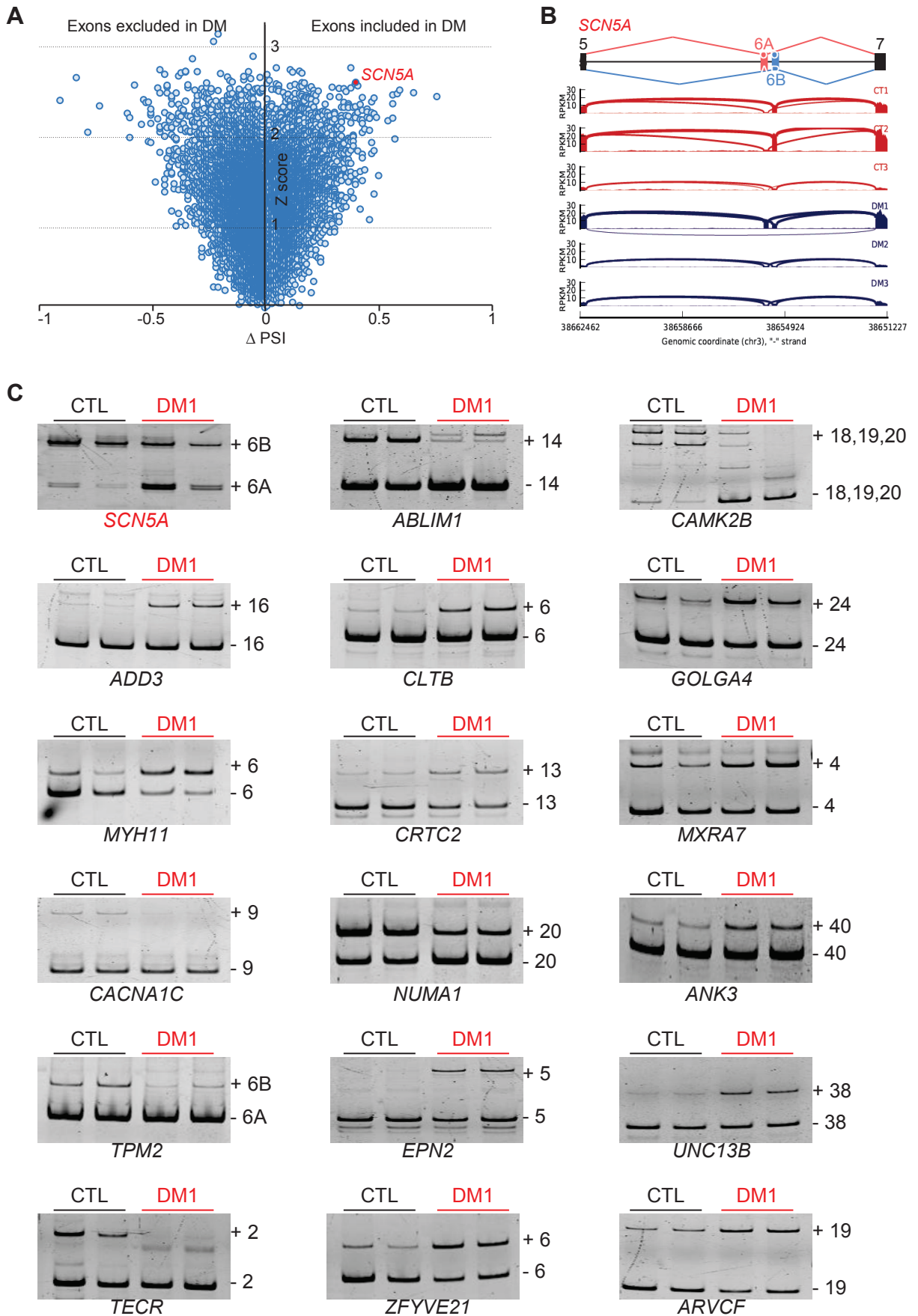
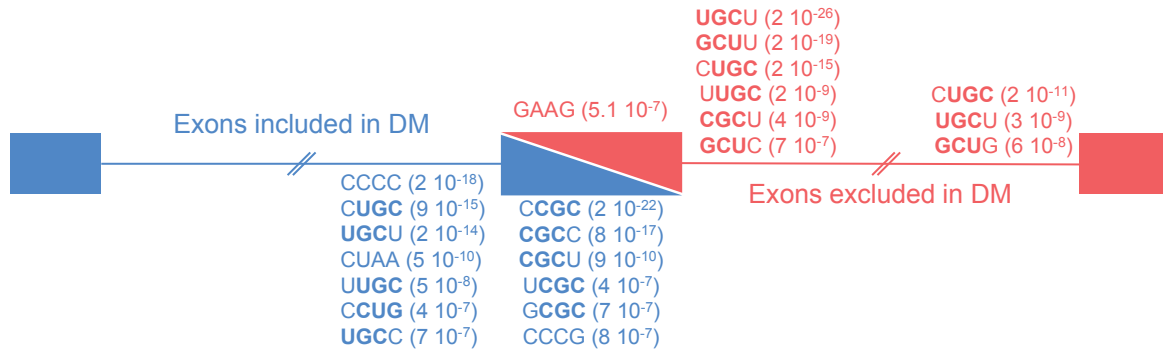


Figure 2

A



B

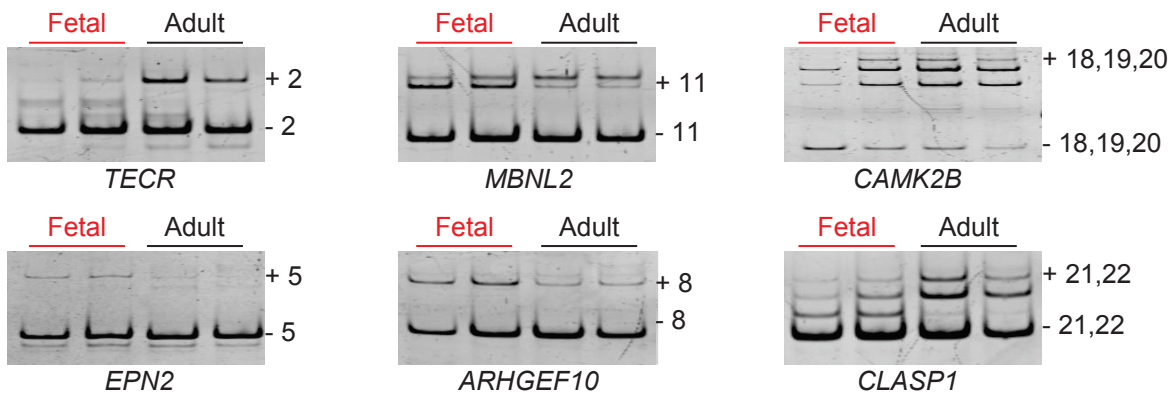
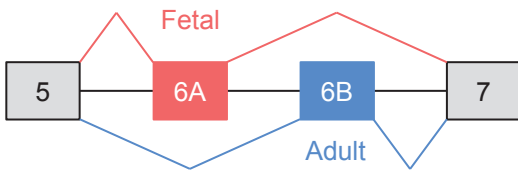
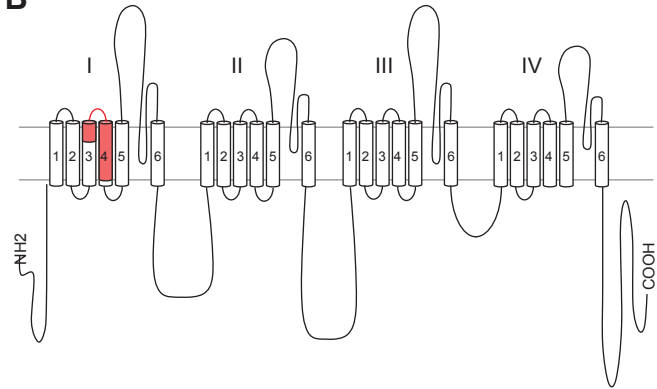


Figure 3

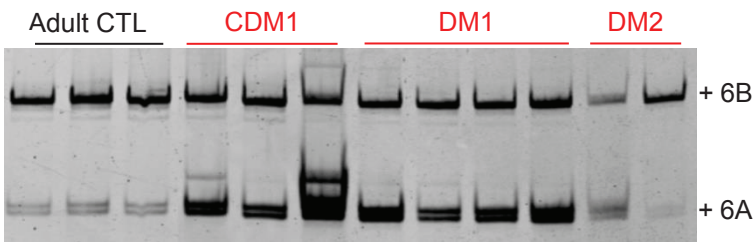
A



B



C



D

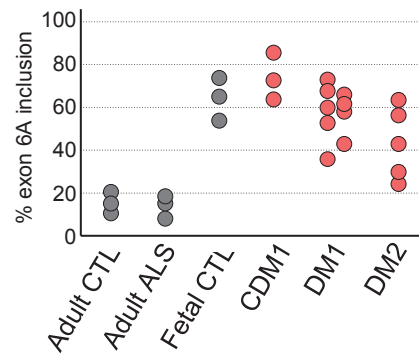


Figure 4

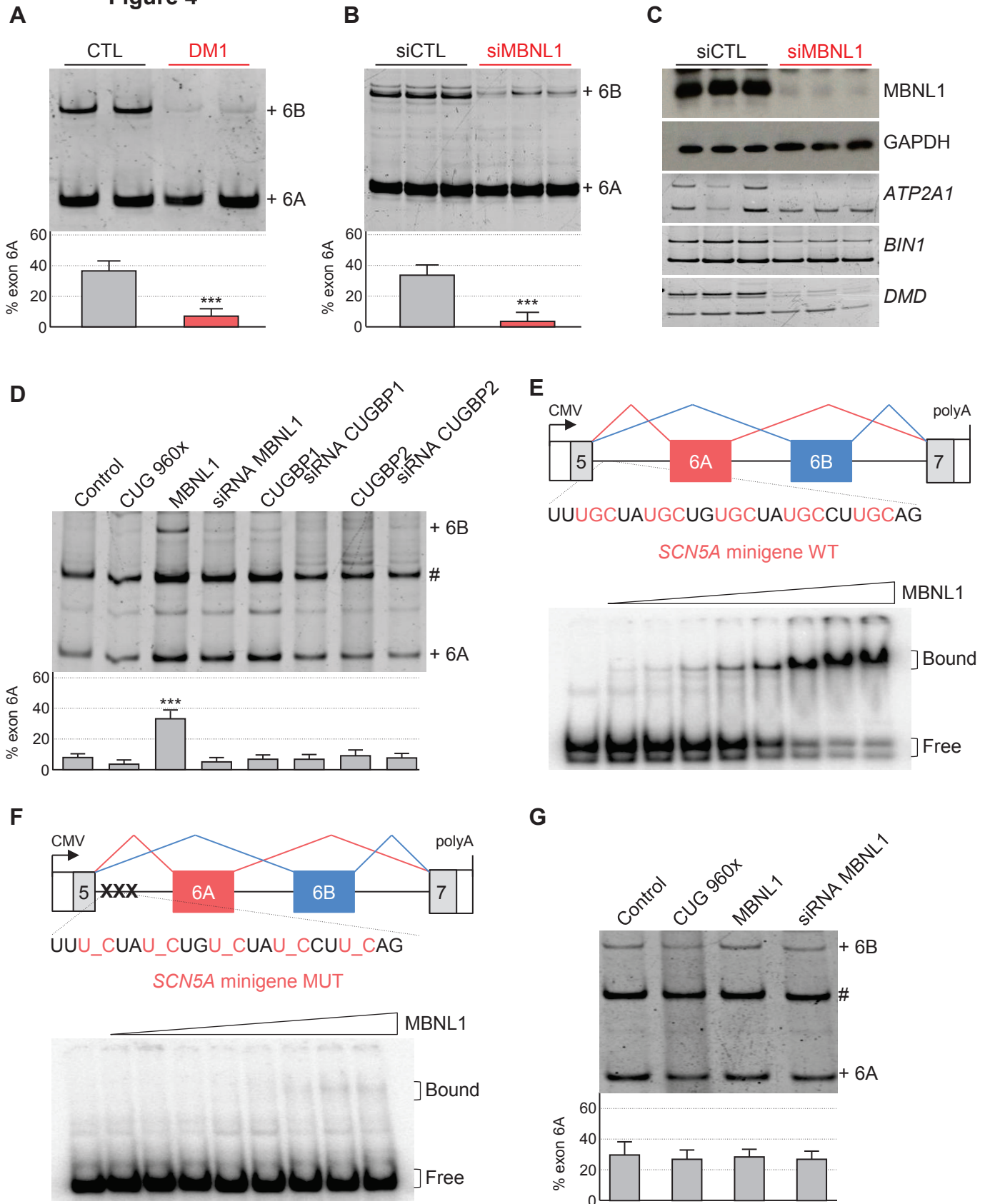
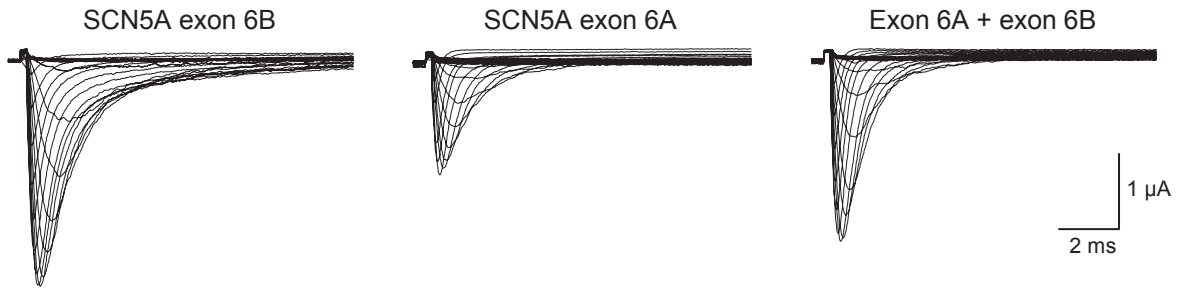
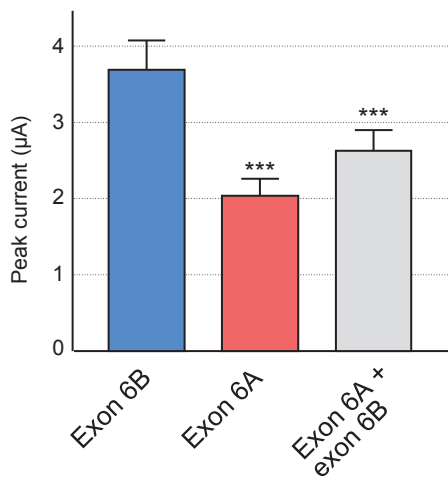


Figure 5

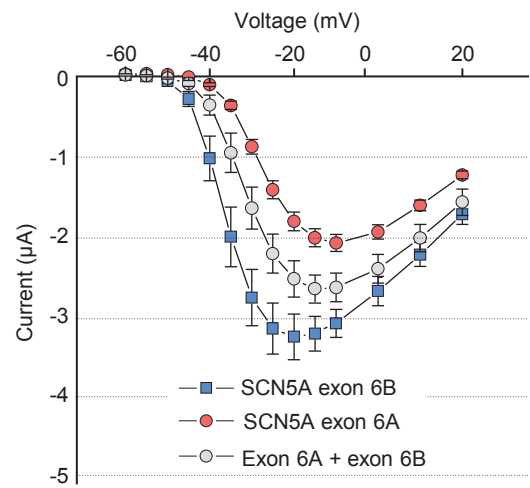
A



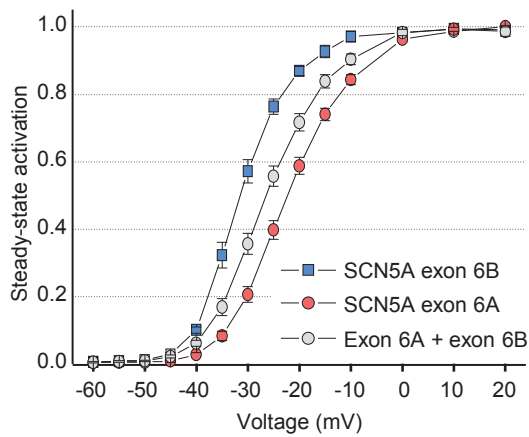
B



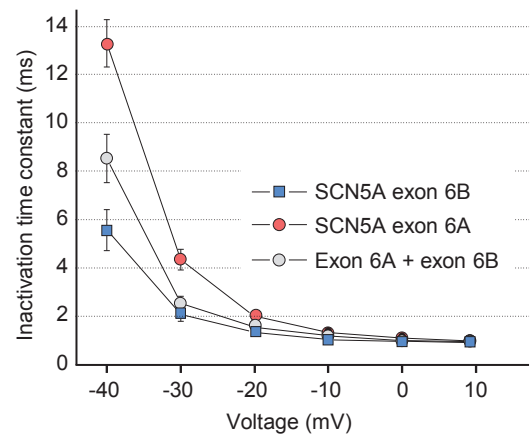
C



D



E



Supplemental Table 1

Gene Symbol	PSI-value	P-value	Gene Description
ABLIM1	4,27	3,5E-02	actin binding LIM protein 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:78]
MYOM1	4,13	2,8E-04	myomesin 1, 185kDa [Source:HGNC Symbol;Acc:7613]
SORBS2	3,67	2,0E-02	sorbin and SH3 domain containing 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:24098]
LDB3	3,28	8,3E-02	LIM domain binding 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:15710]
NCAM1	2,94	5,1E-02	neural cell adhesion molecule 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:7656]
MBNL2	2,78	1,1E-01	muscleblind-like 2 (Drosophila) [Source:HGNC Symbol;Acc:16746]
MBNL2	2,67	9,2E-02	muscleblind-like 2 (Drosophila) [Source:HGNC Symbol;Acc:16746]
CECR1	2,67	1,3E-01	cat eye syndrome chromosome region, candidate 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:1839]
TPM2	2,64	1,8E-02	tropomyosin 2 (beta) [Source:HGNC Symbol;Acc:12011]
GLT8D2	2,47	1,1E-01	glycosyltransferase 8 domain containing 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:24890]
CAMK2B	2,43	4,2E-03	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II beta [Source:HGNC Symbol;Acc:1461]
MBNL1	2,28	3,8E-02	muscleblind-like (Drosophila) [Source:HGNC Symbol;Acc:6923]
INMT	2,26	1,2E-01	indolethylamine N-methyltransferase [Source:HGNC Symbol;Acc:6069]
SCN5A	2,20	1,4E-01	sodium channel, voltage-gated, type V, alpha subunit [Source:HGNC Symbol;Acc:10593]
PAM	2,11	4,9E-02	peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase [Source:HGNC Symbol;Acc:8596]
CAMK2B	2,08	1,0E-01	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II beta [Source:HGNC Symbol;Acc:1461]
TNNT2	2,07	7,4E-02	troponin T type 2 (cardiac) [Source:HGNC Symbol;Acc:11949]
SMARCAD1	2,05	1,4E-01	SWI/SNF-related, matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin, subfamily a, containing DEAD/H box 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:18398]
LMO7	2,04	1,4E-01	LIM domain 7 [Source:HGNC Symbol;Acc:6646]
GOLGA4	1,99	1,8E-02	golgin A4 [Source:HGNC Symbol;Acc:4427]
PDLIM5	1,99	5,9E-02	PDZ and LIM domain 5 [Source:HGNC Symbol;Acc:17468]
SYNE2	1,99	1,1E-01	spectrin repeat containing, nuclear envelope 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:17084]
SH3RF2	1,97	2,1E-02	SH3 domain containing ring finger 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:26299]
PPFIBP1	1,96	5,9E-02	PTPRF interacting protein, binding protein 1 (liprin beta 1) [Source:HGNC Symbol;Acc:9249]
PDE4D	1,95	1,4E-01	phosphodiesterase 4D, cAMP-specific [Source:HGNC Symbol;Acc:8783]
PRSS50	1,93	6,0E-05	protease, serine, 50 [Source:HGNC Symbol;Acc:17910]
PFKFB2	1,92	4,6E-02	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:8873]
CPXM2	1,92	9,1E-02	carboxypeptidase X (M14 family), member 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:26977]
AKAP13	1,92	9,6E-02	A kinase (PRKA) anchor protein 13 [Source:HGNC Symbol;Acc:371]
H2AFY	1,92	1,3E-01	H2A histone family, member Y [Source:HGNC Symbol;Acc:4740]
INMT	1,91	5,6E-02	indolethylamine N-methyltransferase [Source:HGNC Symbol;Acc:6069]
FN1	1,91	1,3E-01	fibronectin 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:3778]
KIF1B	1,89	1,1E-01	kinesin family member 1B [Source:HGNC Symbol;Acc:16636]
SGIP1	1,88	1,1E-02	SH3-domain GRB2-like (endophilin) interacting protein 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:25412]
RABGAP1L	1,88	1,2E-01	RAB GTPase activating protein 1-like [Source:HGNC Symbol;Acc:24663]
TBC1D14	1,88	1,2E-01	TBC1 domain family, member 14 [Source:HGNC Symbol;Acc:29246]
FNDC1	1,86	1,4E-01	fibronectin type III domain containing 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:21184]
RMND1	1,85	1,2E-01	required for meiotic nuclear division 1 homolog (S. cerevisiae) [Source:HGNC Symbol;Acc:21176]
PDE7B	1,85	1,2E-01	phosphodiesterase 7B [Source:HGNC Symbol;Acc:8792]
TMEM49	1,84	3,0E-02	transmembrane protein 49 [Source:HGNC Symbol;Acc:29559]
AQP1	1,83	6,1E-02	aquaporin 1 (Colton blood group) [Source:HGNC Symbol;Acc:633]
ITGA1	1,82	9,1E-02	integrin, alpha 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:6134]
JAK2	1,82	1,1E-01	Janus kinase 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:6192]
ANK3	1,82	1,3E-01	ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G) [Source:HGNC Symbol;Acc:494]
INMT	1,81	4,4E-02	indolethylamine N-methyltransferase [Source:HGNC Symbol;Acc:6069]
SNX27	1,80	1,0E-01	sorting nexin family member 27 [Source:HGNC Symbol;Acc:20073]
NPNT	1,78	1,4E-01	nephronectin [Source:HGNC Symbol;Acc:27405]
SYNE2	1,77	2,6E-02	spectrin repeat containing, nuclear envelope 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:17084]
CCL15	1,77	9,2E-02	chemokine (C-C motif) ligand 15 [Source:HGNC Symbol;Acc:10613]
TMEM49	1,76	1,5E-02	transmembrane protein 49 [Source:HGNC Symbol;Acc:29559]
TCF12	1,76	3,8E-02	transcription factor 12 [Source:HGNC Symbol;Acc:11623]
GLS	1,76	1,1E-01	glutaminase [Source:HGNC Symbol;Acc:4331]
SYNE2	1,75	3,8E-03	spectrin repeat containing, nuclear envelope 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:17084]
PINX1	1,75	4,5E-02	PIN2/TERF1 interacting, telomerase inhibitor 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:30046]
PSD3	1,75	9,6E-02	pleckstrin and Sec7 domain containing 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:19093]
AQP1	1,74	4,8E-02	aquaporin 1 (Colton blood group) [Source:HGNC Symbol;Acc:633]
RARRES1	1,74	8,3E-02	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:9867]
ADCY6	1,73	6,4E-03	adenylate cyclase 6 [Source:HGNC Symbol;Acc:237]
SORBS1	1,73	4,4E-02	sorbin and SH3 domain containing 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:14565]
MFF	1,72	8,4E-02	mitochondrial fission factor [Source:HGNC Symbol;Acc:24858]
MAP4	1,71	5,5E-03	microtubule-associated protein 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:6862]
LRRC49	1,71	1,8E-02	leucine rich repeat containing 49 [Source:HGNC Symbol;Acc:25965]
KIF16B	1,71	1,1E-01	kinesin family member 16B [Source:HGNC Symbol;Acc:15869]
MS4A6A	1,70	1,0E-01	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6A [Source:HGNC Symbol;Acc:13375]
MYH14	1,70	1,1E-01	myosin, heavy chain 14, non-muscle [Source:HGNC Symbol;Acc:23212]
HERC5	1,70	1,2E-01	hect domain and RLD 5 [Source:HGNC Symbol;Acc:24368]
ARPC2	1,70	1,4E-01	actin related protein 2/3 complex, subunit 2, 34kDa [Source:HGNC Symbol;Acc:705]
CELF1	1,69	7,1E-03	CUGBP, Elav-like family member 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:2549]
ADAMTSL3	1,69	7,2E-02	ADAMTS-like 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:14633]
ANK3	1,69	1,0E-01	ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G) [Source:HGNC Symbol;Acc:494]

Supplemental Table 2

Gene Symbol	p-value	Gene Description
MYH14	4,60E-16	myosin, heavy chain 14, non-muscle myosin, heavy chain 14
KIF1B	1,34E-12	kinesin family member 1B
MYOF	1,07E-08	myoferlin
ABLIM1	1,73E-08	actin binding LIM protein 1
MYOM1	2,00E-08	myomesin 1, 185kDa
CAMK2B	1,59E-07	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II beta
CP	4,67E-07	ceruloplasmin (ferroxidase)
SORBS2	4,97E-07	sorbin and SH3 domain containing 2
STAB1	4,97E-07	stabilin 1
MBNL2	7,72E-07	muscleblind-like 2
SCN5A	7,72E-07	sodium channel, voltage-gated, type V, alpha subunit
LDB3	1,01E-06	LIM domain binding 3
NCAM1	1,56E-05	neural cell adhesion molecule 1
ELP5	4,21E-05	elongator acetyltransferase complex subunit 5
FN1	4,57E-05	fibronectin 1
GOLGA4	1,73E-04	golgin A4 golgi autoantigen, golgin subfamily a, 4
RABGAP1L	1,97E-04	RAB GTPase activating protein 1-like
ASPH	2,67E-04	aspartate beta-hydroxylase
PLCB4	3,51E-04	phospholipase C, beta 4
CXCL12	3,51E-04	chemokine (C-X-C motif) ligand 12 chemokine (C-X-C motif) ligand 12
MBNL1	3,75E-04	(stromal cell-derived factor 1)
TPM2	3,83E-04	muscleblind-like (Drosophila)
ABCA1	4,80E-04	tropomyosin 2 (beta)
MACF1	6,63E-04	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1
OLFM1	1,29E-03	microtubule-actin crosslinking factor 1
AOX1	1,50E-03	olfactomedin 1
C1QB	2,59E-03	aldehyde oxidase 1
TXNIP	3,20E-03	complement component 1, q subcomponent, B chain
TMLHE	4,72E-03	thioredoxin interacting protein
NR5A2	4,72E-03	trimethyllysine hydroxylase, epsilon
CECR1	5,17E-03	nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2
CPXM2	7,34E-03	cat eye syndrome chromosome region, candidate 1
ZNF385B	7,46E-03	carboxypeptidase X (M14 family), member 2
PLTP	7,62E-03	zinc finger protein 385B
BMP8A	8,95E-03	phospholipid transfer protein
PLSCR4	1,00E-02	bone morphogenetic protein 8a
ERG	1,02E-02	phospholipid scramblase 4
PSMC4	1,04E-02	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog (avian)
MAN1A1	1,06E-02	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 4
PDLIM5	1,13E-02	mannosidase, alpha, class 1A, member 1
CYBB	1,13E-02	PDZ and LIM domain 5
PPP1R16A	1,21E-02	cytochrome b-245, beta polypeptide
PLSCR1	1,36E-02	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 16A
SCP2	1,37E-02	phospholipid scramblase 1
TOE1	1,42E-02	sterol carrier protein 2
DMPK	1,66E-02	target of EGR1, member 1 (nuclear)
CKMT2	1,68E-02	dystrophia myotonica-protein kinase
NRP2	1,83E-02	creatine kinase, mitochondrial 2 (sarcomeric)
PTPRS	1,88E-02	neuropilin 2
ACTA1	1,88E-02	protein tyrosine phosphatase, receptor type, S
VNN3	1,88E-02	actin, alpha 1, skeletal muscle
CD8A	1,95E-02	vanin 3
GYS1	1,95E-02	CD8a molecule
DHX8	1,95E-02	glycogen synthase 1 (muscle)
C10orf137	1,96E-02	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 8
PTGS2	1,98E-02	chromosome 10 open reading frame 137
PDK4	2,18E-02	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
IGFBP4	2,18E-02	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4
IP6K3	2,50E-02	insulin-like growth factor binding protein 4
PLCZ1	2,51E-02	inositol hexakisphosphate kinase 3
RARRES1	2,53E-02	phospholipase C, zeta 1
LAS1L	2,53E-02	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1
TMEM2	2,55E-02	LAS1-like (S. cerevisiae)
VCAM1	2,74E-02	transmembrane protein 2
RNF220	2,85E-02	vascular cell adhesion molecule 1
GLS	3,19E-02	ring finger protein 220
GBE1	3,22E-02	glutaminase
IRAK4	3,44E-02	glucan (1,4-alpha-), branching enzyme 1
DPT	3,64E-02	interleukin-1 receptor-associated kinase 4
		dermatopontin

Supplemental Table 3

Gene Symbol	Fold Change	p-value	Gene Description
EPN2	5,21	5,01E-02	Epsin 2
TNNT2	4,68	3,20E-02	Troponin T type 2 (cardiac)
MYOM1	4,45	2,44E-02	Myomesin 1, 185kDa
PDLIM3	3,80	1,87E-02	PDZ and LIM domain 3
CLASP1	3,44	4,11E-02	Cytoplasmic linker associated protein 1
MAPT	3,33	7,62E-02	Microtubule-associated protein tau
MBNL2	3,25	9,45E-02	Muscleblind-like 2 (Drosophila)
MBNL1	3,22	9,02E-02	Muscleblind-like (Drosophila)
FUBP3	2,73	1,14E-01	Far upstream element (FUSE) binding protein 3
MEF2D	2,72	6,13E-02	Myocyte enhancer factor 2D
CAMK2B	2,68	5,73E-02	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II beta
ARHGEF7	2,62	8,34E-02	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7
TNNT3	2,61	5,60E-02	Troponin T type 3 (skeletal, fast)
BIN1	2,60	1,46E-01	Bridging integrator 1
MEAF6	2,60	5,93E-02	MYST/Esa1-associated factor 6
NBEAL1	2,58	1,39E-01	Neurobeachin-like 1
SORBS2	2,51	7,13E-02	Sorbin and SH3 domain containing 2
CLTB	2,49	5,52E-02	Clathrin, light chain (Lcb)
NCOR2	2,42	1,29E-01	Nuclear receptor co-repressor 2
UNC13B	2,41	1,49E-01	Unc-13 homolog B (C. elegans)
ZFYVE21	2,40	5,50E-02	Zinc finger, FYVE domain containing 21
LIMCH1	2,39	4,63E-01	LIM and calponin homology domains 1
MBD2	2,36	7,82E-02	Methyl-CpG binding domain protein 2
SGIP1	2,33	1,25E-01	SH3-domain GRB2-like (endophilin) interacting protein 1
GOLGA4	2,27	1,11E-01	Golgi autoantigen, golgin subfamily a, 4
FAM154B	2,26	9,44E-02	family with sequence similarity 154, member B
SMG1	2,24	1,53E-01	PI-3-kinase-related kinase SMG-1
THNSL2	2,18	1,38E-01	Threonine synthase-like 2 (S. cerevisiae)
SSBP3	2,18	2,52E-01	Single stranded DNA binding protein 3
ARVCF	2,14	1,65E-01	Armadillo repeat gene deletes in velocardiofacial syndrome
SLC6A6	2,13	1,70E-01	Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6
DOCK9	2,09	1,10E-01	Dedicator of cytokinesis 9
ZC3HAV1	2,04	1,03E-01	Zinc finger CCCH-type, antiviral 1
PKP4	2,03	6,82E-02	Plakophilin 4
ANK3	2,01	1,08E-01	Ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G)
FAM169A	1,98	2,69E-01	family with sequence similarity 169 member A
SIRPA	1,95	6,39E-02	Signal-regulatory protein alpha
CACNA1C	1,94	1,11E-01	Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit
FBN1	1,92	7,96E-02	Fibrillin 1
SORBS1	1,90	7,27E-02	Sorbin and SH3 domain containing 1
ATP5J	1,90	1,22E-01	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit F6
FAM190B	1,89	8,65E-02	family with sequence similarity 190 member B
LRP11	1,88	1,17E-01	Low density lipoprotein receptor-related protein 11
PDLIM5	1,88	1,07E-01	PDZ and LIM domain 5
MYH11	1,85	6,95E-02	Myosin, heavy chain 11, smooth muscle
CRTC2	1,83	7,66E-02	CREB regulated transcription coactivator 2
NUMA1	1,83	5,47E-02	Nuclear mitotic apparatus protein 1
ARHGEF10L	1,81	8,05E-02	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 10-like
PTPN20A	1,81	9,78E-02	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 20A
FKBP9L	1,79	9,10E-02	FK506 binding protein 9-like
SLC25A17	1,76	1,07E-01	Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; peroxisomal membrane protein, 34kDa),
TPM2	1,69	5,45E-02	Tropomyosin 2 (beta)
PML	1,69	7,48E-02	Promyelocytic leukemia
ADD3	1,63	7,51E-02	Adducin 3 (gamma)
TPM1	1,63	7,74E-02	Tropomyosin 1 (alpha)
MSI2	1,59	8,25E-02	Musashi homolog 2 (Drosophila)
PTPRB	1,59	5,63E-01	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, B
TTN	1,57	1,47E-01	Titin
ITGB6	1,57	7,74E-02	Integrin, beta 6
ZNRF2P1	1,53	7,24E-02	zinc and ring finger 2 pseudogene 1
SSH1	1,53	7,52E-02	Slingshot homolog 1 (Drosophila)
MBD1	1,53	6,71E-02	Methyl-CpG binding domain protein 1
FCGRT	1,53	5,93E-02	Fc fragment of IgG, receptor, transporter, alpha
USP9Y	1,52	4,99E-02	Ubiquitin specific peptidase 9, Y-linked (fat facets-like, Drosophila)
KY	1,48	6,77E-02	Kyphoscoliosis peptidase
ATP6V1F	1,45	8,75E-02	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 14kDa, V1 subunit F
FEZ2	1,38	6,05E-02	Fasciculation and elongation protein zeta 2 (zygin II)
PLEKHA7	1,37	6,29E-02	Pleckstrin homology domain containing, family A member 7
FBLN1	1,34	4,94E-02	Fibulin 1
DMXL1	1,34	7,74E-02	Dmx-like 1
METRN	1,33	5,13E-02	Meteorin, glial cell differentiation regulator
MXRA7	1,32	4,87E-02	Matrix-remodelling associated 7
DUOX2	1,31	7,40E-02	Dual oxidase 2
CXCL12	1,24	5,00E-02	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1)
TLL2	1,21	2,37E-01	Tolloid-like 2
LDB3	1,12	5,05E-02	LIM domain binding 3

Supplemental Table 4

Gene Symbol	Δ -PSI	Z-score	Gene Description
MYH11	0,74	2,24	Myosin, heavy chain 11, smooth muscle
MYOM1	0,64	2,28	Myomesin 1, 185kDa
SOCS7	0,58	2,30	Suppressor of cytokine signaling 7
PTPN20B	0,57	2,27	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 20B
ZNF619	0,56	1,79	Zinc finger protein 619
ZNF195	0,55	2,25	Zinc finger protein 195
NCOR2	0,55	2,16	Nuclear receptor co-repressor 2
ZFYVE21	0,55	2,01	Zinc finger, FYVE domain containing 21
ARVCF	0,53	1,98	Armadillo repeat gene deletes in velocardiofacial syndrome
CATSPER2	0,49	1,40	Cation channel, sperm associated 2
LGALS9	0,48	2,02	Lectin, galactoside-binding, soluble, 9 (galectin 9)
HHLA3	0,47	2,22	HERV-H LTR-associating 3
MYH10	0,47	1,66	Myosin, heavy chain 10, non-muscle
MYH10	0,47	1,21	Myosin, heavy chain 10, non-muscle
COPZ2	0,46	2,18	Coatomer protein complex, subunit zeta 2
CDK10	0,46	2,07	Cyclin-dependent kinase 10
CBR4	0,46	1,75	Carbonyl reductase 4
MYH10	0,46	1,63	Myosin, heavy chain 10, non-muscle
MEAF6	0,45	2,01	MYST/Esa1-associated factor 6
FANCA	0,45	1,88	Fanconi anemia, complementation group A
SCN5A	0,44	2,10	Sodium channel, voltage-gated, type V, alpha subunit
MEAF6	0,44	2,07	MYST/Esa1-associated factor 6
BC038570	0,44	2,02	lncRNA
CDC42BPA	0,43	1,89	CDC42 binding protein kinase alpha (DMPK-like)
GUCA1C	0,43	1,46	Guanylate cyclase activator 1C
SNX22	0,42	2,23	Sorting nexin 22
MEAF6	0,42	2,09	MYST/Esa1-associated factor 6
P2RY6	0,42	1,99	Pyrimidinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 6
LPHN2	0,42	1,95	Latrophilin 2
C16orf93	0,42	1,86	Chromosome 16 Open Reading Frame 93
COL11A2	0,42	1,63	Collagen, type XI, alpha 2
FYN	0,42	1,59	FYN oncogene related to SRC, FGR, YES
SORBS2	0,41	2,15	Sorbin and SH3 domain containing 2
FEZ2	0,41	1,99	Fasciculation and elongation protein zeta 2 (zygin II)
FBXW7	0,41	1,44	F-box and WD repeat domain containing 7
ABI2	0,40	2,35	Abl interactor 2
ESRRG	0,40	2,07	Estrogen-related receptor gamma
TJAP1	0,40	2,07	Tight junction associated protein 1 (peripheral)
BBX	0,40	1,66	Bobby sox homolog (Drosophila)
ANGPTL2	0,39	2,39	Angiopoietin-like 2
LGALS9	0,39	2,37	Lectin, galactoside-binding, soluble, 9 (galectin 9)
PMM2	0,39	2,37	Phosphomannomutase 2
CD47	0,39	2,13	CD47 molecule
ARHGEF10L	0,39	2,04	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 10-like
C8orf83	0,39	2,01	Triple QxxK/R Motif Containing
PMM2	0,39	1,42	Phosphomannomutase 2
CRIM1	0,39	1,35	Cysteine rich transmembrane BMP regulator 1 (chordin-like)
DPEP2	0,39	1,31	Dipeptidase 2
BNC2	0,38	2,12	Basonuclin 2
TRAF3IP2-AS1	0,38	1,83	TRAF3IP2 Antisense RNA
CMPK2	0,38	1,81	Cytidine Monophosphate (UMP-CMP) Kinase 2, Mitochondrial
ZNF655	0,38	1,81	Zinc finger protein 655
PTPN4	0,38	1,76	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 4 (megakaryocyte)
LGALS9	0,38	1,71	Lectin, galactoside-binding, soluble, 9 (galectin 9)
OSBPL6	0,37	2,54	Oxysterol binding protein-like 6
MUC1	0,37	2,33	Mucin 1, cell surface associated
BNC2	0,37	1,80	Basonuclin 2
LY6E	0,37	1,53	Lymphocyte antigen 6 complex, locus E
PFKFB4	0,37	1,44	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4
SUN2	0,37	1,39	Sad1 And UNC84 Domain Containing 2
MUC1	0,37	1,23	Mucin 1, cell surface associated
MBNL2	0,36	2,16	Muscleblind-like 2 (Drosophila)
CXorf23	0,36	2,14	Chromosome X open reading frame 23
SOCS7	0,36	2,12	Suppressor of cytokine signaling 7
LDB3	0,36	2,03	LIM domain binding 3
FAM188A	0,36	1,80	Family With Sequence Similarity 188, Member A
PHTF1	0,36	1,77	Putative homeodomain transcription factor 1
MAST4	0,36	1,66	Microtubule associated serine/threonine kinase family member 4
TMEM68	0,36	1,64	Transmembrane protein 68

Supplemental Table 4

Gene symbol	Δ -PSI	Z-score	Gene description
MUC1	0,36	1,57	Mucin 1, cell surface associated
ANKAR	0,36	1,53	Ankyrin and armadillo repeat containing
FOXP2	0,36	1,43	Forkhead box P2
GHRL	0,36	1,34	Ghrelin/obestatin preprohormone
VAV2	0,35	2,29	Vav 2 guanine nucleotide exchange factor
SSBP3	0,35	2,04	Single stranded DNA binding protein 3
AGBL4	0,35	1,67	ATP/GTP binding protein-like 4
CPNE3	0,35	1,67	Copine III
GNG2	0,35	1,57	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 2
ST5	0,35	1,41	Suppression of tumorigenicity 5
SERPINA3	0,35	1,40	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin)
FAM115C	0,35	1,39	
MUC1	0,35	1,07	Mucin 1, cell surface associated
MBD1	0,34	2,32	Methyl-CpG binding domain protein 1
ENAH	0,34	2,18	Enabled homolog (Drosophila)
SORBS2	0,34	2,12	Sorbin and SH3 domain containing 2
IL12RB2	0,34	1,75	Interleukin 12 receptor, beta 2
SYTL2	0,34	1,74	Synaptotagmin-like 2
MYO15A	0,34	1,74	Myosin XVA
SUN1	0,34	1,64	Sad1 And UNC84 Domain Containing 1
ZNF385D	0,34	1,57	Zinc Finger Protein 385D
PRIM2	0,34	1,54	Primase, DNA, polypeptide 2 (58kDa)
MYCBPAP	0,34	1,47	MYCBP associated protein
ANGPTL1	0,34	1,13	Angiopoietin-like 1
FAM86B1	0,34	1,07	Family with sequence similarity 86, member B1
TCF12	0,33	2,12	Transcription factor 12 (HTF4, helix-loop-helix transcription factors 4)
FBXL13	0,33	2,04	F-box and leucine-rich repeat protein 13
ABI2	0,33	2,00	Abl interactor 2
MXRA7	0,33	1,97	Matrix-remodelling associated 7
SLC16A11	0,33	1,97	Solute carrier family 16, member 11 (monocarboxylic acid transporter 11)
NFASC	0,33	1,89	Neurofascin homolog (chicken)
ARHGAP17	0,33	1,82	Rho GTPase activating protein 17
VPS13D	0,33	1,72	Vacuolar protein sorting 13 homolog D (S. cerevisiae)
EPST11	0,33	1,70	Epithelial stromal interaction 1 (breast)
RGR	0,33	1,67	Retinal G protein coupled receptor
TRIM6	0,33	1,66	Tripartite Motif Containing 6
PAK6	0,33	1,46	P21(CDKN1A)-activated kinase 6
AGXT2L2	0,33	1,42	Alanine-Glyoxylate Aminotransferase 2-Like 2
DOK1	0,33	1,41	Docking protein 1, 62kDa (downstream of tyrosine kinase 1)
MUC1	0,33	1,40	Mucin 1, cell surface associated
MUC1	0,33	1,35	Mucin 1, cell surface associated
CEP164	0,33	1,19	Centrosomal protein 164kDa
ARHGEF7	0,32	2,32	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7
SNX22	0,32	2,23	Sorting nexin 22
PGAP1	0,32	1,92	GPI deacylase
MBNL1	0,32	1,84	Muscleblind-like (Drosophila)
INPP1	0,32	1,80	Inositol polyphosphate-1-phosphatase
JMJD5	0,32	1,79	Jumonji domain containing 5
HDAC9	0,32	1,72	Histone deacetylase 9
GZMB	0,32	1,62	granzyme 2, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1
TRAF3IP2-AS1	0,32	1,47	TRAF3IP2 Antisense RNA 1
CCT6P1	0,32	1,46	Chaperonin Containing TCP1, Subunit 6 (Zeta) Pseudogene 1
UBXN11	0,32	1,36	UBX Domain Protein 11
LST1	0,32	1,19	Leukocyte specific transcript 1
NBPF10	0,32	1,17	Neuroblastoma Breakpoint Family, Member 10
AURKC	0,32	1,14	Aurora kinase C
SCRIB	0,32	1,13	Scribbled homolog (Drosophila)
WARS	0,32	1,11	Tryptophanyl-tRNA synthetase
PCBP1-AS1	0,32	1,09	PCBP1 Antisense RNA 1
POLE2	0,32	1,09	Polymerase (DNA directed), epsilon 2 (p59 subunit)
CMTM1	-0,32	1,87	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 1
CLIC6	-0,32	1,86	Chloride intracellular channel 6
C11orf80	-0,32	1,73	Chromosome 11 open reading frame 80
TBC1D5	-0,32	1,65	TBC1 domain family, member 5
MACF1	-0,32	1,50	Microtubule-actin crosslinking factor 1
MYO5B	-0,32	1,47	myosin VB
NEO1	-0,32	1,41	Neogenin homolog 1 (chicken)

Supplemental Table 4

Gene symbol	Δ -PSI	Z-score	Gene description
ITGA6	-0,33	2,36	Integrin, alpha 6
PALM	-0,33	2,33	Paralemmin
ADHFE1	-0,33	2,03	Alcohol dehydrogenase, iron containing, 1
AGXT2L2	-0,33	1,87	Alanine-Glyoxylate Aminotransferase 2-Like 2
CATSPER3	-0,33	1,75	Cation channel, sperm associated 3
TEAD1	-0,33	1,72	TEA domain family member 1 (SV40 transcriptional enhancer factor)
R3HDM1	-0,33	1,64	R3H domain containing 1
MAK	-0,33	1,59	Male germ cell-associated kinase
MUC1	-0,33	1,49	Mucin 1, cell surface associated
PVRIG	-0,33	1,48	Poliovirus receptor related immunoglobulin domain containing
GNG2	-0,33	1,47	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 2
PPP2R3C	-0,33	1,32	Protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B", gamma
RUNX2	-0,33	1,30	Runt-related transcription factor 2
DAG1	-0,33	1,29	Dystroglycan 1 (dystrophin-associated glycoprotein 1)
ODZ3	-0,33	1,19	Odz, odd Oz/ten-m homolog 3 (Drosophila)
ESR1	-0,33	1,05	Estrogen receptor 1
SYNE1	-0,34	2,50	Spectrin repeat containing, nuclear envelope 1
FMNL2	-0,34	2,50	Formin-like 2
SPAG9	-0,34	2,50	Sperm associated antigen 9
DEM1	-0,34	1,90	Exonuclease 5
TPD52L2	-0,34	1,87	Tumor protein D52-like 2
SLC39A11	-0,34	1,58	Solute carrier family 39 (metal ion transporter), member 11
NOD2	-0,34	1,56	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2
HMG2P46	-0,34	1,32	high mobility group nucleosomal binding domain 2 pseudogene 46
MYH11	-0,35	2,10	Myosin, heavy chain 11, smooth muscle
LMF1	-0,35	2,08	Lipase maturation factor 1
MKNK1	-0,35	1,95	MAP kinase interacting serine/threonine kinase 1
USP1	-0,35	1,66	Ubiquitin specific peptidase 1
HOTAIRM1	-0,35	1,58	HOXA transcript antisense RNA, myeloid-specific 1
EXOSC8	-0,35	1,55	Exosome component 8
ZNF345	-0,35	1,50	Zinc finger protein 345
COL11A2	-0,35	1,49	Collagen, type XI, alpha 2
ENTPD4	-0,35	1,48	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 4
TAC4	-0,35	1,47	Tachykinin 4 (hemokinin)
BNIP1	-0,35	1,38	BCL2/adenovirus E1B 19kD interacting protein like
MDH1B	-0,35	1,33	Malate dehydrogenase 1B, NAD (soluble)
TPPP2	-0,35	1,29	Tubulin polymerization-promoting protein family member 2
HOXB3	-0,35	1,25	Homeobox B3
MTA1	-0,36	2,49	Metastasis associated 1
SUN1	-0,36	2,11	Sad1 and UNC84 domain containing 1
SLC26A1	-0,36	2,03	Solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 1
CD37	-0,36	1,89	CD37 molecule
CCNB2	-0,36	1,58	Cyclin B2
DNM1P46	-0,36	1,42	DNM1 pseudogene 46
ARHGAP44	-0,37	2,45	Rho GTPase activating protein 44
KIFC3	-0,37	2,15	Kinesin family member C3
CCBL1	-0,37	2,06	Cysteine conjugate-beta lyase; cytoplasmic (glutamine transaminase K, kynurenine aminotransferase)
USP47	-0,37	2,03	Ubiquitin specific peptidase 47
MUC1	-0,37	1,99	Mucin 1, cell surface associated
MAK	-0,37	1,66	Male germ cell-associated kinase
HOTAIRM1	-0,37	1,57	HOXA transcript antisense RNA, myeloid-specific 1
LDLRAD3	-0,37	1,52	Low density lipoprotein receptor class A domain containing 3
NPNT	-0,37	1,00	Nephronectin
ARHGEF11	-0,38	2,28	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 11
CELF1	-0,38	1,95	CUGBP, Elav-Like Family Member 1
HDAC9	-0,38	1,79	Histone deacetylase 9
RGMA	-0,38	1,78	RGM domain family, member A
SERINC4	-0,38	1,69	Serine incorporator 4
MUC1	-0,38	1,61	Mucin 1, cell surface associated
MBNL1	-0,39	1,81	Muscleblind-like (Drosophila)
ZNF519	-0,39	1,68	Zinc finger protein 519
BBX	-0,39	1,61	Bobby sox homolog (Drosophila)
IKZF3	-0,39	1,58	IKAROS family zinc finger 3 (Aiolos)
MUC1	-0,39	1,32	Mucin 1, cell surface associated
C7orf44	-0,40	2,24	Chromosome 7 open reading frame 44
SORBS2	-0,40	2,22	Sorbin and SH3 domain containing 2
SLC22A4	-0,40	2,16	Solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 4
THOC5	-0,40	2,02	THO complex 5
MEF2D	-0,40	1,91	Myocyte enhancer factor 2D

Supplemental Table 4

Gene symbol	Δ -PSI	Z-score	Gene description
SULT4A1	-0,40	1,90	Sulfotransferase family 4A, member 1
ZNF212	-0,40	1,83	Zinc finger protein 212
NEU4	-0,40	1,55	Sialidase 4
C1orf144	-0,40	1,43	Chromosome 1 open reading frame 144
MUC1	-0,40	1,42	Mucin 1, cell surface associated
MAP1LC3B	-0,40	1,03	Microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta
RAD51D	-0,41	2,04	RAD51 Homolog D
STAG2	-0,41	1,99	Stromal antigen 2
DMD	-0,41	1,67	Dystrophin (muscular dystrophy, Duchenne and Becker types)
SUN1	-0,41	1,64	Sad1 and UNC84 domain containing 1
DNM1P46	-0,41	1,49	DNM1 pseudogene 46
MCF2L	-0,42	2,36	MCF.2 cell line derived transforming sequence-like
MUC1	-0,42	2,34	Mucin 1, cell surface associated
SGIP1	-0,42	2,27	SH3-domain GRB2-like (endophilin) interacting protein 1
SLC25A17	-0,42	1,91	Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; peroxisomal membrane protein, 34kDa), member 17
HHAT	-0,42	1,59	Hedgehog acyltransferase
TPPP2	-0,42	1,42	Tubulin polymerization-promoting protein family member 2
DHRS4L2	-0,43	2,47	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 4 like 2
EPN3	-0,43	2,07	Epsin 3
PLD1	-0,43	1,93	Phospholipase D1, phosphatidylcholine-specific
NGG2	-0,43	1,82	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 2
IKZF1	-0,43	1,36	IKAROS family zinc finger 1 (Ikaros)
WASH3P	-0,43	1,30	WAS protein family homolog 3 pseudogene
MFSD1	-0,43	1,23	Major facilitator superfamily domain containing 1
LDB3	-0,45	2,52	LIM domain binding 3
DCLK2	-0,45	2,28	Doublecortin-like kinase 2
MUC1	-0,45	1,92	Mucin 1, cell surface associated
IKZF3	-0,45	1,90	IKAROS family zinc finger 3 (Aiolos)
MAPK10	-0,45	1,86	Mitogen-activated protein kinase 10
ADCYAP1R1	-0,45	1,65	Adenylate cyclase activating polypeptide 1 (pituitary) receptor type I
MUC1	-0,46	2,33	Mucin 1, cell surface associated
FLNB	-0,46	2,00	Filamin B, beta (actin binding protein 278)
FAM193B	-0,47	1,33	family with sequence similarity 193, member B
SLC25A17	-0,49	2,10	Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; peroxisomal membrane protein, 34kDa), member 17
FLNB	-0,49	2,06	Filamin B, beta (actin binding protein 278)
UBAC2	-0,49	2,04	UBA domain containing 2
TRAF3IP2-AS1	-0,49	1,95	TRAF3IP2 Antisense RNA 1
MBNL2	-0,49	1,75	Muscleblind-like 2 (Drosophila)
MBD2	-0,50	2,18	Methyl-CpG binding domain protein 2
PLEKHG1	-0,50	1,76	Pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 1
MYOCD	-0,51	2,17	Myocardin
PCF11	-0,52	2,20	PCF11, cleavage and polyadenylation factor subunit, homolog (S. cerevisiae)
NGG2	-0,53	1,94	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 2
SORBS2	-0,56	2,36	Sorbin and SH3 domain containing 2
ABLIM1	-0,58	2,01	Actin binding LIM protein 1
DIDO1	-0,58	1,80	Death inducer-obliterator 1
SUN1	-0,59	2,06	Sad1 and UNC84 domain containing 1
PDLIM3	-0,71	2,14	PDZ and LIM domain 3
PDLIM3	-0,76	1,86	PDZ and LIM domain 3
MAPT	-0,81	2,44	Microtubule-associated protein tau
CLASP1	-0,88	2,20	Cytoplasmic linker associated protein 1

Supplemental Table 5

Channel	Peak current at -10 mV (μ A)	Steady-state activation		N
		S (mV)	V_m (mV)	
SCN5A Exon 6B	3.67 ± 0.35	5.3 ± 0.2	-31.0 ± 0.9	24
SCN5A Exon 6A	2.10 ± 0.20	6.0 ± 0.2	-23.6 ± 0.9	26
Exon 6A + exon 6B	2.69 ± 0.29	6.2 ± 0.2	-26.4 ± 0.8	25

Supplemental Table 6

gene	exon	primer FW	primer REV
ABLIM1	14	GTTTGGCATCCCGACTGTAAG	GAGCCAGGAATACTGGAGCCTGG
ADD3	ex16	CCACCAGCTCCTCCTAACC	TACCATGACAGGCACTTCCA
ANK3	ex40	CCCTGTGGTCGTCTGTCTTT	CCAGGCTCAGTCAAGTAGCTG
ARHGEF10L	ex8	CGAGAGCTACAGCGAGGACT	GTGCAGGAAGGAGACTTTGC
CACNA1C	ex9	TCATCTTTGGATCCTTTTTCG	CTTGGCCTTCTCCCTCTCTT
CLASP1	ex22	TGCCAAATCCAAAGTCTCCT	CCCCGGTTATCAGGTGTAGA
CLTB	ex6	AAGGTCACGGAACAGGAATG	CTGCTCTTGGGGTTGAAGTC
CRTC2	ex13	CATTATGGGACACCGTACCC	CCTAAAAATCCAGGCCCTTC
CAMK2B	ex18 19 20	TGACAGTGCCAATACCACCA	GCCTCAAAGTCACCGTTGTT
EPN2	ex5	AGCAACCAGATCACCTTTGG	CTGCAGCTGAAGCTCCTCTT
GOLGA4	ex24	AGAGAAGATGCTCGGCTGAT	TTCTCAAAGAGTAGCAAGTGTGG
MBNL2	ex11	TACCAGCGCGTCTTTAAC	TTATTCTCAATGCAGATTCTTGG
MXRA7	ex4	GGCTTCTCCTTCAAATACAGC	AAGATGCCAAAAGGAAAAGC
MYH11	ex6	CACCAAGAAGGTCATTCACTACC	CTCCAGAATCGGGTTTGCT
NUMA1	ex20	GGAGGTGATGACTGCCAAGT	CTTCTGCTGCTGCACCTTG
SCN5A(6)	6 & 7 (BstBI)	CTTCTGCCTGCACGCGTTCAC	CAGAAGACTGTGAGGACCATC
TECR	ex2	CTGTAGGGAGCCTGTGCTGT	CCTTGTCTTTGCGTCCAGA
TNNT2 (cTNT)	ex5	ATAGAAGAGGTGGTGGAAAGTAC	GTCTCAGCCTCTGCTTCAGCATC
TPM2	ex 6/7	GAAGCTGGTGATCCTGGAAG	TCCTTCAGCTTCTCCTCCAA
UNC13B	ex38	CTCTCATCAAGACCTTTGTGC	CCCCAGTACCAGGGTGTGTA

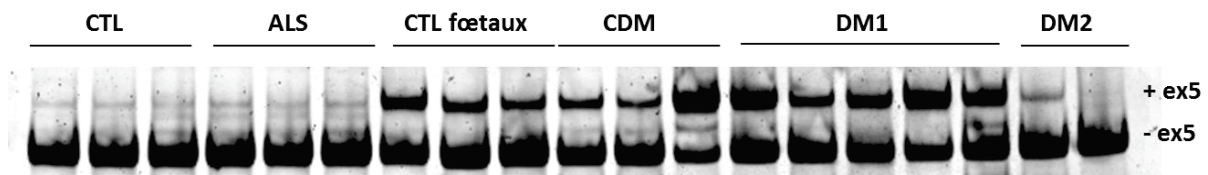


Figure 42 : Altération de l'épissage alternatif de l'exon 5 de la Troponine T cardiaque dans les échantillons de cœurs de patients DM1, DM2 et CDM.

Analyse par RT-PCR de l'exon 5 de cTNT humain endogène sur des échantillons cardiaques d'individus contrôles, ALS, contrôles fœtaux (20, 22, 35 semaines), de patients DM1, CDM fœtaux (20, 22 et 28 semaines) et DM2. ALS : Amyotrophic Lateral Sclerosis.

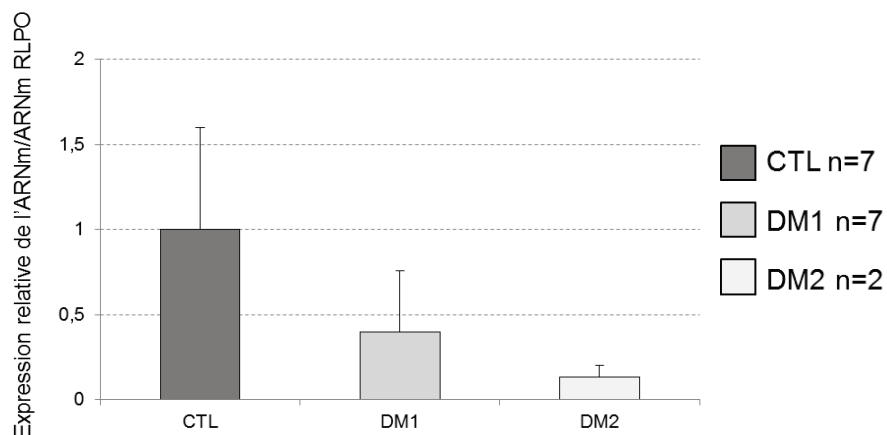


Figure 43 : Analyse de l'expression de SCN5A dans des échantillons de cœurs DM.

Analyse par qRT-PCR de l'expression de l'ARNm *SCN5A* dans des échantillons cardiaques de patients contrôles adultes et ALS (CTL), DM1 et DM2. Les oligonucléotides utilisés s'hybrident à l'exon 15 constitutif de *SCN5A*. L'expression de *SCN5A* est normalisée à l'expression de l'ARNm de *RLPO*.

RESULTATS SUPPLEMENTAIRES

1. Vérification de l'altération de l'épissage alternatif de *cTNT* dans les échantillons de cœurs de patients DM.

Afin de vérifier l'altération cardiaque des échantillons de cœurs dont nous disposons, j'ai analysé l'épissage alternatif de l'exon 5 fœtal de la Troponine T cardiaque (*cTNT*). En effet, l'inclusion anormale de cet exon a été découverte initialement dans les cœurs de patients DM1 (Philips *et al.*, 1998). Nous avons ainsi confirmé l'altération de l'épissage de l'exon 5 dans les échantillons CDM, DM1 et un des deux échantillons DM2 (figure 42). Nous avons également observé que l'échantillon DM2 sans altération de l'exon 5 de *cTNT* ne présente pas d'altération d'épissage des exons 6A/6B de *SCN5A*.

2. Analyse de l'expression de l'ARNm *SCN5A* dans les échantillons de cœurs de patients DM.

Afin de vérifier l'absence de variation d'expression de l'ARNm *SCN5A*, j'ai effectué une qRT-PCR à partir d'échantillons cardiaques d'individus contrôles et atteints de sclérose latérale amyotrophique (ALS), DM1, et DM2. Aucune variation significative n'a été observée dans les échantillons de cœurs de patients DM par rapport aux échantillons contrôles (figure 43). On peut noter une tendance à la diminution qui est non significative dans les cœurs de patients DM2. Une quantification de l'expression de l'ARNm *SCN5A* sur un plus grand nombre d'échantillons DM2 est donc nécessaire pour conclure quant à une éventuelle diminution de la quantité d'ARNm *SCN5A* chez les patients DM2.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1. Les causes et les conséquences de la dérégulation de miR-1 dans le cœur des patients DM

1. 1. Les causes de la dérégulation de miR-1

Les dystrophies myotoniques sont connues comme étant des maladies associées à des altérations de l'épissage alternatif. En effet, l'expression des expansions CUG et CCUG induit des changements de l'expression ou de la disponibilité de facteurs d'épissage alternatif spécifiques. Ainsi, les expansions CUG/CCUG séquestrent les protéines de la famille MBNL (MBNL1, 2 et 3), et induisent une augmentation de la demi-vie de CUGBP1. Ces altérations conduisent à des modifications spécifiques de l'épissage alternatif, qui sont directement associées aux symptômes des DM. Ainsi, les épissages du récepteur à l'insuline (*INSR*), du canal chlore (*CLCN1*), de l'amphiphysine (*BINI*) et du canal à calcium voltage-dépendant $Ca_v1.1$ (*CACNA1S*) sont associés aux symptômes de résistance à l'insuline, de myotonie et de faiblesse musculaire (Savkur *et al.*, 2001 ; Charlet *et al.*, 2002 ; Mankodi *et al.*, 2002 ; Fugier *et al.*, 2011 ; Tang *et al.*, 2012). Toutefois, de nombreux épissages alternatifs ne sont pas corrélés à des symptômes. Inversement, les causes moléculaires de nombreux symptômes, tels que la cataracte ou les troubles de la conduction et du rythme cardiaque, sont encore inexpliquées.

L'importance des miARNs dans de nombreux processus cellulaires et pathologies humaines nous a conduit à étudier ceux-ci dans des cultures primaires de muscles squelettiques de patients atteints ou non atteints de CDM (collaboration avec l'équipe du Dr. Denis Furling, Institut de myologie, Paris). Parmi l'expression de huit cents miARNs étudiés par puce à ADN, seuls sept (miR-1, miR-126, miR-138, miR-146b, miR-199b, miR-208 et miR-499) ont été identifiés et confirmés par qRT-PCR comme altérés dans les cellules DM.

Le rôle crucial de miR-1 dans le développement et le fonctionnement cardiaque faisant de lui un bon candidat à analyser dans l'étude des mécanismes moléculaires conduisant aux troubles cardiaques chez les patients DM. En effet, l'invalidation de *miR-1-2* chez la souris conduit à un phénotype cardiaque, incluant des défauts de conduction cardiaque et des arythmies (Zhao *et al.*, 2007). De plus, miR-1 régule des protéines nécessaires au fonctionnement cardiaque telles que la connexine 43 (*GJA1*), qui est un composant majeur des jonctions communicantes ; ou encore le canal potassique KCNE1, essentiel à la

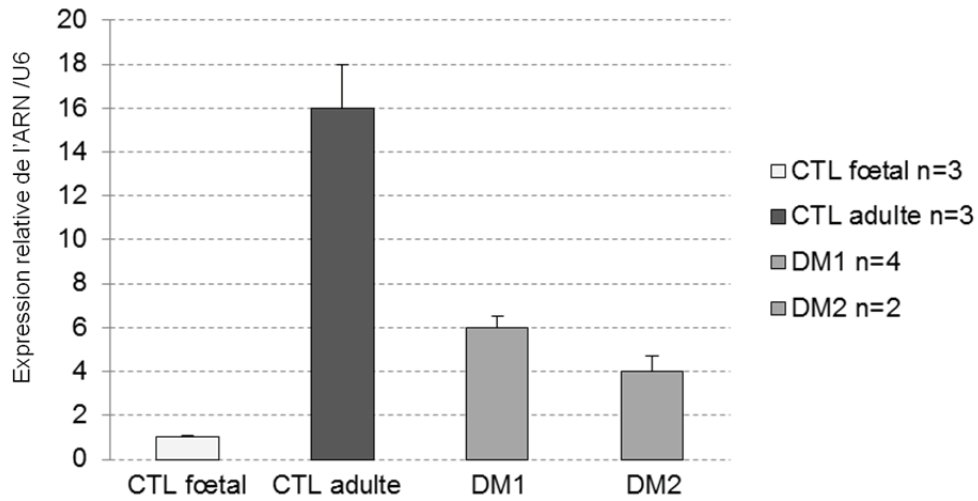


Figure 44 : Niveau d'expression de miR-1 dans les échantillons de cœurs de patients DM.

Analyse par qRT-PCR de l'expression de miR-1 à partir d'échantillons de cœurs contrôles fœtaux (20, 24, 35 semaines), adultes, DM1 et DM2. Le niveau d'expression de miR-1 est normalisé par rapport à celui de l'expression du snARN U6.

repolarisation de la membrane des cardiomyocytes (Li *et al.*, 2012 ; Xu *et al.*, 2012). Nous avons donc entrepris d'analyser l'expression de miR-1 dans le cœur de patients DM. Des expériences de qRT-PCR montrent une diminution de l'expression de miR-1 dans des échantillons cardiaques de patients DM1 et DM2. Comme de nombreuses altérations de l'épissage alternatif, l'expression de miR-1 chez les patients DM se rapproche de son niveau d'expression fœtale (figure 44). Au contraire et de façon intéressante, le niveau d'expression du précurseur de miR-1, pré-miR-1, est inchangé dans les échantillons de cœur de patients DM. Ceci suggère donc un défaut de la maturation de miR-1 chez les patients DM.

1.1.1. La régulation de la biogenèse de miR-1 par CUGBP1

MBNL1 et CUGBP1 sont connus comme étant deux facteurs régulant l'épissage alternatif de façon antagoniste. Plusieurs études ont montré que le niveau d'expression de CUGBP1 est augmenté chez les patients atteints de DM1, tandis que cette altération est discutée chez les patients atteints de DM2 (Roberts *et al.*, 1997 ; Savkur *et al.*, 2001 ; Timchenko *et al.*, 2001 ; Wang *et al.*, 2007). L'analyse de la séquence de miR-1-1 et de miR-1-2 montre la présence de motifs UGU, pouvant être reconnus par CUGBP1, dans la séquence des pri-, pré- et miARN-1-1 et miARN-1-2 matures, suggérant ainsi que CUGBP1 pourrait lier miR-1 et réguler sa biogenèse ou sa stabilité (Teplova *et al.*, 2010). C'est pourquoi, nous avons souhaité tester l'éventuelle implication de CUGBP1 dans la régulation de la maturation de miR-1 par des expériences de maturation *in cellulo*. Toutefois, la surexpression et la déplétion de CUGBP1 dans des cellules HeLa exprimant pri-miR-1 de manière exogène n'ont pas affecté la quantité de miR-1 mature, suggérant que la CUGBP1 ne régule pas la maturation de miR-1. Ainsi, ces résultats couplés à la diminution de miR-1 observée dans les cœurs de patients DM1 et DM2, et à l'absence de surexpression de CUGBP1 chez les DM2, indique que CUGBP1 n'est pas un régulateur majeur de la maturation de miR-1.

1.1.2. La régulation de la biogenèse de miR-1 par LIN28 et TUT-4

Des études ont mis en évidence un rôle inhibiteur des protéines LIN28 et TUT-4 dans la biogenèse des miARNs de la famille let-7 (Heo *et al.*, 2009). LIN28 lie le motif GXGAY présent au niveau de la boucle du pré-let-7 *via* son domaine CSD, et lie le motif GGAG *via* ses deux domaines à doigts de zinc CCHC (Nam *et al.*, 2011). Nous avons observé des séquences similaires à ces deux motifs de liaison dans le pré-miR-1 : le premier site « GGA »

est au niveau de la boucle du pré-miR-1 et le second site « GGAA » est proche du site de clivage de pré-miR-1 par DICER. C'est pourquoi nous nous sommes demandés si LIN28 et TUT-4 inhibaient la maturation de pré-miR-1. Des expériences de transfection cellulaire, de retard sur gel et d'uridylation *in vitro*, nous ont alors permis de montrer que LIN28 régule la biogenèse de miR-1 *in vivo* et que LIN28 lie et TUT-4 uridyle le pré-miR-1 *in vitro* (cf publication). Nous avons également montré une compétition entre MBNL1 et LIN28 pour la liaison au pré-miR-1 *in vitro*. De plus, des expériences de maturation *in cellulo* montrent que la biogenèse de miR-1 est régulée par une balance entre les niveaux cellulaires d'expression de LIN28 et MBNL1.

LIN28A et TUT-4 sont localisés dans le cytoplasme tandis que LIN28B est localisé dans le noyau, et plus précisément dans le nucléole (Piskounova *et al.*, 2011). De plus, il est intéressant de noter que LIN28A et LIN28B inhibent la maturation des let-7 entre le pré-miARN et le miARN mature, c'est à dire l'étape régulée par DICER (Heo *et al.*, 2008; Heo *et al.*, 2009), tandis que LIN28B peut aussi inhiber la maturation entre le pri-miARN et le pré-miARN, c'est à dire l'étape régulée par le complexe DROSHA-DGCR8, par un mécanisme encore inconnu (Piskounova *et al.*, 2011). Ainsi, plusieurs mécanismes de régulation de la maturation de miR-1 par LIN28 peuvent être envisagés.

- Régulation nucléaire : LIN28B

MBNL1, qui est majoritairement nucléaire, entrerait en compétition avec LIN28B dans le noyau et empêcherait l'inhibition de la maturation du pri-miR-1 en pré-miR-1 par LIN28B. L'analyse de l'expression de LIN28 dans différents tissus humains montre que LIN28B est fortement exprimé dans le placenta et les cellules germinales (Guo *et al.*, 2006) tandis que l'analyse de son expression chez la souris montre une diminution de son expression au cours du développement ainsi qu'une persistance de son expression dans le myocarde et les muscles squelettiques (Yang and Moss, 2003). Ces données suggèrent que LIN28B est également exprimée dans le cœur humain adulte et pourrait ainsi réguler la maturation de pri-miR-1. Cependant et au contraire de LIN28B, la localisation nucléaire de la protéine MBNL1 n'est pas nucléolaire, et nous n'avons pas observé d'altération de la quantité de pri-miR-1 dans les cœurs de patients DM, invalidant ainsi cette hypothèse.

- Régulation cytoplasmique : LIN28A

MBNL1 entrerait en compétition avec LIN28A ou LIN28B dans le cytoplasme et empêcherait l'inhibition de la maturation du pré-miR-1 en miR-1 mature par LIN28 et TUT-4. Toutefois, des études de l'expression de LIN28A montrent que cette protéine est spécifiquement exprimée au stage embryonnaire et dans les cellules non différenciées, suggérant donc que LIN28A n'est pas exprimé significativement dans le cœur adulte (Yang and Moss, 2003 ; Richards *et al.*, 2004 ; Poleskaya *et al.*, 2007 ; El-Khairi *et al.*, 2012). TUT-4 est, quant à elle, faiblement détectée dans le cœur de souris adulte suggérant qu'elle serait aussi faiblement exprimée dans le cœur humain adulte (Jones *et al.*, 2012). Enfin, compte tenu du fait que la déplétion de LIN28B dans des cardiomyocytes de rat induit une augmentation de la maturation de miR-1 (cf publication), il est probable que ce soit la fraction cytoplasmique de LIN28B qui lie le pré-miR-1 et recrute ainsi TUT-4, qui uridyle le pré-miR-1 empêchant alors sa maturation par DICER. De plus, ces résultats suggèrent que dans le cœur adulte, MBNL1 est plus fortement exprimé que les protéines LIN28 et TUT-4, empêchant ainsi la liaison des protéines LIN28 et le recrutement de TUT-4, ce qui permet la maturation de miR-1. Chez les patients DM, les expansions CUG ou CCUG séquestrent MBNL1, ce qui inverse la balance d'expression des protéines LIN28/TUT-4 et MBNL1 et permet ainsi à LIN28 de lier et d'inhiber la maturation de pré-miR-1.

Pour confirmer ce modèle, il serait intéressant d'effectuer des expériences de CLIP de LIN28A et/ou LIN28B à partir de cardiomyocytes de rat en culture (H9C2) infectés par un adénovirus exprimant des ARNs contenant des longues répétitions CUG ou CCUG. Ainsi, nous pourrions déterminer laquelle de ces deux protéines lie le pré-miR-1 *in vivo*, et ceci dans des conditions DM. Enfin, la récente découverte du recrutement de TUT-7 (ZCCHC6) par LIN28 et de sa fonction d'uridylation des pré-let-7 (Thornton *et al.*, 2012), suggère que LIN28 pourrait inhiber la maturation du pré-miR-1 en recrutant d'autres membres de la famille des TUTases, tel que TUT-7. Afin de répondre à cette question, nous pourrions analyser l'uridylation du pré-miR-1 dans des cardiomyocytes en culture déplétés par les différents membres de la famille des TUTases. En parallèle, nous pourrions tester l'activité de chacune des TUTases en effectuant des tests d'uridylation *in vitro*.

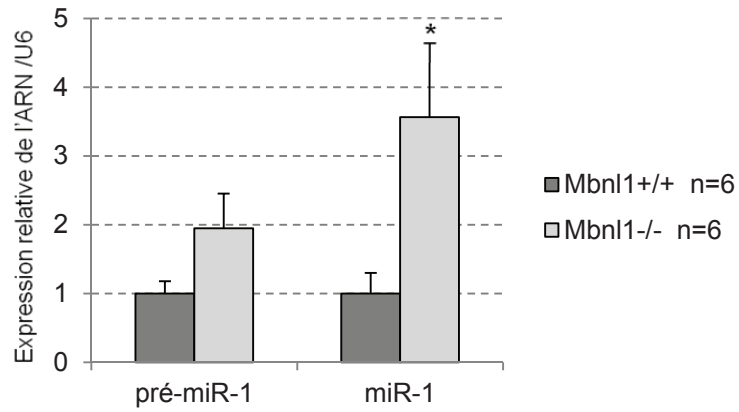


Figure 45 : Expression de pré-miR-1 et de miR-1 dans le cœur de souris *Mbnl1*^{-/-}.

Les qRT-PCR ont été effectuées à partir de 6 échantillons de cœur de souris contrôles (*Mbnl1*^{+/+}) et 6 échantillons de cœur de souris invalidées pour le gène *Mbnl1* (*Mbnl1*^{-/-}). Les expressions de pré-miR-1 et miR-1 mature ont été normalisées à l'expression de snARN U6. * : p<0,05.

1.1.3. La régulation de la biogenèse de miR-1 par MBNL1

La maturation de miR-1 est régulée positivement par MBNL1. En effet, la diminution de la maturation du pré-miR-1 en miR-1 en l'absence de MBNL1 *in cellulo*, ainsi que l'interaction entre MBNL1 et le pré-miR-1 démontrent que MBNL1 est impliqué dans la biogenèse de miR-1 (cf publication). C'est pourquoi, nous avons souhaité étudier si MBNL1 pouvait avoir une fonction autre que celle de protéger le pré-miR-1 de la liaison de LIN28. Les quantités de pri- et de pré-miR-1 n'étant pas altérées chez les patients DM, il s'agirait probablement d'une régulation en aval de DROSHA. Nous avons donc testé les effets de MBNL1 sur l'export et sur le clivage du pré-miR-1.

L'analyse par ARN-FISH de la localisation du pré-miR-1 dans des cardiomyocytes de rat H9C2 exprimant ou non des ARN contenant de longues répétitions CUG (DT960) montre que la localisation du pré-miR-1 dans le noyau ou le cytoplasme est inchangée. La séquestration de MBNL1 n'entraîne donc pas d'altération de l'export de miR-1. Nous avons alors émis l'hypothèse que MBNL1 jouerait un rôle activateur, tel TRBP, dans la réaction de clivage du pré-miR-1 par DICER. Toutefois, des expériences de clivage *in vitro* montrent que l'ajout de protéine MBNL1 ne modifie pas le clivage de pré-miR-1 par DICER.

Ces expériences ont donc montré que MBNL1 n'intervient ni dans la régulation de l'export du précurseur de miR-1, ni dans son clivage par DICER. MBNL1 pourrait alors jouer un rôle dans la stabilité du miARN mature en le protégeant de la dégradation. Toutefois, aucun motif UGC, pouvant être reconnu par MBNL1, n'apparaît au niveau de la séquence de miR-1 mature, suggérant que cette régulation est peu probable. Il semblerait donc que le rôle de MBNL1 soit essentiellement de protéger ce miARN de la voie LIN28/TUT-4.

1.1.4. Conservation de la régulation de la biogenèse de miR-1 par MBNL1

Le motif UGC, qui est reconnu par MBNL1 et qui est situé dans la boucle terminale de pré-miR-1 est conservé chez la souris, le rat et l'homme (cf publication), suggérant que *Mbnl1* pourrait réguler la maturation de miR-1 chez les rongeurs. Cependant, l'analyse par qRT-PCR de l'expression de miR-1 dans des échantillons de cœurs de souris invalidées pour *Mbnl1* ne montre pas de réduction de la maturation de miR-1 (figure 45). Ces résultats renforcent l'hypothèse d'une régulation de miR-1 spécifique à l'homme. En effet, il a été montré que certaines altérations de l'épissage, comme la dérégulation de l'exon 29 de *CACNA1S*, de l'exon 11 de *BINI* ou de l'exon 5 de *TNNT2* (cTNT), sont spécifiques à

l'homme (Phillips *et al.*, 1998 ; Fugier *et al.*, 2011 ; Tang *et al.*, 2012). Cependant, dans le cas de *BINI* ou de *TNNT2*, les motifs de liaison de MBNL1 sont présents chez l'homme mais absents chez la souris, tandis que dans le cas de miR-1, les motifs UGC sont conservés chez la souris. C'est pourquoi, je propose la piste d'une régulation de la maturation de miR-1 par un autre membre de la famille MBNL, qui compenserait la perte de MBNL1. Il est intéressant de noter que MBNL2 est fortement exprimé dans le cœur et qu'aucune donnée sur le phénotype cardiaque des souris *Mbnl1*^{-/-} n'a été publiée depuis la génération de ce modèle en 2003, suggérant que la perte de *Mbnl1* et *Mbnl2* peut être nécessaire pour observer un phénotype cardiaque. De plus, il est intéressant de noter que l'inactivation de *Mbnl2* chez le zébrafish conduit à un dysfonctionnement progressif du cœur (Machuca-Tzili *et al.*, 2011). L'analyse du niveau d'expression de miR-1 dans le cœur de souris invalidées pour les gènes *Mbnl1* et *Mbnl2* serait donc particulièrement intéressant. De même, la surexpression et la déplétion de MBNL2 dans des cardiomyocytes en culture, nous permettrait de savoir si MBNL2 régule la maturation de miR-1.

Enfin, il serait intéressant d'étudier d'autres modèles cardiaques de la dystrophie myotonique. L'équipe de Many Mahadevan a décrit un modèle de souris surexprimant fortement un ARN contenant 5 répétitions CUG et qui présente un phénotype cardiaque, avec notamment une cardiomyopathie dilatée associée à une altération de l'expression du facteur de transcription Nkx2.5 (Mahadevan *et al.*, 2006 ; Yadava *et al.*, 2008). Cependant, les cardiomyopathies dilatées sont rares chez les patients DM, suggérant que ce modèle murin puisse mimer une forme rare ou extrême de la maladie DM. L'équipe de Tom Cooper a elle aussi généré un modèle murin, celui-ci exprimant plus de 900 répétitions CUG interrompues (EpA960) spécifiquement dans le cœur. Ces souris développent des problèmes de conduction cardiaque caractérisés par une prolongation de l'intervalle PR et l'apparition de fibrose (Wang *et al.*, 2007). Nous avons pu analyser le niveau d'expression de miR-1 et de son précurseur dans le cœur de ces souris, et mettre en évidence une diminution de miR-1 et de son précurseur suggérant donc une diminution transcriptionnelle de miR-1 et non un défaut de biogenèse de ce miARN. Notons toutefois que ces souris présentent une cardiomyopathie dilatée et une hypertrophie des cardiomyocytes, deux caractéristiques non détectées dans les cœurs de patients atteints de DM. Il est probable que ces défauts soient dûs à une expression trop forte de répétitions interrompues conduisant à une dégénérescence du cœur, ce qui entraîne une dérégulation transcriptionnelle de nombreux gènes, dont miR-1.

Enfin, notons que des modèles drosophile exprimant des répétitions CUG ou un shARN dirigé contre *Mbl* (l'orthologue de MBNL1 chez la drosophile) présentent une

expression diminuée de miR-1 mais une quantité inchangée de son précurseur, suggérant ainsi une altération de la biogenèse de miR-1 dans ces modèles (Fernandez-Costa *et al.*, 2013).

1.2. Conséquences de la diminution de miR-1 dans le cœur des patients DM

Dans le cœur, de nombreux gènes sont régulés par miR-1. Lors de cette étude, nous avons montré que miR-1 régule l'expression de la connexine 43 et de Ca_v1.2, et que ces deux cibles sont altérées dans le cœur des patients DM.

1.2.1. Conséquences physiologiques de la surexpression de la connexine 43

La connexine 43 (Cx43) est la connexine la plus abondante du cœur humain et forme les jonctions communicantes. Celles-ci sont principalement composées de la Cx43 dans les ventricules, de la Cx40 et la Cx43 dans les oreillettes et de la Cx45 dans les nœuds sinusal et auriculo-ventriculaire. Ces protéines sont indispensables au bon fonctionnement cardiaque. C'est pourquoi des variations de leur expression engendrent de nombreuses maladies cardiaques (Severs *et al.*, 2008 ; Fontes *et al.*, 2012). Une diminution de l'expression de la Cx43 au niveau du ventricule est associée à des défauts de conduction cardiaque ainsi qu'à des arythmies ventriculaires. L'augmentation de la Cx43 dans les oreillettes, quant à elle, provoque des fibrillations auriculaires (Elvan *et al.*, 1997 ; Sakabe *et al.*, 2004 ; Wetzel *et al.*, 2005 ; Severs *et al.*, 2008). Enfin, en 1997, des souris transgéniques surexprimant la Cx43 sous la dépendance d'un promoteur fort (CMV) ont été générées et présentent des anomalies cardiaques (Ewart *et al.*, 1997). Ces souris, qui meurent de façon subite, présentent un élargissement du système de conduction auriculo-ventriculaire indiquant des anomalies du développement du système de conduction, des anomalies du ventricule droit surtout au niveau de la portion apicale du cœur et une hypertrophie du septum inter-ventriculaire.

Nous avons observé une augmentation de la Cx43 dans des échantillons provenant de ventricules gauches de patients DM. Cependant, aucun défaut de conduction ventriculaire n'a encore été associé à une augmentation de l'expression de la Cx43. En effet, la surexpression auriculaire de la Cx43 est principalement associée à des fibrillations auriculaires, symptôme que présentent 5% des patients DM1 (Petri *et al.*, 2012). Il serait donc intéressant d'analyser l'expression de la Cx43 et de son régulateur post-transcriptionnel miR-1 dans des échantillons d'oreillettes de patients DM.

Enfin, la localisation de la Cx43 au niveau de la membrane est un aspect déterminant pour sa fonction. En effet, la Cx43 est majoritairement localisée au niveau des disques

intercalaires des pôles de la cellule cardiaque, et à plus faible densité au niveau latéral permettant ainsi une propagation de l'influx électrique principalement de manière longitudinale (van Kempen *et al.*, 1991 ; Saffitz *et al.*, 1994). Une délocalisation de la Cx43 vers la membrane latérale des cardiomyocytes entraîne des défauts de la propagation longitudinale de l'influx électrique conduisant à des anomalies de la conduction cardiaque (Spach *et al.*, 2000 ; Polontchouk *et al.*, 2001). Il serait donc intéressant de localiser par immunofluorescence la Cx43 sur des coupes de tissus cardiaques de patients DM1.

1.2.2. Conséquences physiologiques de la surexpression de Ca_v1.2

Au cours de cette étude, nous avons aussi observé une augmentation de l'expression du principal canal calcium voltage-dépendant cardiaque : Ca_v1.2 (*CACNA1C*). Ce canal permet l'entrée du calcium dans les cardiomyocytes au niveau de la phase 2 du potentiel d'action cardiaque permettant ainsi de prolonger la dépolarisation de la cellule et d'engendrer la contraction des cardiomyocytes. Le Ca²⁺, qui pénètre dans le cardiomyocyte, peut se fixer à la troponine C et induire la contraction musculaire. Par sa fonction permettant l'entrée du Ca²⁺, ce canal Ca_v1.2 joue donc un rôle crucial dans le couplage excitation-contraction du muscle cardiaque. Toutefois, l'augmentation de l'expression de Ca_v1.2 résulterait en une augmentation de l'entrée de Ca²⁺ dans la cellule. Les conséquences physiologiques d'une telle augmentation ne sont pas clairement définies, même s'il est admis que les variations dans l'homéostasie du Ca²⁺ peuvent altérer la fonction cardiaque (Bodi *et al.*, 2005). De plus, des études montrent que l'activité des canaux calciques est augmentée en cas de crises cardiaques (Schroder *et al.*, 1998). Au contraire, une diminution de l'expression de Ca_v1.2 a été mise en évidence dans des cas de fibrillations auriculaires (Brundel *et al.*, 2001 ; Klein *et al.*, 2003). Enfin, en 2004, des mutations du gène codant Ca_v1.2 ont déjà été associées au syndrome de Timothy, celui-ci est caractérisé par des arythmies cardiaques pouvant conduire à une syncope et une mort subite (Splawski *et al.*, 2004). Ces mutations conduisent à une diminution de l'inactivation entraînant une augmentation de l'excitabilité des cellules et à une élongation de l'onde QT donnant le syndrome du QT long (Splawski *et al.*, 2004). Il est intéressant de noter que 22% des patients DM présentent une augmentation de l'onde QT (Petri *et al.*, 2012), suggérant que l'augmentation de l'expression de Ca_v1.2 puisse entraîner une augmentation de l'entrée calcium dans les cardiomyocytes et ainsi retarder la repolarisation de la cellule conduisant une prolongation de l'onde QT chez les patients DM.

1.2.3. Conséquences de la surexpression d'autres cibles de miR-1

Comme exposé précédemment, miR-1 régule de nombreuses cibles impliquées dans le développement et le fonctionnement cardiaques. C'est pourquoi l'analyse d'autres cibles de miR-1 nous permettrait de connaître l'étendue des conséquences de la dérégulation de miR-1 dans le cœur des patients DM. En effet, l'expression d'un important médiateur calcique, la calmoduline (CaM), est régulée par miR-1 (Ikeda *et al.*, 2009). Lors de la contraction du muscle cardiaque, après ouverture des canaux calciques $Ca_v1.2$, le calcium entre dans la cellule, et vient se fixer à la CaM ; celle-ci change de conformation et module le potentiel d'action (PA) des cardiomyocytes en agissant au niveau de plusieurs étapes. Notamment, la CaM lie le principal canal à sodium cardiaque $Na_v1.5$ (*SCN5A*) et régule son activité en empêchant son inactivation, ce qui entraîne une augmentation de l'entrée du sodium dans la cellule (phases 0 et 1 du PA), et donc une augmentation de la dépolarisation de la cellule (Sarhan *et al.*, 2009). De plus, la CaM active aussi la CaMKII qui phosphoryle $Na_v1.5$ et conduit à une augmentation de l'entrée du sodium dans les cardiomyocytes, entraînant à nouveau une augmentation de la dépolarisation de la cellule. De même, la CaMKII phosphoryle les canaux potassiques cardiaques $K_v4.3$ et $K_v1.4$, conduisant à une faible inactivation et donc à une prolongation du PA (Grant, 2009). Enfin, la CaM régule le canal RYR2 (« RYanodine Receptor 2 ») qui permet la sortie de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique, ce qui augmente la concentration en Ca^{2+} intracellulaire et conduit à la contraction musculaire (Sorensen *et al.*, 2013). Récemment, il a été découvert que des mutations de la CaM entraînant la perte de son interaction avec le Ca^{2+} sont associées à des arrêts cardiaques touchant les enfants (Crotti *et al.*, 2013). De plus, des mutations de la CaM, augmentant son interaction avec RYR2 à faible concentration de Ca^{2+} , et conduisant à l'augmentation de l'ouverture de RYR2, sont associées à des tachycardies ventriculaires et à des morts subites (Nyegaard *et al.*, 2012).

La diminution de miR-1 pourrait conduire à une augmentation de la CaM, qui conduirait à une augmentation de l'activation de canaux sodiques, potassiques et calciques responsables du potentiel d'action des cardiomyocytes. De plus, une augmentation de la CaM activerait aussi le canal RYR2, entraînant une sortie de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique et provoquant ainsi des tachycardies ventriculaires et des morts subites, deux événements qui touchent les patients DM. Il serait donc particulièrement intéressant d'analyser l'expression de la CaM dans des échantillons de cœurs de patients DM.

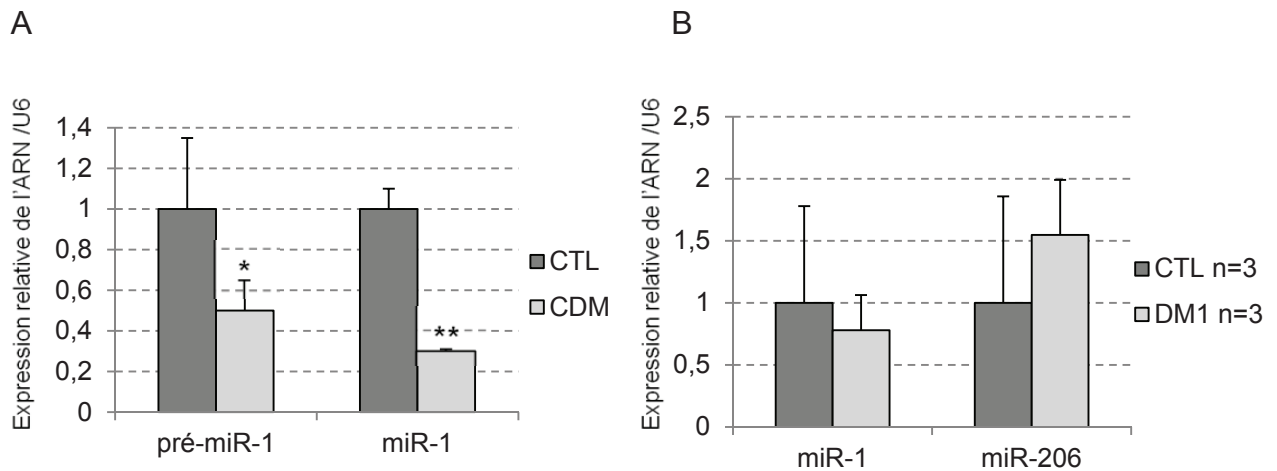


Figure 46 : Expression de pré-miR-1 et miR-1 dans le muscle squelettique de patients DM.

A. Analyse de l'expression de pré-miR-1 et miR-1 par qRT-PCR à partir d'ARN provenant de cultures primaires de cellules musculaires contrôles (CTL) et CDM (CDM).

B. Analyse de l'expression de pré-miR-1 et miR-1 par qRT-PCR à partir d'ARN provenant de muscles squelettiques d'individus adultes non atteints (CTL) et atteints de DM1 (DM1).

Les expressions de pré-miR-1 et miR-1 mature ont été normalisées à l'expression de snARN U6. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,001$, au test de Student.

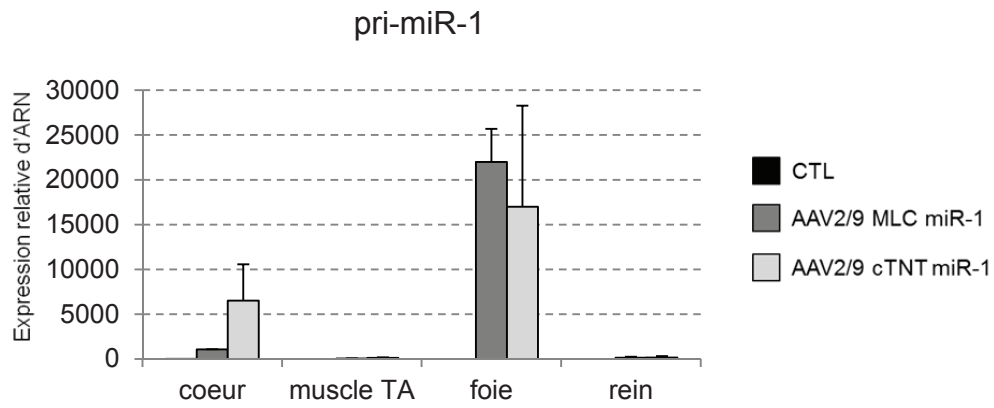
1.3. Variation de miR-1 dans le muscle squelettique de patients DM1

Les miARNs de la famille miR-1 sont spécifiquement exprimés dans le cœur et dans le muscle squelettique, où ils jouent un rôle crucial dans la différenciation (Kwon *et al.*, 2005 ; Chen *et al.*, 2006 ; Kim *et al.*, 2006 ; Mishima *et al.*, 2009 ; Zhang *et al.*, 2012).

L'étude de miR-1 dans des échantillons de cœur de patients DM1 a été initiée grâce à l'analyse de cultures primaires de cellules musculaires de patients CDM. Cette expérience a mis en évidence une diminution de 5 fois de miR-1 mature par rapport aux cultures primaires de cellules musculaires d'individus non atteints (figure 46). Nous nous sommes donc demandé si cette diminution était aussi due à un défaut de maturation de miR-1 comme observée dans le cœur. La quantification par qRT-PCR du pré-miR-1 montre une diminution de son niveau d'expression de deux fois suggérant que la diminution de miR-1 est due à une diminution de la transcription et de la maturation de miR-1. Les cellules musculaires CDM présentent un retard de différenciation par rapport aux cellules musculaires contrôles (Furling *et al.*, 2001a ; Furling *et al.*, 2001b), ce qui pourrait expliquer cette diminution transcriptionnelle de miR-1 (Chen *et al.*, 2006). De plus, l'analyse de l'expression de miR-1 à partir de biopsies de muscles squelettiques de patients DM montre une grande variabilité dans l'expression de miR-1 mature suivant les échantillons, indiquant qu'il est nécessaire d'effectuer cette analyse sur un plus grand nombre d'échantillons (figure 46). Enfin, l'analyse de l'expression de miR-206, un miARN appartenant à la famille de miR-1 mais spécifiquement exprimé dans le muscle squelettique, montre également une grande variabilité d'expression dans les échantillons de muscles squelettiques contrôles et DM1, avec une tendance à l'augmentation chez les patients DM1, comme observé dans une étude précédente (Gambardella *et al.*, 2010).

Concernant les conséquences d'une éventuelle dérégulation de l'expression de miR-1 et/ou miR-206 dans le muscle squelettique de patients DM, il est important de noter que l'inactivation de *miR-1-2* ou de *miR-206* chez la souris ne conduit à aucune altération évidente du phénotype musculaire, suggérant soit que les membres de la famille miR-1 se compensent, soit que ces miARNs ne sont importants que lors de la différenciation des cellules musculaires (Zhao *et al.*, 2007 ; Liu *et al.*, 2012). En effet, miR-1 et miR-206 activent la différenciation des cellules musculaires en réprimant l'expression de l'ADN polymérase alpha, de HDAC4 et de la connexine 43 (Anderson *et al.*, 2006 ; Chen *et al.*, 2006 ; Kim *et al.*, 2006). En corrélation avec ce résultat, il a été montré que les cellules musculaires DM présentent un retard de différenciation (Furling *et al.*, 2001a ; Furling *et al.*, 2001b). Enfin,

A



B

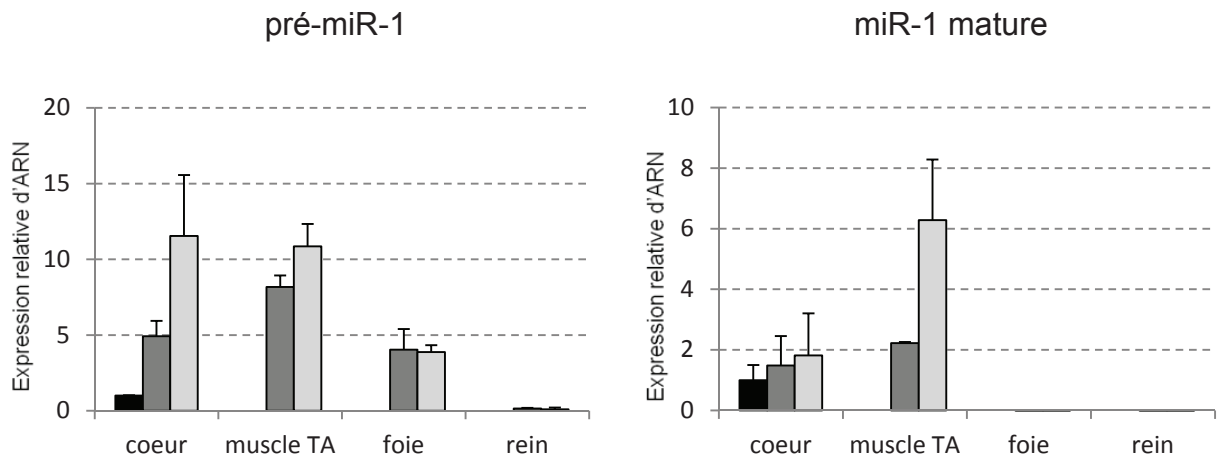


Figure 47 : Expression de miR-1 humain dans des souris via des virus AAV.

A. Analyse de l'expression de pri-miR-1 (A) et de pré-miR-1 et miR-1 (B) par qRT-PCR à partir de souris auxquelles ont été injectés des AAV2/9 exprimant pri-miR-1 humain sous le contrôle du promoteur MLC (AAV2/9 MLC miR-1) ou cTNT (AAV2/9 cTNT miR-1).

Les expressions de pri-miR-1, pré-miR-1 et miR-1 mature sont normalisées par l'expression de snARN U6.

miR-1 et miR-206 régulent l'expression de deux facteurs de transcription Pax3 et Pax7 dans les cellules satellites (Chen *et al.*, 2010 ; Hirai *et al.*, 2010). Les cellules satellites sont des cellules souches présentes dans le muscle squelettique adulte qui régulent le développement post-natal et la régénération du muscle. Ces cellules expriment Pax3 et Pax7 qui sont requis pour la survie, la prolifération et la prévention de la différenciation des cellules myogéniques progénitrices (Oustanina *et al.*, 2004 ; Kuang *et al.*, 2006 ; Buckingham *et al.*, 2007 ; Luo, 2013). Ces cellules satellites sont altérées chez les patients DM (Thornell *et al.*, 2009). Ainsi, l'éventuelle altération de miR-1 ou de miR-206 dans le muscle squelettique des patients DM pourrait engendrer une diminution de Pax3 et Pax7 conduisant à une diminution de la prolifération des cellules satellites chez les patients DM. Il serait donc intéressant de vérifier l'expression des cibles de miR-1 et miR-206 dans les biopsies de patients DM1 et DM2 ainsi que dans les cultures primaires de muscles squelettiques DM.

1.4. miR-1 : une cible thérapeutique ?

Le rôle clé de miR-1 dans la fonction cardiaque suggère que rétablir une expression normale de miR-1 chez les patients DM, pourrait engendrer une diminution de ses cibles, dont la Cx43 et Ca_v1.2, et restaurer ainsi un fonctionnement cardiaque normal. C'est pourquoi, en collaboration avec le Dr Denis Furling, nous avons souhaité tester l'augmentation de miR-1 dans des souris en utilisant des virus de type adéno-associés (AAV). Ceux-ci sont de petits virus à ADN non pathogènes pouvant infecter l'homme et les primates sans provoquer de réponse immunitaire importante. Nous avons alors choisi d'utiliser un AAV2/9 exprimant le pri-miR-1-1 humain sous le contrôle du promoteur MLC (« Myosin Light Chain ») ou du promoteur TNNT2 (« cardiac Troponin T »). Après injection des virus, les expressions du pri-miR-1, du pré-miR-1 et du miR-1 mature humain ont été quantifiées par qRT-PCR (figure 47). Le pré-miR-1 est exprimé fortement dans le cœur, les muscles squelettiques et le foie. Par contre, l'expression de miR-1 mature est détectée dans le cœur, les muscles mais pas dans le foie. Ceci suggère que la maturation du pré-miR-1 est spécifique aux muscles squelettiques et cardiaque, peut-être du fait de la présence de protéines régulatrices spécifiquement exprimées dans ces organes.

En conclusion, l'expression de miR-1 dans le cœur de souris sans affecter d'autres organes est une approche complexe qui demande l'utilisation de virus ayant une biodistribution plus spécifique au muscle cardiaque. Ainsi, l'utilisation de miR-1 comme

agent thérapeutique contre les troubles cardiaques chez les patients DM est clairement une perspective à long terme.

2. Une multitude d'altérations d'épissage dans le cœur de patients DM

Les dystrophies myotoniques sont décrites comme des maladies associées à des altérations de l'épissage alternatif. Ainsi, des altérations de l'épissage du canal chlore (*CLCN1*), de l'amphiphisine 2 (*BINI*) et du canal à calcium voltage-dépendant $Ca_v1.1$ (*CACNA1S*) sont associées aux symptômes de myotonie et de faiblesse musculaire (Charlet *et al.*, 2002 ; Mankodi *et al.*, 2002 ; Fugier *et al.*, 2011, Tang *et al.*, 2012). Toutefois, de nombreux épissages alternatifs ne sont pas associés directement à des signes cliniques, et inversement, des symptômes comme les troubles de la conduction et du rythme cardiaque ne sont pas encore expliqués.

2.1. Découverte de nouvelles altérations d'épissage alternatif

A mon arrivée au laboratoire, à part celle de l'exon 5 de *TNNT2* (*cTNT*), peu d'altérations de l'épissage étaient connues dans le muscle cardiaque des patients DM. C'est pourquoi nous avons entrepris des analyses transcriptomiques à partir d'échantillons de ventricule gauche de patients DM1. Pour ces études, nous avons souhaité utiliser deux techniques différentes : des puces à ADN spécifiques des exons (« GeneChip Human Exon 1.0 ST array ») et le séquençage à haut débit (« Whole Transcriptome Shotgun Sequencing »). L'utilisation de puces spécifiques des exons est classique et permet de mettre en évidence les exons dérégulés d'un groupe d'échantillons (DM1) par rapport à un groupe contrôle. Toutefois, les exons analysés sont des exons bien caractérisés, à partir desquels des sondes spécifiques ont été générées. Il en résulte un biais important, et les exons non connus ou mal annotés, trop petits pour contenir une sonde, les ARN non codants, les rétentions d'introns et les sites de polyadénylation alternatifs ne sont pas analysés. Le séquençage à haut débit est une technique à la fois plus exhaustive et plus fine, car elle permet d'obtenir la séquence et une estimation de la quantité de chaque ARN. La contrepartie étant qu'il s'agit d'une technique onéreuse et que la somme de données générées rend les analyses bioinformatiques difficiles. Ces analyses ont été effectuées en collaboration avec le Dr. Auboeuf (INSERM, Lyon), le Dr. Navratil (PRABI, Villeurbanne) et le Dr Eric Wang (MIT, Cambridge, USA).

Ainsi, plus d'une centaine d'évènements d'altération d'épissage ont été identifiés dans les échantillons de cœurs de patients DM. Certaines de ces cibles (*TNNT2*, *BINI*, *MAPT*, *LDB3*, *MYOMI*) ont déjà été trouvées dérégulées dans d'autres tissus, tels que le muscle squelettique ou le cerveau. Il est important de noter que les échantillons analysés sont des biopsies ventriculaires de personnes atteintes et non atteintes de DM. Ces échantillons sont principalement composés de cardiomyocytes, mais peuvent contenir des cellules conductrices du faisceau de His-Purkinje, des cellules adipeuses et des cellules provenant de tissu fibreux interstitiel.

Je vais décrire ci-dessous succinctement les altérations qui pourraient être associées à des signes cliniques, ce qui me conduira à discuter de l'épissage du canal sodique *SCN5A* et de son rôle potentiel dans les troubles cardiaques des patients DM.

2.2.1. Altérations des protéines de structure

Nous avons identifié de nombreuses altérations de l'épissage alternatif d'ARNm codants des protéines de structure. Ainsi, nous retrouvons dans le muscle cardiaque de patients DM1, des altérations de l'épissage alternatif de Cypher/ZASP1/PDLIM6 (*LDB3*), de PDLIM3 (*PDLIM3*), de la titine (*TTN*), de la myosine (*MYH14*), de la myoméline (*MYOMI*) et de la dystrophine (*DMD*), déjà identifiées dans le muscle squelettique (Nakamori *et al.*, 2007 ; Koebis *et al.*, 2011 ; Rinaldi *et al.*, 2012 ; Yamashita *et al.*, 2012). Mais nous retrouvons aussi des altérations de l'épissage de la protéine TAU (*MAPT*) précédemment identifiée dans le cerveau de patient DM (Sergeant *et al.*, 2001 ; Leroy *et al.*, 2006 ; Dhaenens *et al.*, 2008). Nous identifions aussi de nouvelles altérations, notamment dans les ARNm *MYH11*, *ABLIM1*, *PDLIM5*, *ANK3*, *ADD3*, *CLASP*, *SUN1* et *SUN2*.

Ces protéines structurent les cellules musculaires et permettent le fonctionnement des unités contractiles musculaires. Par conséquent, des altérations de ces protéines pourraient contribuer aux atteintes du muscle squelettique et cardiaque des patients DM. On a ainsi identifié des altérations de l'épissage de la myoméline, qui est une protéine reliant les filaments de myosine en faisceau ; de la dystrophine, qui est une protéine sub-sarcolemmique qui maintient l'architecture des fibres musculaires en servant de point d'ancrage aux protéines extra- et intracellulaires ; de la titine, qui permet l'assemblage des protéines de structures des sarcomères ; et de *ABLIM1*, fortement exprimée au niveau du cœur, du cerveau, des muscles squelettiques, et qui régule les interactions entre les filaments d'actines (Roof *et al.*, 1997). De même, des altérations de l'épissage de la famille des protéines PDLIM : *PDLIM3* (ALP),

PDLIM5 et *LDB3* (Cypher/ *ZASP1*/ *PDLIM6*) pourraient conduire à une désorganisation des myofibrilles des cardiomyocytes et altérer la fonction cardiaque. En effet, des mutations de *ZASP1*, composant majeur des disques Z des sarcomères cardiaques désorganisent la structure de la myofibrille et diminuent le courant ionique de *SCN5A*, ce qui conduit à des défauts de conduction cardiaques ventriculaires (Xi *et al.*, 2012). L'adducine 3 (*ADD3*) est une protéine du cytosquelette, dont certaines mutations sont associées à de nombreux troubles notamment des troubles de diastole des ventricules et de l'hypertension (Bianchi, 2005 ; Kuznetsova *et al.*, 2006). L'ankyrine G (*ANK3*) est indispensable à la localisation membranaire et au fonctionnement de *SCN5A* (Lowe *et al.*, 2008), et des mutations de *SCN5A* abolissant l'interaction avec l'ankyrine G sont associées au syndrome de Brugada (Mohler *et al.*, 2004). On peut alors émettre l'hypothèse qu'une altération d'épissage de *ANK3* touchant le domaine de liaison à *SCN5A* pourrait contribuer aux défauts cardiaques des patients DM.

Notons que nous avons aussi identifié des altérations de l'épissage des ARNm codants les protéines *CLASP* et *NUMA1*, qui interagissent et régulent la stabilité des microtubules, suggérant ainsi un lien fonctionnel possible avec la protéine *TAU*, et une dérégulation des microtubules chez les patients DM.

Enfin, une dérégulation de l'épissage alternatif de *SUN1* et *SUN2* est prédite par les analyses bio-informatiques. *SUN1* et *SUN2* sont des composants majeurs du complexe LINC (« LInker Nucleoskeleton Cytoskeleton ») qui lie le cytosquelette au nucléosquelette composé notamment de lamine A (*LMNA*), et régule le positionnement du noyau dans la cellule (Chen *et al.*, 2012 ; Liu, 2012). Récemment, il a été montré que la délétion de *Sun1* chez la souris *Lmna*^{-/-} restaure une morphologie nucléaire normale (Chen *et al.*, 2012). Au contraire la déplétion de *Sun2* chez la souris conduit à des noyaux anormaux et centraux dans les fibres musculaires (Lei *et al.*, 2009). Une des caractéristiques histopathologiques du muscle squelettique des patients DM est la présence de noyaux centraux (Brooke and Engel, 1969 ; Schroder and Adam, 1968). Ainsi, l'analyse de l'épissage, de la localisation et de la quantité des protéines *SUN1* et *SUN2* dans des biopsies de patients DM indiquerait si ces protéines sont impliquées dans le positionnement anormal des noyaux des fibres musculaires.

2.2.2. Altérations des protéines de signalisation cellulaire

Des protéines telles que l'epsine 2 (*EPN2*) qui régule la vascularisation, montrent aussi un épissage altéré chez les patients DM, indiquant que les échantillons cardiaques sont constitués de nombreux types cellulaires autres que les cardiomyocytes. *DIDO1* qui régule

l'apoptose est aussi prédit comme altéré chez les patients DM. De même, SLITRK2, une protéine de guidage des neurones est aussi identifiée et évoque les altérations de différenciation de motoneurones dérivés de cellules ES de patients DM (Marteyn *et al.*, 2011). ARVCF (« Armadillo Repeat gene deleted in VeloCardioFacial syndrome ») est une protéine de la famille des caténines qui pourrait jouer un rôle dans l'adhésion cellulaire et serait impliqué dans le syndrome velocardiofacial, qui associe une dysmorphie faciale plus ou moins marquée à une cardiopathie. Une cible qui pourrait aussi être intéressante est SOCS7 (« Suppressor Of Cytokine Signaling 7 »), impliquée dans l'homéostasie du glucose (Banks *et al.*, 2005 ; Capuano *et al.*, 2013). Il serait donc intéressant de tester si l'altération de l'épissage SOCS7 pourrait contribuer à la résistance à l'insuline observée chez les patients DM. Enfin, les patients DM présentent une exclusion des exons 18, 19 et 20 de l'ARNm de la protéine kinase à serine/thréonine, CaMKII β (« Calcium/Calmodulin-dependent protein Kinase II Beta »). Cette kinase joue un rôle important dans la régulation des échanges calciques dans le cerveau et les muscles (van Woerden *et al.*, 2009). De plus, suite à son activation par la calmoduline liée au calcium, la CaMKII β s'oligodimérise et régule par phosphorylation les canaux CACNA1C, SCN5A et RYR2, ce qui augmente le passage des ions calcium et sodium (Rokita and Anderson, 2012). Ainsi la dérégulation de l'épissage alternatif des exons 18, 19 et 20, codant pour son domaine d'oligomérisation, pourrait contribuer à une altération du métabolisme calcique chez les patients DM.

2.2.3. Altérations d'épissage des facteurs de transcription ou d'épissage

Des facteurs de transcription spécifiques des muscles squelettiques et cardiaque, tels que la myocardine (MYOCD), MBD2, MEAF6, NCOR2 et MEF2D, présentent aussi des dérégulations de leur épissage alternatif. MEF2D est particulièrement intéressant car la régulation de l'épissage alternatif des exons mutuellement exclusifs $\alpha 1$ et $\alpha 2$ conduit à des isoformes possédant des activités opposées sur la différenciation des cellules musculaires (Sebastian *et al.*, 2013). En effet, MEF2D contenant l'exon $\alpha 1$ est phosphorylé par la PKA, conduisant à une forme de MEF2D qui inhibe la transcription de nombreux gènes responsables de la différenciation musculaire, tandis que MEF2D contenant l'exon $\alpha 2$ n'est pas régulé par la PKA et active la transcription et la différenciation musculaires (Sebastian *et al.*, 2013). Ainsi, l'altération de l'épissage alternatif des exons $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de MEF2D pourrait conduire à un retard de la différenciation musculaire chez les patients DM. Des analyses de l'épissage de *MEF2D* ainsi que de l'expression des gènes régulés par MEF2D $\alpha 1$ ou

MEF2D α 2 dans des cellules et des biopsies musculaires de patients DM pourraient donc être particulièrement instructives.

Enfin, nous avons observé des altérations déjà connues de l'épissage de *MBNL1* et *MBNL2* (Tran *et al.*, 2011), mais aussi identifié pour la première fois une dérégulation de l'épissage de *CUGBP1*, dont l'expression est augmentée dans des échantillons de cœur de patients DM1 (Philips *et al.*, 1998). Il serait intéressant de poursuivre l'étude de cette altération d'épissage pour identifier si elle contribue à l'augmentation de l'expression de la *CUGBP1*.

2.2.4. Régulation par *MBNL1* ou *CUGBP1* et retour aux isoformes fœtales

Les expansions de répétitions CUG et CCUG agissent sur l'épissage alternatif *via* la séquestration des protéines MBNL et une augmentation de la protéine *CUGBP1*. Toutefois des résultats sur des minigènes en modèle cellulaire (Dansithong *et al.*, 2005) et des analyses transcriptomiques de modèles murins (Du *et al.*, 2010 ; Charizanis *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2012) suggèrent que la perte de l'activité des protéines MBNL serait déterminante comparée à l'augmentation de la *CUGBP1*. Il nous apparaissait donc intéressant de vérifier si des sites de liaisons pour les protéines MBNL et *CUGBP1* pouvaient être présents autour des exons altérés chez les patients DM. L'analyse bioinformatique des motifs ARN enrichis dans et autour des exons dérégulés dans les échantillons cardiaques de patients DM montre que les séquences les plus souvent retrouvées contiennent des motifs UGC et CGC, mais pas de motifs UGU. Nos données, obtenues chez des patients, confirment donc les résultats obtenus en modèles cellulaires et murins, c'est à dire que la perte de MBNL serait déterminante pour les altérations de l'épissage alternatif, alors que l'augmentation de *CUGBP1* ne contribuerait qu'à un nombre limité d'altérations de l'épissage. Ce modèle est appuyé par des expériences de surexpression de *MBNL1* qui corrige la myotonie dans des souris HSA^{LR} exprimant des répétitions CUG (Kanadia *et al.*, 2006).

Enfin, de nombreux épissages alternatifs dérégulés chez les patients DM apparaissent comme des formes d'épissage fœtales. Ainsi l'exon 5 de *cTNT* (Ryan *et al.*, 1996 ; Philips *et al.*, 1998), l'exon 3 de *MAPT* (Sergeant *et al.*, 2001), l'exon 6A de *SCN5A* (Murphy *et al.*, 2012), l'exon 29 de *CACNAIS* (Tang *et al.*, 2012), l'exon 11 de *BINI* (Fugier *et al.*, 2011) sont des exons régulés lors du développement. Ce retour à l'état fœtal observé dans des modèles murins de la DM (Charizanis *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2012) est confirmé par notre analyse d'échantillons de cœur de patients DM1. Ces résultats pourraient s'expliquer par une

augmentation de l'expression de MBNL1 et MBNL2 au cours du développement. Ainsi, les patients DM, qui présentent une séquestration de MBNL, reproduiraient les conditions fœtales où les quantités de MBNL1 et MBNL2 sont faibles.

Pour conclure, l'analyse du transcriptome cardiaque des patients DM a révélé un enrichissement en sites de liaison pour MBNL et non pour CUGBP1, ainsi que la dérégulation de nombreux gènes, tels que *SCN5A* dont le rôle majeur dans le rythme cardiaque est décrit dans la suite de ce manuscrit. Enfin, la contribution de l'épissage d'autres ARNm, notamment au niveau du retard de différenciation des cellules musculaires et de la résistance à l'insuline des patients DM reste à déterminer.

2.2. Causes et conséquences d'une dérégulation de l'épissage de *SCN5A*

Parmi les événements d'épissage modifiés chez les patients DM, nous avons mis en évidence une dérégulation de l'inclusion des exons mutuellement exclusifs 6A et 6B de *SCN5A*. L'inclusion anormale de l'exon 6A (isoforme fœtale), qui remplace l'inclusion de l'exon 6B (isoforme adulte) dans les autopsies de cœurs de patients DM1 a alors été confirmée dans un plus grand nombre d'échantillons cardiaques de patients CDM, DM1 et DM2. Enfin et comme de nombreux ARNm chez les patients DM, l'ARNm *SCN5A* montre un profil d'épissage alternatif fœtal.

Le rôle clé de *SCN5A* dans la conduction cardiaque en fait un excellent candidat pour contribuer aux troubles cardiaques des patients DM. En effet, le gène *SCN5A* code pour la sous-unité α du principal canal sodique cardiaque, $Na_v1.5$. Ce canal permet l'entrée du sodium et l'initiation du potentiel d'action des cardiomyocytes provoquant la contraction du muscle cardiaque. L'inactivation du gène *Scn5a* chez la souris est létale à l'état embryonnaire (Papadatos *et al.*, 2001), et des mutations de *SCN5A* chez l'homme conduisent à des troubles de la conduction cardiaque et à des arythmies, qui se rapprochent de ceux observés chez les patients DM (Wahbi *et al.*, 2009 ; Rudnik-Schöneborn *et al.*, 2010).

A partir de ces résultats, nous avons entrepris d'étudier les causes moléculaires de l'altération de l'épissage des exons 6A/6B de *SCN5A* chez les patients DM.

2.2.1. L'épissage des exons 6A et 6B de *SCN5A* est régulé par MBNL1

MBNL1 et CUGBP1 sont connus comme étant deux facteurs régulant l'épissage alternatif de façon antagoniste. Plusieurs études ont montré que le niveau d'expression de

CUGBP1 est augmenté chez les patients atteints de DM1, tandis qu'il est encore discuté chez les patients atteints de DM2 (Roberts *et al.*, 1997 ; Savkur *et al.*, 2001 ; Timchenko *et al.*, 2001 ; Wang *et al.*, 2007). L'analyse de la séquence de *SCN5A* montre la présence de motifs UGU, pouvant être reconnu par CUGBP1, dans la séquence des introns 5, 6A et 6B de *SCN5A*, suggérant que CUGBP1 pourrait réguler l'inclusion de ces exons. C'est pourquoi nous avons souhaité tester l'implication de CUGBP1 dans la régulation de l'épissage des exons 6A/6B de *SCN5A* endogène. La surexpression et la déplétion de CUGBP1 dans des cultures primaires de cellules musculaires contrôles exprimant *SCN5A* de manière endogène n'ont pas modifié le profil d'inclusion ou d'exclusion des exons 6A et 6B suggérant que CUGBP1 ne régule pas leur épissage alternatif. Ainsi, ces résultats, couplés à l'absence de surexpression de CUGBP1 chez les DM2, indiquent que CUGBP1 n'est probablement pas un régulateur de l'épissage des exons 6A/6B de *SCN5A*.

Au contraire, nous avons montré que l'épissage alternatif des exons 6A/6B est régulé par MBNL1 (cf. résultats). En effet, la diminution de l'inclusion de l'exon 6B dans des cultures primaires de muscles squelettiques déplétées en *MBNL1* par siARN, ainsi que l'interaction de MBNL1 à une séquence située dans l'intron 5 de *SCN5A* (cf. résultats) démontrent que MBNL1 régule l'épissage alternatif des exons 6A/6B de *SCN5A*. Toutefois, le mécanisme d'action précis de MBNL1 reste à déterminer. Dans le cas d'exons cassettes, les protéines MBNL sont classiquement activatrices de l'inclusion d'un exon quand elles se fixent en aval de cet exon ; et répressives de l'inclusion d'un exon quand elles se fixent en amont de cet exon (Charizanis *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2012 ; Han *et al.*, 2013). Ainsi, MBNL1 se lie en amont de l'exon 5 de *hcTNT* et empêche la reconnaissance de cet exon par U2AF65 (Ho *et al.*, 2004 ; Warf *et al.*, 2009). Cependant, dans le cas des exons mutuellement exclusifs 6A/6B de *SCN5A*, le site de liaison de MBNL1 se situe 20 nucléotides en aval du site 5' d'épissage de l'exon 5 de *SCN5A* et à plus de 6 kb des exons 6A et 6B. Cette observation souligne la complexité de la régulation des exons mutuellement exclusifs et montre que des expériences d'épissage *in cellulo* et *in vitro* sont nécessaires pour approfondir notre connaissance des mécanismes moléculaires d'action de MBNL1.

Signalons aussi que notre étude n'écarte pas la possibilité d'une régulation de *SCN5A* par un autre membre de la famille MBNL, tel que MBNL2 qui est fortement exprimé dans le cœur (Kanadia *et al.*, 2003b).

Enfin, l'épissage alternatif des exons 6A/6B de *SCN5A* est régulé au cours du développement cardiaque chez l'homme, la souris et le rat (Murphy *et al.*, 2012). Nous avons donc cherché à savoir si la régulation de l'épissage des exons 6A/6B par MBNL1 est

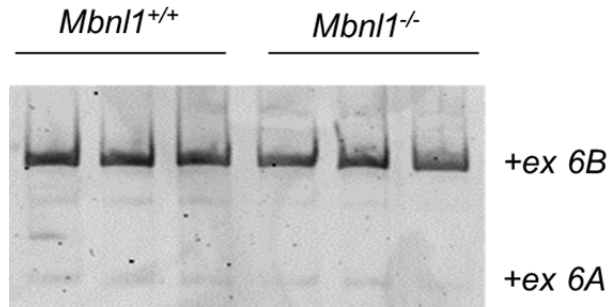


Figure 48: Epissage alternatif des exons 6A/6B de *Scn5a* dans des cœurs de souris *Mbn1*^{-/-}.

Analyse de l'épissage alternatif des exons 6A/6B de *Scn5a* par RT-PCR à partir d'ARN total de muscle cardiaque utilisant les oligonucléotides s'hybridant à l'exon 5 (FW : TCTGGTCAAGATTCTAGCTCGAG) et à l'exon 7 (REV : AGTAAGGACCATCACATCGGCTA) de *Scn5a*. Les produits PCR obtenus sont soumis à une digestion par l'enzyme *Bst*BI puis sont séparés sur gel polyacrylamide 6% non dénaturant.

conservée chez d'autres espèces. Toutefois, nous n'avons pas trouvé de motifs UGC en aval du site 5' d'épissage de l'exon 5 de *Scn5a* chez la souris et le rat. De plus, nous n'avons pas observé d'altérations du profil d'épissage des exons 6A/6B de *Scn5a* dans des échantillons de cœurs de souris invalidées pour *Mbnl1* (figure 48). Ces résultats rappellent l'analyse de l'épissage de l'exon 11 de *BINI* et de l'exon 5 de *cTNT*, qui possèdent des motifs de liaison à MBNL1 chez l'homme et non chez la souris, et qui sont ainsi régulés spécifiquement chez l'homme (Phillips *et al.*, 1998 ; Fugier *et al.*, 2011). Ces résultats suggèrent donc l'hypothèse d'une régulation de *SCN5A* par MBNL1 spécifique à l'homme.

Ayant déterminé que MBNL1 régule l'épissage des exons 6A et 6B de *SCN5A* et donc que la séquestration de MBNL1 chez les patients DM pourrait expliquer la perte de l'exon 6B au profit de l'exon 6A, nous avons alors étudié quelles pourraient être les conséquences physiologiques de la dérégulation de l'épissage alternatif de *SCN5A*.

2.2.2. Les propriétés de *SCN5A* différent selon l'exon 6A ou 6B

Les propriétés électrophysiologiques des formes de *SCN5A* contenant soit l'exon 6A soit l'exon 6B ont été déterminées par des expériences de patch clamp en collaboration avec l'équipe du Dr. Zimmer (Jena, Allemagne). La mesure du courant global montre que l'isoforme de *SCN5A* exprimée chez les patients DM et contenant l'exon 6A est moins active que l'isoforme de *SCN5A* contenant l'exon adulte 6B (cf. résultats). L'analyse de la courbe d'activation à l'état stationnaire montre un décalage positif de +7 mV pour le canal contenant l'exon 6A comparé au canal exprimant l'exon 6B, indiquant que la forme d'épissage exprimée chez les patients DM est moins sensible au voltage d'environ 7 mV. Ces résultats sont confirmés par trois études distinctes, qui montrent un retard d'activation allant de +7 à +10 mV du canal contenant l'exon 6A comparé à l'isoforme contenant l'exon 6B (Onkal *et al.*, 2008 ; Walzik *et al.*, 2011 ; Murphy *et al.*, 2012). Ces résultats montrent que le canal *SCN5A* composé de l'exon 6A fœtal possède une cinétique d'activation plus lente que le canal composé de l'exon 6B adulte.

Il est à noter que le profil d'épissage des exons 6A/6B de *SCN5A* chez les patients DM1 et DM2 montre un mélange d'expression des deux formes d'épissage, avec environ 50% d'ARNm *SCN5A* contenant l'exon 6A et 50% d'ARNm *SCN5A* contenant l'exon 6B. Nous avons donc étudié quelles seraient les conséquences électrophysiologiques de l'expression d'un mélange d'isoformes *SCN5A*. Ainsi, l'expression de *SCN5A* contenant l'exon 6A avec l'isoforme *SCN5A* contenant l'exon 6B résulte en un décalage de l'activation, non pas de 7

mV, mais de +3,5 mV (cf. résultats). Il s'agit d'un résultat significatif car des mutations de *SCN5A* responsables de troubles cardiaques peuvent présenter un décalage de la même intensité, démontrant ainsi que la forme de *SCN5A* exprimée chez les patients DM est une forme moins active.

Afin de comprendre comment les exons 6A ou 6B peuvent modifier les propriétés électrophysiologiques de *SCN5A*, il est important de rappeler que ces exons codent pour la région contenant le segment S4, qui est la partie du domaine I sensible au voltage du canal *SCN5A*. Les exons 6A et 6B diffèrent par 7 acides aminés qui constituent sept sites susceptibles d'altérer la cinétique d'activation de l'isoforme *SCN5A* exon 6A par rapport à la forme exprimant l'exon 6B. Cependant, la substitution de l'acide aspartique chargé négativement de l'exon 6B par une lysine chargée positivement (D211K) dans l'exon 6A est une position particulièrement intéressante. En effet, une étude a montré que la seule mutation de la lysine K211 en aspartate D211 dans l'isoforme *SCN5A* exon 6A modifie la cinétique d'activation du canal, qui présente alors la même cinétique que l'isoforme adulte *SCN5A* contenant l'exon 6B (Onkal *et al.*, 2008). De plus, cet acide aspartique présent dans la boucle reliant S3DI à S4DI est conservé chez la souris et le rat, ainsi que dans les canaux neuronaux $Na_v1.2$ et $Na_v1.3$ (Sarao *et al.*, 1991 ; Gustafson *et al.*, 1993). Ces résultats confirment que l'acide aspartique D211 joue un rôle clé au niveau de l'activation du canal *SCN5A*.

2.2.3. Conséquences de l'expression du canal *SCN5A* contenant l'exon 6A

Des mutations de *SCN5A* conduisent à des troubles de la conduction cardiaque et à des arythmies, qui se rapprochent de ceux observés chez les patients DM (Wahbi *et al.*, 2009 ; Rudnik-Schöneborn *et al.*, 2010). Notamment, plus de cent mutations du gène *SCN5A* sont associées au syndrome de Brugada. Ces mutations « perte de fonction » altèrent soit l'activation du canal soit la capacité d'inactivation du canal, réduisant le courant sodique entrant (Wilde and Brugada, 2011 ; Lippi, 2012). Dans le cas de l'inclusion de l'exon 6A fœtal à la place de l'exon 6B adulte de *SCN5A*, nous avons observé une diminution de l'activation du canal entraînant une diminution du courant sodique entrant ; cette diminution s'apparente à une perte de fonction, qui rappelle celle observée pour les mutations responsables du syndrome de Brugada. De façon intéressante, la prévalence du syndrome de Brugada est quatre-vingt fois plus élevée chez les patients DM1 que dans la population normale (Wahbi *et al.*, Poster G013 *Archives of Cardiovascular Diseases*, Volume 102, March, 2009, p. S66). Il

est tentant de suggérer que l'expression du canal SCN5A exprimant l'exon 6A dans le cœur adulte puisse conduire au syndrome de Brugada observé chez les patients DM.

De même, de nombreuses mutations « perte de fonction » de *SCN5A* sont aussi associées à des troubles de la conduction cardiaque et notamment au syndrome de Lev-Lenègre (aussi appelé CCD pour « Cardiac Conduction Disease »). Ces maladies sont définies comme une prolongation des paramètres de conduction dans le système de conduction His-Purkinje avec une prolongation de l'intervalle PR et un élargissement du complexe QRS sans élévation du segment ST ou de prolongation de l'intervalle QT sur l'électrocardiogramme. Il est intéressant de noter que les patients atteints de DM présentent des troubles de la conduction cardiaque caractérisés par une élongation de l'intervalle PR et un élargissement du complexe QRS. Ainsi, l'expression du canal sodique fœtal, qui peut être considérée comme l'expression d'une forme moins active de *SCN5A*, pourrait être à l'origine des troubles de conduction cardiaque des patients DM. Il est aussi intéressant de noter qu'une même mutation de *SCN5A* peut être à l'origine du syndrome de Lev-Lenègre chez un patient et du syndrome de Brugada chez un autre patient (Schott *et al.*, 1999), et que les patients DM peuvent présenter à la fois un retard de la conduction cardiaque et un syndrome de Brugada.

Enfin, on peut remarquer que la fréquence et la sévérité des symptômes cardiaques sont plus importantes chez certains patients DM1 que chez les patients DM2 et que l'altération de l'épissage alternatif des exons 6A/6B de *SCN5A* observée est plus importante chez les patients DM1 que chez les patients DM2. L'analyse d'un nombre plus important d'échantillons cardiaques de patients DM, nous permettrait de confirmer une corrélation entre le degré de la dérégulation de l'épissage alternatif des exons 6A/6B de *SCN5A* et la sévérité des symptômes cardiaques des patients DM.

En conclusion, mes résultats de thèse suggèrent que l'expression du canal sodique fœtal pourrait conduire aux troubles de la conduction cardiaque ou/et au syndrome de Brugada observés chez les patients DM.

2.2.4. Perspectives : génération de modèles animaux

L'absence de conservation de la régulation de *SCN5A* par *MBNL1* chez la souris exclut la possibilité d'étudier l'expression de l'exon 6A chez des souris *Mbnl1*^{-/-}. De plus, compte tenu du nombre important d'altérations d'épissage observées dans les échantillons de cœur de patient DM, il est essentiel de déterminer l'effet de l'expression de l'exon 6A dans le cœur adulte d'un modèle animal.

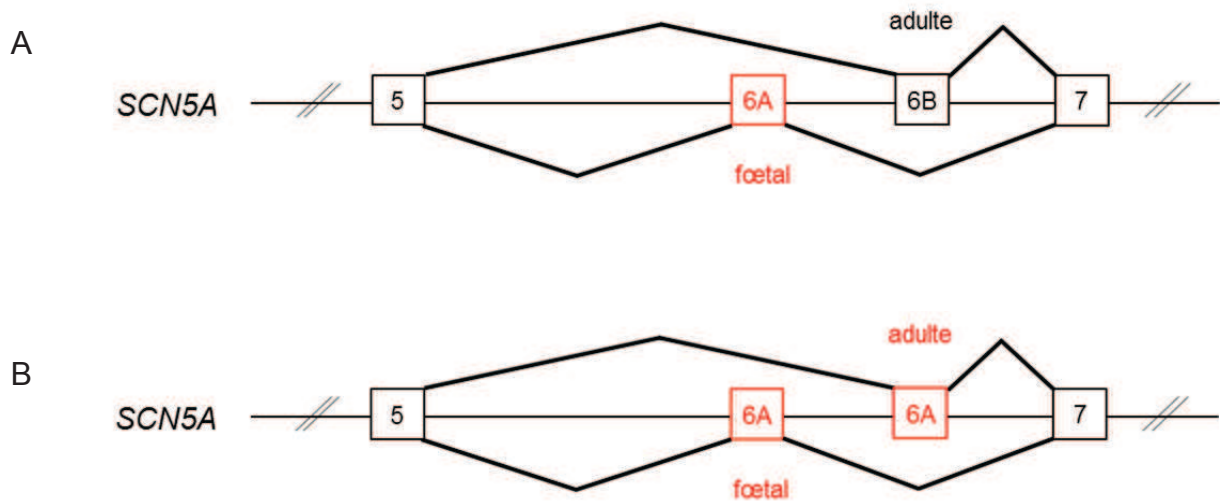


Figure 49: Transgène permettant l'expression de l'exon 6A de *Scn5a* au stade adulte dans un modèle animal.

A. Animal sauvage exprimant l'exon 6B au stage adulte.

B. Animal transgénique exprimant l'exon 6A foetal au stade adulte.

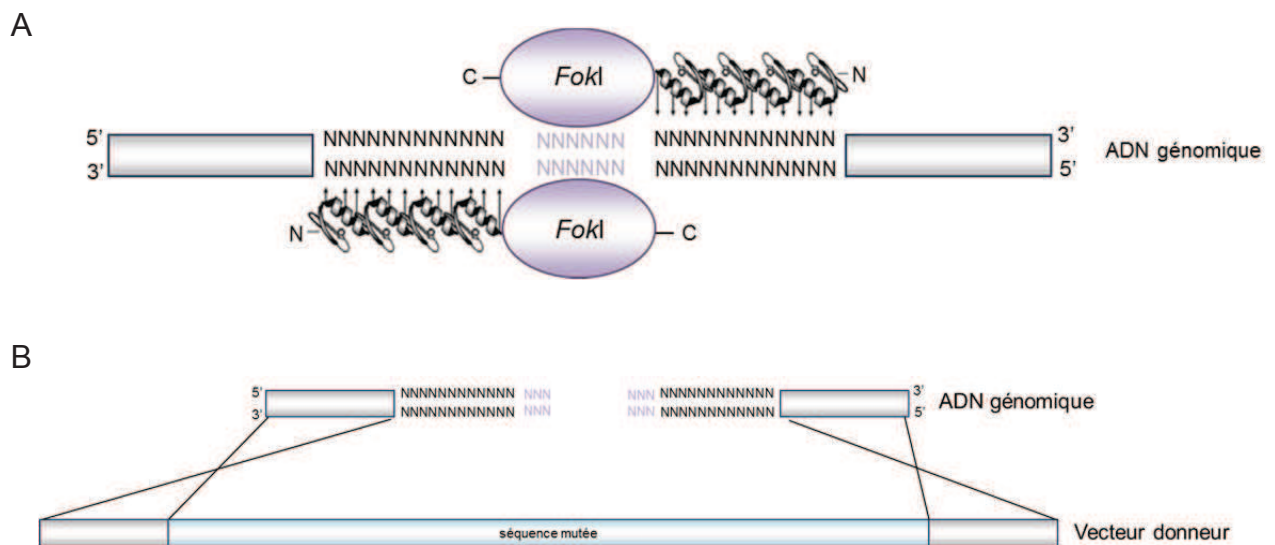


Figure 50: Transgène par la stratégie Zinc Finger Nuclease.

(adapté de Cui et al., 2011)

A. La nucléase *FokI* se dimérise au niveau de l'ADN génomique (nucléotides en noir) dont la spécificité de fixation est apportée par les domaines de fixation à l'ADN (domaine à doigts de zinc).

B. Le clivage par *FokI* favorise la recombinaison homologue entre l'ADN génomique clivé et le vecteur donneur contenant la séquence mutée.

C'est pourquoi nous souhaitons générer un modèle murin qui exprime le canal SCN5A fœtal, c'est à dire exprimant l'exon 6A, au stade adulte. Pour cela, nous avons construit un transgène dans lequel la séquence codante de l'exon 6B est remplacée par la séquence de l'exon 6A (figure 49). Ainsi, au cours du développement, quel que soit l'exon inclus, il codera pour la séquence de l'exon 6A. Les patients DM présentent environ 50% d'inclusion de l'exon 6A et 50% de l'exon 6B. C'est pourquoi, l'étude du phénotype cardiaque de souris hétérozygotes $Scn5a^{\text{exon 6A} / \text{exon 6B}}$ adultes possédant la même proportion de canaux fœtaux que les patients DM1 ou DM2 mettrait en évidence l'impact de l'altération de l'épissage de *SCN5A* dans le phénotype cardiaque des patients DM.

En parallèle, la génération d'un rat transgénique exprimant l'isoforme fœtale du canal sodique SCN5A dans un cœur adulte est aussi en cours. L'obtention d'un rat transgénique fait appel à la stratégie ZFN (« Zinc Finger Nuclease ») liée à la nucléase *FokI*, qui permet un clivage spécifique du génome, et une recombinaison homologue entre le vecteur donneur comportant la mutation souhaitée et le génome clivé (figure 50) (Cui *et al.*, 2011). L'étude du phénotype du rat pourrait s'avérer plus fructueuse qu'un modèle souris. En effet, la proportion des différents canaux cardiaques montre que SCN5A représente 92% des canaux cardiaques chez le rat contre 70% chez la souris (Blechsmidt, 2008). De plus, la fréquence cardiaque du rat adulte est relativement plus proche de l'homme que celle de la souris à raison de 70 battements par minute pour l'homme, 250 pour le rat, et 500 à 600 pour la souris. Enfin, le cœur de rat est 3 fois plus gros que celui de souris, facilitant ainsi l'étude sur ce modèle.

En conclusion, l'analyse du phénotype cardiaque de ces deux modèles animaux devrait nous apporter des informations supplémentaires sur la contribution de l'altération de l'épissage des exons 6A/6B de *SCN5A* dans le phénotype cardiaque des patients DM.

CONCLUSION

Durant ma thèse, nous avons mis en évidence de nombreuses altérations de l'expression d'ARNm et d'ARN non codants dans des échantillons de cœurs de patients atteints de DM. Parmi celles-ci, je me suis plus particulièrement intéressée à deux ARNs, *miR-1* et *SCN5A*, jouant un rôle majeur dans le développement et le fonctionnement cardiaques.

Premièrement, nous avons montré que la séquestration de MBNL1 par les répétitions CUG ou CCUG inhibe la maturation de miR-1. De plus, nous avons mis en évidence une régulation antagoniste des protéines MBNL1 et LIN28 dans la maturation de miR-1 : MBNL1 protège miR-1 de l'inhibition de sa biogenèse par la voie LIN28/TUT-4. La diminution de miR-1 dans le cœur des patients DM entraîne une augmentation de deux protéines, essentielles au fonctionnement cardiaque, la connexine 43 (*GJA1*) et le canal calcique Ca_v1.2 (*CACNA1C*). L'étude de l'altération de la maturation de miR-1 et de la surexpression de la connexine 43 et du canal calcique Ca_v1.2 dans des modèles murins nous permettrait de confirmer leur participation dans les troubles cardiaques des patients DM.

Puis, je me suis intéressée à l'altération de l'épissage alternatif des exons 6A/6B de *SCN5A*. Ce gène code pour la sous-unité α du principal canal sodique cardiaque et des mutations « perte de fonction » de ce canal sont associées à des troubles de la conduction cardiaque et au syndrome de Brugada. J'ai confirmé l'altération de l'épissage des exons 6A et 6B dans des échantillons de cœurs de patients CDM, DM1 et DM2. Nous avons alors montré que l'épissage alternatif de ces exons mutuellement exclusifs est régulé par MBNL1. Enfin, l'inclusion anormale de l'exon 6A fœtal à la place de l'exon 6B adulte conduit à une diminution de l'activité du canal s'apparentant à une perte de fonction du canal. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'expression de *SCN5A* contenant l'exon 6A chez les patients DM pourrait contribuer aux défauts de conduction et aux arythmies cardiaques observés chez ces patients. L'étude du phénotype cardiaque de modèles animaux exprimant le canal *SCN5A* contenant l'exon 6A dans un cœur adulte nous permettrait de confirmer le rôle de cette dérégulation dans l'apparition des symptômes cardiaques chez les patients DM.

ANNEXE 1

Publication 3:

Sequestration of DROSHA and DGCR8 by expanded CGG RNA repeats alters microRNA processing in fragile X-associated tremor/ ataxia syndrome

Chantal Sellier, Fernande Freyermuth, Ricardo Tabet, Tuan Tran, Fang He, Frank Ruffenach, Violaine Alumni, Hervé Moine, Christelle Thibault, Adeline Page, Flora Tassone, Rob Willemsen, Matthew Disney, Paul Hagerman, Peter Todd, Nicolas Charlet-Berguerand.

Cell Reports

Accepté le 2 février 2013

Paru le 7 mars 2013

Le syndrome d'ataxie et de tremblement lié au chromosome X (FXTAS) est une maladie neurodégénérative qui affecte principalement des hommes âgés de plus de 50 ans ; ceux-ci développent des tremblements intentionnels, une ataxie cérébelleuse (trouble de la coordination des mouvements), des symptômes parkinsoniens et une neuropathie périphérique sensitive (Jacquemont *et al.*, 2003). FXTAS est due à une expansion intermédiaire (entre 50 et 200) de répétitions CGG situées dans la région 5'UTR du gène *FMRI* (Hagerman and Hagerman, 2001).

Les neurones et les astrocytes de patients FXTAS présentent des inclusions intranucléaires, qui sont ubiquitinylées et contiennent l'ARNm mutant de *FMRI* (Greco *et al.*, 2002, Tassone *et al.*, 2004). L'étude de modèles animaux montre que l'expression d'ARN contenant des répétitions CGG est suffisante pour reproduire les symptômes de cette maladie (Van Dam *et al.*, 2005 ; Hashem *et al.*, 2009). Ces transcrits s'accumulent sous forme d'agrégats nucléaires qui recrutent différentes protéines liant l'ARN, telles que SAM68, Pura, hnRNP A2/B1 et CUGBP1 (Tassone *et al.*, 2004 ; Iwahashi *et al.*, 2006 ; Jin *et al.*, 2007 ; Sofola *et al.*, 2007 ; Sellier *et al.* 2010). Toutefois, le recrutement de ces protéines ne peut expliquer les symptômes observés chez les patients FXTAS.

L'article qui suit, montre que les répétitions CGG séquestrent le complexe DROSHA-DGCR8 *in vitro*, *in cellulo* et dans des coupes de cerveau de patients FXTAS. Cette séquestration diminue la quantité du complexe DROSHA-DGCR8 libre et inhibe donc la maturation des pri-miARN en pré-miARN, ce qui conduit à une diminution globale de l'expression des miARNs matures et à une mort neuronale (Sellier, Freyermuth *et al.*, 2013). Ma contribution à ce travail fut de montrer par des expériences *in vitro*, l'interaction spécifique de DGCR8 avec les ARNs contenant les répétitions CGG de taille pathogénique (CGG60x et CGG100x). De plus, l'affinité de DGCR8 pour les ARNs contenant ces répétitions CGG est similaire à celle pour ses cibles naturelles, les pri-miARNs. Enfin, par des expériences *in cellulo*, j'ai montré que la maturation des pri-miARNs est inhibée spécifiquement par l'expression des répétitions CGG au niveau de la première étape de maturation des miARNs. Ces résultats *in vitro* et *in cellulo* démontrent que la titration du complexe DROSHA-DGCR8 par les expansions ribonucléiques CGG pourrait empêcher la maturation des pri-miARNs et expliquer ainsi la diminution globale de l'expression des miARNs observée dans des échantillons de cerveaux de patients FXTAS.

Sequestration of DROSHA and DGCR8 by Expanded CGG RNA Repeats Alters MicroRNA Processing in Fragile X-Associated Tremor/Ataxia Syndrome

Chantal Sellier,^{1,2} Fernande Freyermuth,¹ Ricardos Tabet,¹ Tuan Tran,³ Fang He,⁴ Frank Ruffenach,¹ Violaine Alunni,¹ Herve Moine,¹ Christelle Thibault,¹ Adeline Page,¹ Flora Tassone,⁵ Rob Willemsen,⁷ Matthew D. Disney,³ Paul J. Hagerman,^{5,6} Peter K. Todd,⁴ and Nicolas Charlet-Berguerand^{1,*}

¹Department of Translational Medicine, IGBMC, Illkirch 67400, France

²College de France, Paris 75000, France

³Department of Chemistry, The Scripps Research Institute, Jupiter, FL 33458, USA

⁴Department of Neurology, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109, USA

⁵M.I.N.D. Institute

⁶Department of Biochemistry and Molecular Medicine

University of California, Davis, Sacramento, CA 95817, USA

⁷Department of Clinical Genetics, Erasmus MC, Rotterdam 3000 DR, The Netherlands

*Correspondence: ncharlet@igbmc.fr

<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2013.02.004>

SUMMARY

Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS) is an inherited neurodegenerative disorder caused by the expansion of 55–200 CGG repeats in the 5' UTR of *FMR1*. These expanded CGG repeats are transcribed and accumulate in nuclear RNA aggregates that sequester one or more RNA-binding proteins, thus impairing their functions. Here, we have identified that the double-stranded RNA-binding protein DGCR8 binds to expanded CGG repeats, resulting in the partial sequestration of DGCR8 and its partner, DROSHA, within CGG RNA aggregates. Consequently, the processing of microRNAs (miRNAs) is reduced, resulting in decreased levels of mature miRNAs in neuronal cells expressing expanded CGG repeats and in brain tissue from patients with FXTAS. Finally, overexpression of DGCR8 rescues the neuronal cell death induced by expression of expanded CGG repeats. These results support a model in which a human neurodegenerative disease originates from the alteration, in *trans*, of the miRNA-processing machinery.

INTRODUCTION

Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS) is a neurodegenerative disorder that affects older adult males who are carriers of an expansion of 55–200 CGG repeats in the 5' UTR of the fragile X mental retardation 1 (*FMR1*) gene (Hagerman et al., 2001). The clinical features of FXTAS include progressive intention tremor and gait ataxia, frequently accompanied by progressive cognitive decline, parkinsonism, peripheral neuropathy, and autonomic dysfunctions (Jacquemont et al., 2003). Principal neuropathology of FXTAS includes mild brain atrophy

and white matter lesions with the presence of ubiquitin-positive nuclear neuronal and astrocytic inclusions (Greco et al., 2002), which contain the expanded CGG RNA repeats (Tassone et al., 2004). In contrast to fragile X syndrome, where full mutations (>200 CGG repeats) result in hypermethylation and silencing of the *FMR1* gene, FXTAS carriers of shorter CGG expansions (55–200 CGG repeats) present increased expression of *FMR1* mRNA levels and normal, or near-normal, FMRP expression (Tassone et al., 2000). These observations suggest a toxic RNA gain-of-function model for FXTAS. In support of that model, cellular and transgenic *Drosophila* and mouse models demonstrate that the sole expression of a mutant RNA containing expanded CGG repeats is sufficient to induce the formation of ubiquitin-positive aggregates and to cause a pathology similar to human FXTAS (Willemsen et al., 2003; Jin et al., 2003; Arocena et al., 2005; Entezam et al., 2007; Hashem et al., 2009). A toxic RNA gain-of-function model predicts that expanded CGG repeats are pathogenic by sequestering specific RNA-binding proteins, resulting in loss of their normal functions and, ultimately, in neuronal cell dysfunction and death. Consistent with a titration model, various proteins were found to colocalize with CGG or ubiquitin-positive inclusions (Iwahashi et al., 2006; Jin et al., 2007; Sofola et al., 2007; Sellier et al., 2010); however, the pathological consequences of their recruitment are unclear, suggesting that the protein(s) sequestered within CGG RNA aggregates and responsible for the neuronal cell death, remains to be identified.

MicroRNAs (miRNAs) are small, conserved, noncoding RNAs that are key components of posttranscriptional gene regulation and are involved in the control of many fundamental processes, including both differentiation and survival of neurons (Schaefer et al., 2007; Davis et al., 2008; De Pietri Tonelli et al., 2008; Stark et al., 2008; Haramati et al., 2010; Hébert et al., 2010; Huang et al., 2010; Fénelon et al., 2011; Schofield et al., 2011). miRNAs are initially transcribed by the RNA polymerase II as primary miRNA (pri-miRNAs) transcripts, which are processed into precursor miRNAs (pre-miRNAs) by the type III RNase,

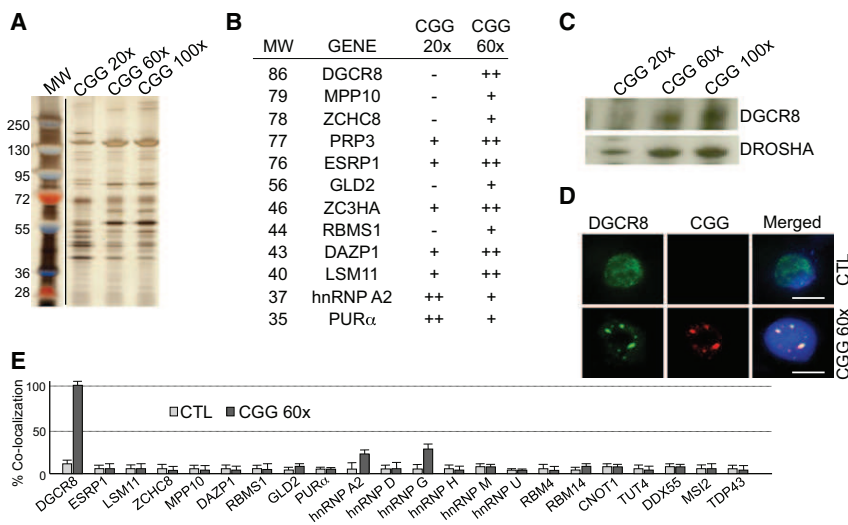


Figure 1. Identification of Proteins Associated with Expanded CGG Repeats

(A) Silver staining of proteins extracted from mouse brain and captured on streptavidin resin coupled to biotinylated in-vitro-transcribed RNA containing expanded CGG repeats of normal or pathogenic size. MW, molecular weight.

(B) List of the main proteins identified by nanoLS-MS/MS that are preferentially associated with 20 or 60 CGG repeats.

(C) Western blotting against DGCR8 or DROSHA of mouse brain proteins captured on 20 or 60 CGG RNA repeat columns.

(D) RNA FISH against CGG repeats, coupled to IF against DGCR8, of COS7 cells transfected with a plasmid expressing either no repeats (CTL) or 60 CGG repeats. Magnification, 630 \times . Scale bars, 10 μ m.

(E) Percentage of colocalization of the endogenous-tested candidate proteins within CGG RNA aggregates analyzed by RNA FISH coupled to IF on COS7 transfected for 24 hr with a plasmid expressing either no repeats or 60 CGG repeats.

See also Tables S1, S2, and Figure S1.

DROSHA, and the double-stranded RNA-binding protein, DGCR8, which anchors DROSHA to the pri-miRNA transcript (Lee et al., 2003; Denli et al., 2004; Landthaler et al., 2004; Gregory et al., 2004; Han et al., 2004; Wang et al., 2007). Pre-miRNAs are then exported into the cytoplasm, where they are processed into mature miRNAs by the DICER enzyme. Global reduction of miRNA expression, for example through inactivation of DICER or DGCR8 in mice, results in embryonic lethality and if conditionally lost in brain, leads to neuronal dysfunction and cell death (Schaefer et al., 2007; Davis et al., 2008; De Pietri Tonelli et al., 2008; Stark et al., 2008; Haramati et al., 2010; Hébert et al., 2010; Huang et al., 2010; Fénelon et al., 2011; Schofield et al., 2011).

Here, we find that DGCR8 binds preferentially to expansions of CGG repeats of pathogenic length. This association results in titration of DGCR8 pri-miRNA-binding activity and in the partial sequestration of DGCR8 and its partner, DROSHA, within CGG RNA aggregates. Consequently, the processing of pri-miRNAs is reduced in cells expressing expanded CGG repeats, and in brain samples from patients with FXTAS, resulting in decreased levels of mature miRNAs. Finally, the expression of pathogenic-expanded CGG repeats in cultured mouse cortical neurons results in decreased dendritic complexity and reduced neuronal cell viability. Importantly, the sole overexpression of DGCR8 restored to normal both the dendritic morphological abnormalities and the loss of neuronal cells, demonstrating that titration of DGCR8 by expanded CGG repeats is a leading event to CGG-induced neuronal cell death.

RESULTS

Identification of Proteins Associated with Expanded CGG Repeats

To identify proteins involved in FXTAS physiopathology, proteins extracted from mouse brain nuclei were captured on streptavidin resin coupled to biotinylated RNA composed of nonpathogenic

(20 CGG repeats) or pathogenic expansions (60 or 100 CGG repeats), eluted, separated on SDS-PAGE, and identified by nano-LC-MS/MS analysis (Figure 1A). More than 30 RNA-binding proteins were identified (Figure 1B; Tables S1 and S2), including hnRNP A2/B1, hnRNP G, and PUR α , which were also identified in previous studies (Iwahashi et al., 2006; Jin et al., 2007; Sofola et al., 2007; Sellier et al., 2010). However, these proteins were recruited preferentially onto short CGG repeats compared to long pathogenic CGG stretches (Figure 1B). In contrast, ten proteins (ESRP1, PRP3, ZC3HA, LSM11, ZCHC8, MPP10, DAZP1, RBMS1, GLD2, and DGCR8) were found preferentially associated with expanded CGG repeats of pathogenic size (Figure 1B). We confirmed the preferential binding of DGCR8 on long CGG stretches by western blotting on the protein eluted from the RNA affinity columns (Figure 1C). The partner of DGCR8, DROSHA, was also preferentially recruited to long expanded CGG repeats (Figure 1C).

Next, to discard nonspecific RNA-binding proteins, we tested whether these candidate proteins colocalize with the aggregates formed by expanded CGG repeats in transfected COS7 cells (Figures S1A and S1B). Among the ten candidates tested, only three (PRP3, ZC3HA, and DGCR8) colocalized with CGG RNA aggregates (Figures 1D and S1A). However, we noted that PRP3 and ZC3HA were naturally localized in speckles, which are normal nuclear structures enriched in some splicing factors and that were found previously to be associated with CGG RNA aggregates in transfected cells (Sellier et al., 2010). Thus, neither PRP3 nor ZC3HA was specifically recruited within CGG RNA aggregates (Figure S1A). In contrast, DGCR8 presented a diffuse pattern within the nucleoplasm, but upon expression of 60 expanded pathogenic CGG repeats, DGCR8 changed localization and was recruited within CGG RNA inclusions (Figure 1D). As further controls, we also tested the colocalization of proteins, such as hnRNP A2/B1 and PUR α , which were found mostly associated with 20 biotinylated CGG RNA repeats in vitro. Consistent with a

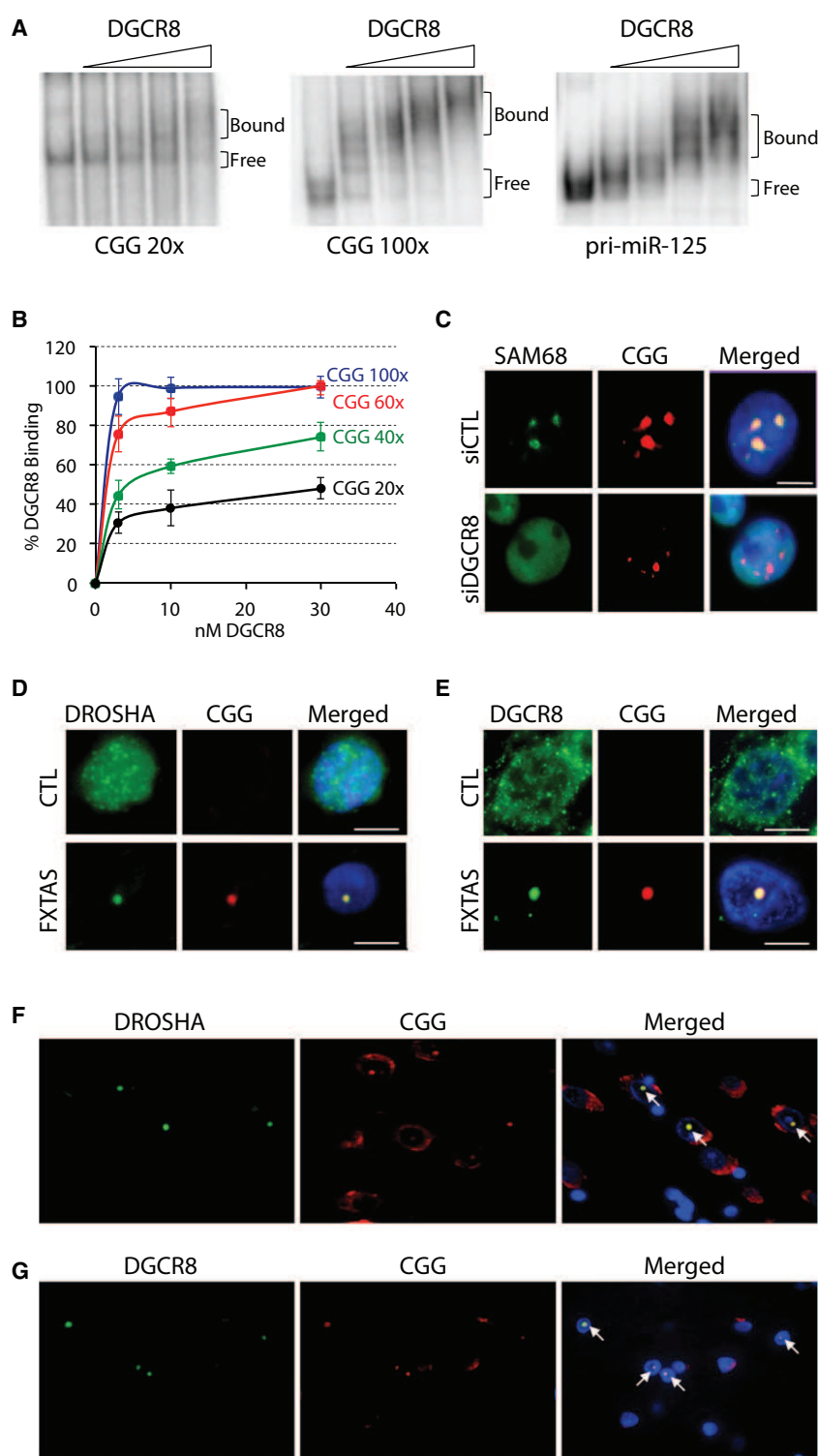


Figure 2. DGCR8 and DROSHA Bind to Expanded CGG RNA Repeats

(A) Gel shift assays of purified bacterial recombinant His-DGCR8 Δ with 100 nM (30,000 cpm) of uniformly α -[³²P]CTP internally labeled in-vitro-transcribed RNA containing 20 or 100 CGG repeats or the pri-miR-125.

(B) Quantification of DGCR8 binding to 20, 40, 60, or 100 CGG RNA repeats.

(C) RNA FISH against CGG repeats, coupled to IF against SAM68, on COS7 cells cotransfected with a plasmid expressing 60 CGG repeats and a siRNA against the luciferase (siCTL) or against DGCR8.

(D and E) RNA FISH of CGG repeats coupled to IF of DROSHA or DGCR8 on brain sections (hippocampal area) of age-matched control or patients with FXTAS. Magnification, 630 \times . Nuclei were counterstained with DAPI.

(F and G) Larger fields of CGG RNA FISH coupled to IF of DROSHA or DGCR8 on brain sections of patients with FXTAS. White arrows indicate CGG RNA aggregates. Note some nonspecific perinuclear background inherent to RNA FISH of autopsied human brain samples.

Scale bars, 10 μ m.
See also Figure S2.

found specifically associated with expanded CGG repeats of pathogenic size, DGCR8.

DGCR8 Binds to Mutated RNA Containing Expanded CGG Repeats

Recruitment of DGCR8 to biotinylated CGG RNA questions whether DGCR8 binds directly, or through indirect protein-protein interactions, to expanded CGG repeats. Gel shift assays showed that purified recombinant HIS-tagged DGCR8 protein binds directly to RNAs containing expanded CGG repeats of pathogenic size (60 and 100 CGG repeats; Figures 2A, S2A, and S2B). In contrast, DGCR8 binds weakly to RNAs containing CGG stretch of nonpathogenic size, such as 20 or 40 CGG repeats (Figures 2A, S2A, and S2B). Furthermore, DGCR8 binds to expanded CGG repeats with an affinity similar to control pri-miRNAs, such as pri-miR-124, pri-miR-125, or pri-Let-7 (Figures 2A and S2A). UV-cross-linking assays confirmed that purified recombinant DGCR8 binds directly to control pri-miR-124 and pri-miR-125, as

well as to expanded CGG repeats of pathogenic size, but does not bind to short CGG stretch (Figure S2B). The in vitro binding of DGCR8 to long expanded CGG repeats prompted us to investigate whether DROSHA and DGCR8 are

preferential binding to normal but not to expanded CGG repeats, we found no significant colocalization of these candidates with CGG RNA aggregates at early time points (Figure 1E). Thus, we pursued our study on the one protein

well as to expanded CGG repeats of pathogenic size, but does not bind to short CGG stretch (Figure S2B). The in vitro binding of DGCR8 to long expanded CGG repeats prompted us to investigate whether DROSHA and DGCR8 are

recruited within the nuclear aggregates found in cell models of FXTAS. CGG RNA aggregates are dynamic nuclear structures that accumulate various proteins in a time-dependent manner (Sellier et al., 2010), which raises the question of the timing of DROSHA and DGCR8 recruitment. Analysis of the formation of CGG RNA aggregates at various time points after transfection of COS7 cells with a plasmid expressing 60 CGG repeats revealed that DROSHA and DGCR8 colocalized within CGG aggregates from the time of their formation (6–8 hr posttransfection; data not shown). Furthermore, depletion of either DROSHA or DGCR8 by siRNA reduced the recruitment of SAM68, one of the earliest proteins found to colocalize with CGG aggregates (Figures 2C and S2C). Next, coimmunoprecipitation experiments demonstrated that DROSHA and DGCR8 interact with SAM68, suggesting that the recruitment of SAM68 within CGG RNA aggregates is mediated through protein-protein interactions with DROSHA or DGCR8 (Figure S2D). These results suggest that in transfected cells, DROSHA and DGCR8 are among the first proteins to be recruited within the CGG RNA aggregates and are essential for the further aggregation of other proteins, such as SAM68. These results were obtained in cells expressing large amounts of expanded CGG RNA repeat. Thus, to rule out any overexpression bias, we tested the localization of endogenous DROSHA and DGCR8 in brain sections from patients with FXTAS. RNA FISH coupled to immunofluorescence (IF) experiments showed that both DROSHA and DGCR8 consistently colocalized with endogenous CGG nuclear RNA aggregates in brain sections of patients with FXTAS (Figures 2D and 2E; larger fields in Figures 2F and 2G), whereas DROSHA and DGCR8 were diffusely localized within the nucleoplasm of age-matched non-FXTAS controls. Finally, we tested the localization of endogenous DROSHA, DGCR8, and CGG aggregates in brain sections of a knockin mouse model, in which endogenous CGG repeats had been replaced with an expansion of 98 CGG repeats (Willemssen et al., 2003). RNA FISH coupled to IF labeling showed the presence of rare nuclear CGG RNA aggregates that colocalized with both endogenous DROSHA and DGCR8 in mice expressing expanded CGG repeats (Figures S2E and S2F). By contrast, DROSHA and DGCR8 were diffuse throughout the nucleoplasm in control mice. We noted that the CGG RNA aggregates were larger and much more frequent in patients with FXTAS than in knockin mice, which is consistent with the milder neurological disturbances observed in knockin mice compared to patients with FXTAS (Willemssen et al., 2003).

The direct binding of DGCR8 to expanded CGG trinucleotide repeats raises the question as to how specific this interaction is and, notably, whether DGCR8 can also recognize other trinucleotide repeats such as expanded CUG repeats, the mutation responsible of myotonic dystrophy of type 1 (DM1). UV-cross-linking assays showed that DGCR8 binds weakly to RNAs containing 20 or 100 CUG repeats, compared to an RNA containing 100 CGG repeats (Figure S2G). Similarly, both DROSHA and DGCR8 from mouse brain extract were captured by RNA affinity columns composed of expanded CGG repeats, yet neither was recruited by expanded CUG repeats (Figure S2H). Finally, RNA FISH coupled to IF demonstrated that both endogenous DROSHA and DGCR8 were recruited within CGG RNA repeat aggregates that formed in COS7 cells transfected with a plasmid

expressing 60 CGG repeats (Figures S2I and S2J). In contrast, DROSHA and DGCR8 were not recruited within RNA aggregates of similarly transfected cells expressing either expanded CUG or AUUCU repeats, which are involved in DM1 and spinocerebellar ataxia of type 10 (SCA10), respectively (Figures S2I and S2J). Identical results were obtained in neuronal PC-12 or GT17 cells (data not shown). These results indicate that DGCR8 binds preferentially expanded CGG repeats compared to CUG repeats, which is consistent with the enhanced stability of the double-stranded helical structure formed by expanded CGG repeats compared to CUG repeats (Mooers et al., 2005; Sobczak et al., 2003; Zumwalt et al., 2007; Kiliszek et al., 2009, 2011; Kumar et al., 2011). Alternatively, the presence of U:U mismatches versus noncanonical G:G base pairing, or other structural differences that are significant, between CUG and CGG hairpins, may impair the binding of DGCR8. Overall, these results suggest that DROSHA and DGCR8 are specific components of the CGG RNA aggregates in FXTAS.

DROSHA Does Not Cleave Expanded CGG Repeats

The binding of DROSHA and DGCR8 to the expanded CGG RNA repeat raises the possibility that DROSHA may cleave these repeats into shorter CGG hairpins, which is an attractive hypothesis considering that DICER was reported, *in vitro*, to partially process expanded CGG repeats into potentially toxic miRNA-like CGG RNA repeats (Handa et al., 2003), an observation also reported for expanded CUG and CAG repeats (Krol et al., 2007; Bañez-Coronel et al., 2012). Accordingly, we tested whether DROSHA and DGCR8 can process an RNA containing 60 expanded CGG repeats. However, no cleavage products were observed, although DROSHA correctly processed a control pri-miR-125 (Figure S3A). Furthermore, we found no trace of small miRNA-like CGG RNA after massive parallel sequencing of RNA extracted from cells transfected with a plasmid expressing 60 CGG repeats (data not shown). We propose that structural differences between pri-miRNAs and CGG expanded repeats, such as noncanonical G:G base pairing, impair the cleavage activity of DROSHA. Overall, the recruitment of DROSHA and DGCR8, without the processing of CGG repeats and the subsequent release of the proteins, suggests that the aggregates of CGG repeats may act as molecular sink, titrating DROSHA and DGCR8 away from their normal functions.

DROSHA and DGCR8 Are Partially Sequestered by Expanded CGG Repeats

To test a potential sequestration of DROSHA and DGCR8, we first analyzed the effect of expanded CGG repeats on the RNA-binding activity of DGCR8. Gel shift experiments demonstrated that addition of increasing amounts of unlabeled expanded CGG RNA repeat progressively competed with the binding of recombinant purified DGCR8 to radioactively labeled pri-miR-125 (Figure 3A). As a control, addition of unlabeled expanded CUG repeats had little or no effect. We confirmed these results by UV-crosslinking assays, which demonstrated that addition of increasing amounts of expanded CGG repeats competed with the binding of DGCR8 to radioactively labeled pri-miR-124 and pri-miR-125, whereas expanded CUG repeats had no effects (Figure S3B). Next, we tested the effect of

expanded CGG repeats on the processing activity of DROSHA. COS7 cells were cotransfected with a plasmid expressing an ectopic pri-miRNA under the expression of a CMV promoter, allowing the detection of the primary, precursor, and mature miRNAs by northern blotting (Figure 3B). Importantly, coexpression of increasing amounts of expanded CGG repeats reduced the processing of ectopic pri-miR-124 into pre-miR-124. This inhibition is specific because expression of control expanded CUG repeats had no effect on the biogenesis of pri-miR-124 (Figure 3B). We confirmed these results using ectopically expressed pri-miR-206, pri-miR-146, and pri-miR-26 and found that expression of expanded CGG repeats inhibited the DROSHA cleavage of pri-miRNA transcripts into pre-miRNAs (Figure S3C). As a control, expression of expanded CUG repeats had no or little effects on miRNA biogenesis (Figure S3D). These results suggest that expanded CGG repeats compete with the binding of DGCR8 to pri-miRNAs, reducing the quantity of free DROSHA and DGCR8 available to process pri-miRNAs, which leads to reduced processing of pri-miRNAs into pre-miRNAs.

Theoretically, the titration of free DROSHA and DGCR8 may result in reduced formation of mature miRNAs. To test this hypothesis, we quantified the expression of endogenous mature miRNAs upon expression of expanded CGG repeats in neuronal GT17 cells. Microarray profiling demonstrated that most of the miRNAs, which presented a modified expression, were reduced upon transfection of a plasmid expressing 60 CGG repeats (Figure 3C). Decreased levels of mature miRNAs were confirmed by quantitative real-time RT-PCR (Figure 3D). The limited number (56) of miRNAs presenting an expression change, as well as the limited decrease (~20%–50%) of miRNA levels, are consistent with a progressive titration of DROSHA and DGCR8 and with the early time point (24 hr after transfection) chosen for analysis. Also, we noted that the expression of a minority of miRNAs was upregulated upon expression of expanded CGG repeats. However, a similar upregulation occurred at early time point (24 hr after transfection) in neuronal GT17 or COS7 cells depleted of DGCR8 by siRNA, suggesting the existence of rescue mechanisms to transiently increase the expression of some miRNAs in response to DGCR8 reduction (Figures S3E and S3F).

Importantly, a decrease in miRNA expression could be triggered by a specific alteration of the miRNA-processing machinery but may also reflect a global alteration of RNA transcription due to reduced cell viability. To discriminate between these two hypotheses, we quantified the levels of the primary transcripts hosting the decreased miRNAs. Quantitative RT-PCR demonstrated that, whereas mature miRNAs presented reduced levels, expression of their corresponding pri-miRNAs was not altered or, even, increased (Figure 3E). Similarly, the expression of various mRNAs containing pri-miRNAs within their introns was not altered (Figure 3F). Comparable decrease of mature miRNA levels with no alterations of the expression of their corresponding pri-miRNAs was observed in a second cell model: COS7 cells expressing 60 CGG repeats (Figures S3G and S3H). These results demonstrate that expanded CGG repeats alter specifically the processing of pri-miRNAs, without affecting their transcription. As a further control, we tested the expression of mirtrons, which are miRNAs processed by the splicing machinery, thus independent of the processing by

DROSHA (Okamura et al., 2007; Ruby et al., 2007). Quantitative RT-PCR analysis of mirtron-877, mirtron-1224, mirtron-1225, and mirtron-1226 levels in neuronal GT17 cells expressing expanded CGG repeats demonstrated that their expression was not altered (Figure 3G). Similarly, mirtron expression was not altered in COS7 cells expressing expanded CGG repeats (Figure S3I). Also, the mRNA and protein expression levels of DROSHA and DGCR8 were normal in cells expressing expanded CGG repeats, indicating that pathogenic CGG repeats affect the activity, but not the expression, of DROSHA and DGCR8 (Figures S3J and S3K). Finally, the transfection of a plasmid encoding DGCR8 in neuronal cells expressing expanded CGG repeats rescued the decreased expression of miRNAs, whereas expression of an inactive form of DGCR8, which was deleted for its double-stranded RNA-binding domains, presented no rescue activity (Figure 3H). Overall, these data suggest that expanded CGG repeats specifically reduced the activity of DROSHA and DGCR8, without affecting other mechanisms such as general transcription.

The Processing of miRNAs Is Altered in Brain Samples of Patients with FXTAS

The altered processing of miRNAs in cells overexpressing expanded CGG repeats raises the question whether a similar alteration occurs in patients with FXTAS. Microarray analysis of cerebellar samples from patients with FXTAS revealed that mis-regulation of miRNAs involved predominantly decreased expression compared to age-matched controls (Figure 4A). Quantitative RT-PCR analysis confirmed reduced quantities of various mature miRNAs in patients with FXTAS relative to controls (Figure 4B). Note that the expression of mature miRNAs was not fully abolished but decreased by 20%–50%, indicating a partial titration of DROSHA and DGCR8 by the expanded CGG repeats. In contrast, the quantity of mirtron-877, whose biogenesis depends on the splicing machinery and bypasses DROSHA, was normal in FXTAS brain samples (Figure 4B). As a control, quantification of the primary transcripts hosting the downregulated mature miRNAs demonstrated no changes or increased expression in patients with FXTAS (Figure 4C). We confirmed these results in frontal cortex samples of patients with FXTAS compared to age-matched controls. Quantitative RT-PCR confirmed that expression of mature miRNAs was decreased in patients with FXTAS (Figure 4D). Consistent with a specific alteration of the activity of DROSHA, the quantities of their corresponding pri-miRNAs were normal or increased in FXTAS samples compared to age-matched control samples (Figure 4E). As further controls, expressions of various mirtrons, whose biogenesis is independent of DROSHA, were normal in patients with FXTAS (Figure 4F). Overall, these results suggest that transcription and splicing of pri-miRNAs are not globally altered in patients with FXTAS but that their processing by DROSHA is reduced.

Overexpression of DGCR8 Rescues Neuronal Cell Death

A model of titration of DGCR8 by expanded CGG repeats in patients with FXTAS predicts that depletion of DGCR8 would enhance any phenotype caused by expanded CGG repeats. To test that hypothesis, we took advantage of

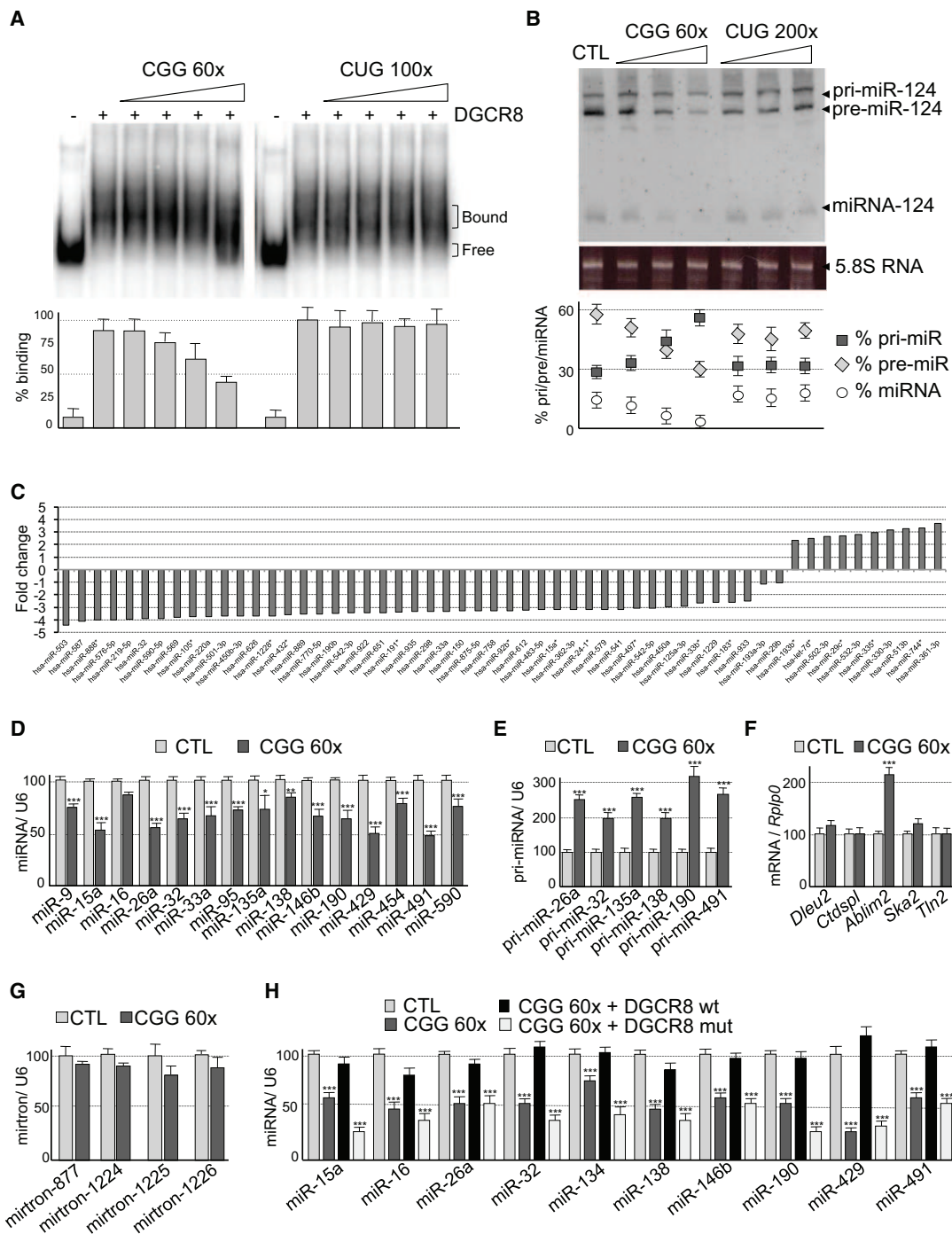


Figure 3. DROSHA and DGCR8 Activities Are Reduced in CGG-Expressing Cells

(A) Gel shift assays of recombinant His-DGCR8 Δ binding with 100 nM (30,000 cpm) of uniformly α -[³²P]CTP internally labeled in-vitro-transcribed pri-miR-125 in presence of increasing amounts of nonlabeled in-vitro-transcribed RNA containing either 60 CGG repeats or 100 CUG repeats.

(B) A total of 20 μ g of total RNA extracted from COS7 cells cotransfected with a pri-miR-124-2 minigene and increasing amounts of a plasmid expressing either 60 CGG or 200 CUG repeats were analyzed by northern blotting using a miR-124 γ -[³²P]ATP-labeled antisense probe. The mean of at least three independent transfections is depicted as the percentage of pri-, pre-, and mature miR-124-2. Error bars indicate SD.

(C) Microarray profiling of mature miRNAs expressed in GFP-positive FACS-isolated GT17 neuronal cells cotransfected with a plasmid expressing GFP and either a plasmid expressing no repeats (n = 3) or 60 CGG repeats (CGG, n = 3). Ordinate is in Log₂ scale.

(D–G) Quantitative RT-PCR analysis of the expression of mature (D), pri-miRNAs (E), mRNAs (F), and mirtrons (G) relative to the U6 snRNA or to the *RPLPO* mRNA in GFP-positive FACS-isolated GT17 neuronal cells cotransfected with a plasmid expressing GFP and either a plasmid expressing no repeats (n = 3) or a plasmid

(legend continued on next page)

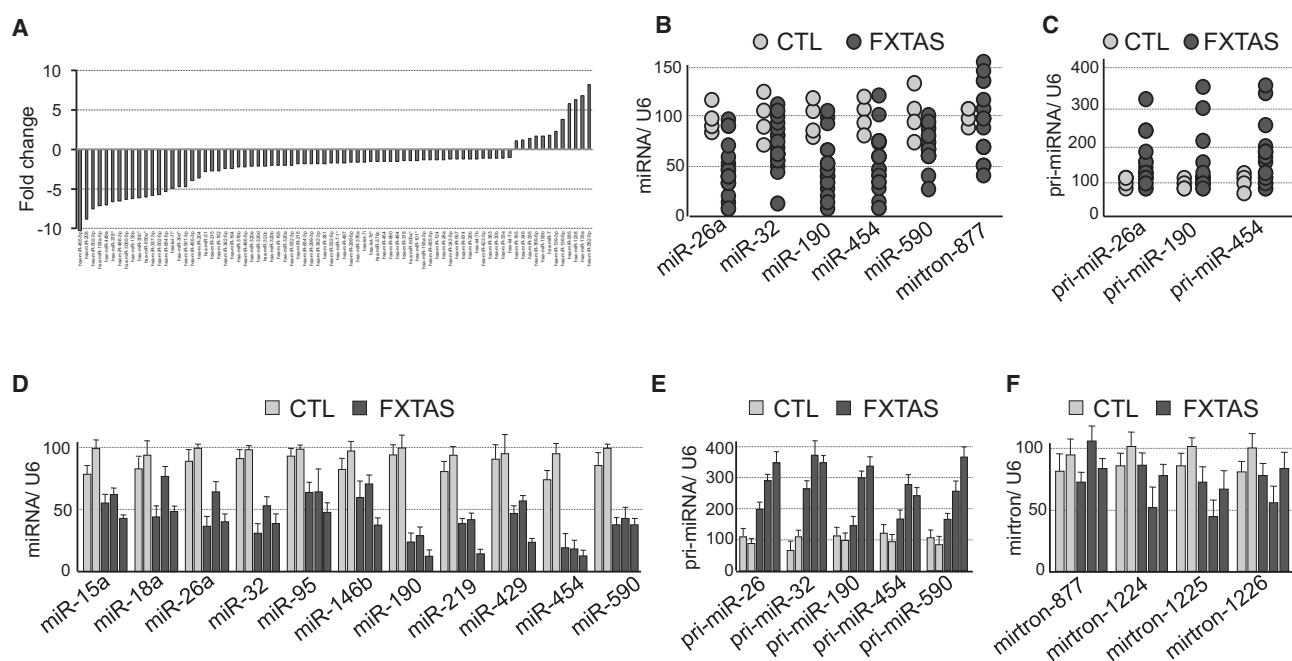


Figure 4. miRNA Levels Are Reduced in FXTAS Brain Samples

(A) Microarray profiling of mature miRNAs expressed in cerebellum samples of FXTAS and age-matched control patients.

(B and C) Quantitative RT-PCR analysis of the expression of mature (B) and pri-miRNAs (C) relative to the U6 snRNA in cerebellum samples of FXTAS (n = 13) and age-matched control (n = 4) patients.

(D–F) Quantitative RT-PCR analysis of the expression of mature (D), pri-miRNAs (E), and mirtrons (F) relative to the U6 snRNA in frontal cortex samples of FXTAS (n = 3) and age-matched control (n = 2) patients. Error bars indicate SD.

the neurodegenerative phenotype observed in transgenic *Drosophila melanogaster* expressing 90 CGG repeats (Jin et al., 2003). As previously described, expression of 90 CGG repeats decreases adult *Drosophila* viability (Figure S4A). Interestingly, decreased expression of Pasha (the *Drosophila* homolog of DGCR8) by RNAi in CGG transgenic flies resulted in enhanced early lethality (Figure S4A). A similar aggravated phenotype was observed with Drosha RNAi lines (Figure S4B). In contrast, overexpression of Drosha or Pasha in CGG flies had little or no effect and did not rescue fly lethality (data not shown). These data suggest that several pathological mechanisms may coexist in the fly model of FXTAS, a model consistent with the observation of cytoplasmic inclusions containing PUR α in *Drosophila* (Jin et al., 2007), but not in human cells (Sellier et al., 2010). Accordingly, we tested mammalian neuronal cells, in which expression of expanded CGG repeats leads to formation of CGG RNA nuclear aggregates without formation of PUR α -positive cytoplasmic aggregates. Organotypic cultures of E18 mouse cortex neurons were transfected at 7 days in vitro (DIV) with a plasmid expressing 60 CGG repeats and

a plasmid expressing the GFP marker for 1 day (8 DIV). As reported previously by Chen et al. (2010), expression of expanded CGG repeats resulted in shorter dendrites and an ~40% decrease in dendritic branchpoints (Figures 5A and 5B). As a control, expression of expanded CUG repeats had no or little effect on neuronal dendritic complexity, indicating a specific deleterious effect of the expanded CGG repeats (Figure 5B). Importantly, the sole expression of a plasmid expressing DGCR8 restored normal dendritic growth and branching in neurons expressing the expanded CGG repeats (Figures 5A and 5B). In contrast, expression of an inactive form of DGCR8, which was deleted for its double-stranded RNA-binding domains, presented no rescue activity (Figure 5B). Similarly, expression of a control plasmid expressing MBNL1 had no significant effect and did not alleviate the dendritic alterations, indicating a specific role for DGCR8 (Figure 5B). We also tried to rescue the neuronal cell death induced by expression of expanded CGG RNA repeats by transfecting either miR-124, miR-9 or miR-125, which are important miRNAs for neuronal cell function, but we failed to observe a full rescue, suggesting that more than one miRNA is

expressing 60 CGG repeats (CGG, n = 3). *DLEU2* is the host gene of pri-miR-16-1, *CTDSPL* of pri-miR-26a1, *ABLIM2* of pri-miR-95, *SKA2* of pri-miR-454, and *TLN2* of pri-miR-190. Error bars indicate SD.

(H) Quantitative RT-PCR analysis of the expression of mature miRNAs relative to U6 snRNAs in GFP-positive FACS-isolated GT17 neuronal cells cotransfected with a plasmid expressing GFP, a plasmid expressing 60 CGG repeats, and either a vector expressing Flag-tagged wild-type (WT) DGCR8 or mutant (mut) DGCR8, deleted for its double-stranded RRM. Error bars indicate SD.

***p < 0.001; **p < 0.01; *p < 0.1.

See also Figure S3.

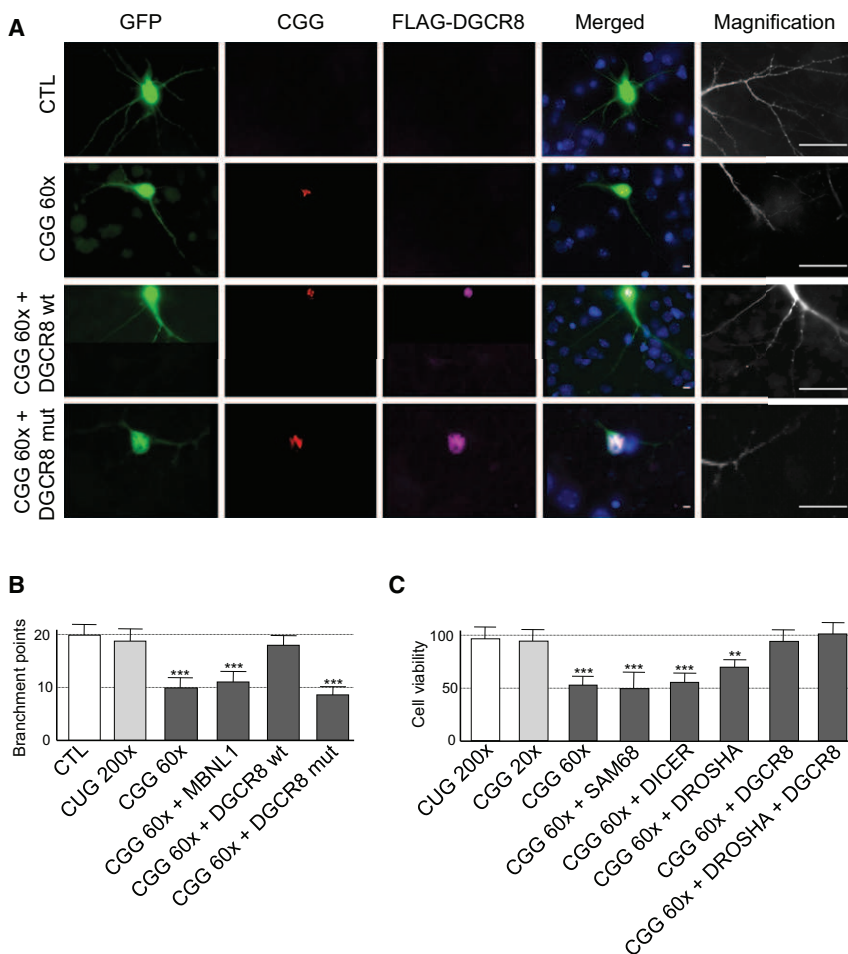


Figure 5. DGCR8 Is Sufficient to Rescue Expanded CGG Toxicity

(A) Primary cultures of cortex neurons from E18 mouse embryos were cotransfected with a plasmid expressing GFP, a vector expressing either no or 60 CGG repeats, and a plasmid expressing either a Flag-tagged wild-type DGCR8 or a mutant Flag-DGCR8 deleted for its double-stranded RRM. Neurons were analyzed 24 hr after transfection by RNA FISH using a CCG_{60x}-Cy3 DNA probe coupled to IF using an antibody directed against the FLAG tag. Magnification, 360 \times . Magnification of the insets, 2,500 \times . Scale bars, 20 μ m.

(B) Quantification of the number of dendritic branchpoints of individual neurons transfected as in (A). Error bars indicate SD.

(C) Cell viability (tetrazolium) assay of neuronal GT17 cells transfected for 24 hr with a plasmid expressing either 200 CUG repeats or 20, 40, or 60 CGG repeats alone, or 60 CGG repeats plus a plasmid expressing either GFP-SAM68, Flag-DICER, Flag-DROSHA or Flag-DGCR8. Error bars indicate SD.

***p < 0.001; **p < 0.01.

See also Figure S4.

probably necessary to restore normal neuronal functions. Next, we tested whether DGCR8 can also rescue the neuronal cell death caused by expressing expanded CGG repeats. Transfection of a plasmid expressing 60 CGG repeats in neuronal GT17 cells resulted in a 50% decrease of the cell viability, whereas expression of either expanded CUG repeats or 20–40 control CGG repeats was not toxic (Figure 5C). Importantly, the overexpression of DGCR8 alone or of DGCR8 plus DROSHA alleviated the cell death due to the expanded CGG repeats (Figure 5C). As a control, transfection of control plasmids expressing either DROSHA alone, DICER or SAM68 had no or little effect. Similar results were obtained in COS7 cells (Figure S4C). Overall, these results suggest that a reduced quantity of free DROSHA and DGCR8 is the principal cause of the decreased dendritic complexity and reduced cell viability observed in neuronal cells expressing pathogenic-expanded CGG repeats.

DISCUSSION

Our results suggest a model for the cellular dysfunction induced by the expanded CGG repeats present within the 5' UTR of the *FMR1* mRNA. Expanded CGG repeats form a double-stranded RNA hairpin (Sobczak et al., 2003; Zumwalt et al., 2007; Kumar

et al., 2011; Kiliszek et al., 2011), which mimics the structure of pri-miRNAs recognized by DGCR8 (Zeng and Cullen, 2005; Han et al., 2006). We propose that DGCR8 interacts with the expanded pathogenic CGG repeats located within the 5' UTR of the *FMR1* mRNA, thus sequestering itself and its partner, DROSHA (Figure 6). As a consequence, the level of free DROSHA-DGCR8 microprocessor is decreased, reducing the expression of mature miRNAs and ultimately resulting in neuronal cell dysfunction and degeneration. In that aspect, our work is reminiscent of the abnormal miRNA biogenesis and phenotypic abnormalities caused by the genetic haploinsufficiency of *Dgcr8* in the 22q11-deletion mouse model (Stark et al., 2008; Fénelon et al., 2011; Schofield et al., 2011).

A DROSHA-DGCR8 titration model has several predicted consequences for FXTAS pathology. First, a model based on DGCR8 titration predicts that the expansion of CGG repeats must exceed a minimal threshold size to accommodate DGCR8 binding (Zeng and Cullen, 2005; Han et al., 2006). This is consistent with the CGG repeat dependence of clinical involvement and degree of severity observed in patients with FXTAS (Tassone et al., 2007; Hoem et al., 2011), in whom it is estimated that “normal” CGG polymorphic repeat lengths are below 40 repeats, “gray zone” alleles contain 40–55 repeats, and patients with FXTAS are defined by premutation alleles containing 55–200 CGG repeats. Second, we observed that miRNA expression was decreased but not fully abolished, which is consistent with a partial and progressive sequestration of DROSHA-DGCR8 and, consequently, a progressive worsening of the disease symptoms. Third, previous studies have identified various

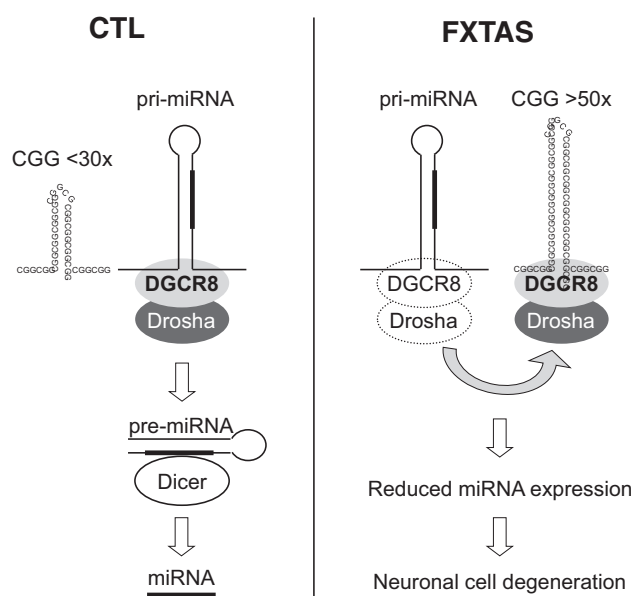


Figure 6. Model of DROSHA and DGCR8 Titration by Expanded CGG Repeats

Expanded CGG repeats fold into a double-stranded RNA hairpin that recruits DGCR8, resulting in the titration and immobilization of DROSHA and DGCR8. The reduced levels of free DROSHA and DGCR8 available to normally process pri-miRNAs into pre-miRNAs result in reduced levels of mature miRNAs, and ultimately, in neuronal cell dysfunctions.

proteins (e.g., PUR α , hnRNP A2/B1, SAM68, etc.) as candidates for transduction of the CGG-expanded repeat toxicity (Iwahashi et al., 2006; Jin et al., 2007; Sofola et al., 2007; Sellier et al., 2010). However, the presence of cytoplasmic inclusions recruiting PUR α in fly, but not in mammalian neuronal cells expressing expanded CGG repeats, raises the question of the superimposition of two different pathological mechanisms in *Drosophila*: one involving PUR α in cytoplasmic inclusions, and another involving the sequestration of specific RNA-binding protein(s) by the expanded CGG repeats within nuclear aggregates. Such superimposition of pathogenic mechanisms may explain why overexpression of Pasha has no evident rescue effect in CGG-transgenic *Drosophila*, whereas expression of DGCR8 rescues the toxicity induced by expression of expanded CGG repeats in primary cultures of mouse neurons. Also, this superimposition model would explain the presence of ubiquitin-positive aggregates that do not colocalize with CGG RNA aggregates in knockin mouse models expressing expanded CGG repeats, as well as the recent report that only a subset of miRNAs is mis-regulated in *Drosophila* expressing expanded CGG repeats (Tan et al., 2012). Whether such a superimposition of pathological mechanisms also exists in patients with FXTAS remains an open question, yet to be determined. Finally, we found previously that SAM68 is sequestered within CGG RNA aggregates and that SAM68 rescues some of the splicing alterations observed in CGG-expressing cells (Sellier et al., 2010). However, we now show that the sequestration of SAM68 into CGG RNA aggregates requires DGCR8 and that restoration of SAM68 function is not sufficient to recover all normal neuronal cell functions. By

contrast, expression of DGCR8 alone is sufficient to restore to normal both the dendritic morphological abnormalities and the loss of neuronal viability induced by expression of pathogenic-expanded CGG repeats in cultured mouse neurons.

In conclusion, this work raises the possibility that other human diseases could operate through a similar sequestration mechanism, provided that the mutant RNA forms a secondary structure that is recognized by the double-stranded RNA-binding protein, DGCR8. An appealing hypothesis in light of the recent finding that noncoding RNAs exceed coding transcripts by more than 5-fold and that an increasing number of potentially structured G-rich expanded repeats are found associated with pathologies, such as the expanded CCGGGG repeats in the *C9ORF72* gene that cause ALS-FTD (DeJesus-Hernandez et al., 2011). The current observations should also facilitate the development of novel model systems to better understand the molecular and cellular mechanisms underlying FXTAS. Finally, from the perspective of FXTAS treatment, identification of a key interaction between DGCR8 and the expanded CGG repeats represents an attractive target for therapeutic intervention. Indeed, if DROSHA and DGCR8 are sequestered, they are nevertheless present and potentially functional; hence, a strategy based on CGG-antisense oligonucleotides or pharmacological compounds (Disney et al., 2012) able to release the trapped DGCR8 would presumably return to normal the expression of miRNAs altered in FXTAS.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Nano-LC-MS/MS Analysis

Nuclear extract was prepared from mouse brain as described by Dignam et al. (1983). A total of 300 μ g of nuclear extract was passed over an in-vitro-transcribed and -biotinylated RNA (Biotin 11 CTP; PerkinElmer) bound to streptavidin-coated magnetic beads (Dynabeads M-280 streptavidin; Invitrogen) in the presence of 20 mM HEPES, 300 mM NaCl, 8 mM MgCl₂, 0.01% NP40, 1 mM DTT, and protease inhibitor (PIC; Roche). The magnetic beads with immobilized RNA and its bound proteins were washed three times with the binding buffer, and bound proteins were eluted by boiling 3 min in the sample buffer prior to 4%–12% SDS-PAGE (NuPAGE 4%–12% bis-Tris Gel; Invitrogen) separation and silver staining (SilverQuest; Invitrogen). The protein bands were excised, digested, and identified using NanoESI-Ion Trap (LTQ XL; Thermo Fisher Scientific).

Cell Cultures and Transfections

Primary cortical neurons were prepared from C57Bl/6 mouse embryos at E18 and grown on polylysine-coated 24-well plates in neurobasal medium (NBM) supplemented with 1 \times B27, 0.5 mM L-glutamine, and 100 IU/ml penicillin/streptomycin at 37°C with 5% CO₂. Neurons were transfected at day 7 with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) in 400 μ l NBM. Medium was replaced after 3 hr with a 1:1 (v:v) mixture of conditioned and fresh NBM. After 30 hr, the neurons were fixed for FISH/IF. COS7 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 10% fetal bovine serum, and gentamicin at 37°C in 5% CO₂. PC12 cells were cultured in DMEM, 10% horse serum, 5% fetal calf serum, and penicillin at 37°C, 5% CO₂. GT17 cells were grown in 10% fetal bovine serum, gentamicin, and penicillin at 37°C in 5% CO₂ and transfected 24 hr after plating in DMEM and 0.1% fetal bovine serum to block cell divisions, using either FuGENE HD (Roche) for COS7 cells or Lipofectamine 2000 for PC12 or GT17 cells. For RNA FISH/IF, GT17 cells were plated in 24-well plates on glass coverslips precoated with a solution of 1% collagen type I (BD Biosciences).

RNA FISH Combined with IF

Patients with FXTAS have been described previously (case 6, 7, and 9 of Greco et al., 2006). Mouse or human brain sections were deparaffinized

two times for 20 min in Histosol Plus (Shandon) and dehydrated as follows: twice in ethanol 100% (5 min), twice in ethanol 95% (5 min), once in ethanol 80% (5 min), once in ethanol 70% (5 min), and rinsed in PBS before RNA FISH. Glass coverslips containing plated cells or brain sections treated as described above were fixed in cold acetone during 20 min at -20°C and washed three times with PBS. The coverslips or slides were incubated for 10 min in PBS plus 0.5% Triton X-100 and washed three times with PBS before prehybridization in 40% DMSO, 40% formamide, 10% BSA (10 mg/ml), 2 \times SCC for 30 min. The coverslips or slides were hybridized for 2 hr in 40% formamide, 10% DMSO, 2 \times SCC, 2 mM vanadyl ribonucleoside, 60 $\mu\text{g/ml}$ tRNA, and 30 $\mu\text{g/ml}$ BSA plus 0.75 μg (CCG) $8\times$ -Cy3 DNA oligonucleotide probe (Sigma-Aldrich). The coverslips or slides were washed twice in 2 \times SCC/50% formamide and twice in 2 \times SCC. Following FISH, the coverslips or slides were washed twice successively in 2 \times SCC/50% formamide, in 2 \times SCC, and in PBS. The coverslips or slides were incubated 2 hr with primary antibody against Drosha (1:100 dilution, AB12286; Abcam) or DGCR8 (1:100 dilution, HPA019965; Sigma-Aldrich). Slides or coverslips were washed twice with PBS before incubation with a goat anti-rabbit secondary antibody conjugated with Alexa Fluor 488 (1:500 dilution; Thermo Fisher Scientific) for 60 min, incubated for 10 min in 2 \times SCC/DAPI (1:10,000 dilution), and rinsed twice in 2 \times SSC before mounting in Pro-Long media (Molecular Probes). Slides were examined using a fluorescence microscope (Leica), and identical exposure or microscope setting was used for control or FXTAS brain section analyses.

Quantitative Real-Time PCR

Total RNA from cells or patient brains, the latter obtained under approved IRB protocols (University of California, Davis), was isolated by TriReagent (Molecular Research Center). cDNAs were generated using the miScript II RT Kit (QIAGEN) for quantification of miRNAs or the Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics) for quantification of mRNAs. qPCR of miRNAs was realized using the miScript Primer Assay (QIAGEN) and miScript Sybr Green PCR Kit (QIAGEN) in a LightCycler 480 (Roche) with 15 min at 94°C followed by 50 cycles of 15 s at 94°C , 20 s at 55°C , and 20 s at 72°C . U6 snRNA was used as standard. qPCR of mRNAs was realized using the LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche) in a LightCycler 480 with 15 min at 94°C followed by 50 cycles of 15 s at 94°C , 20 s at 58°C , and 20 s at 72°C . The primers are listed in Table S1. *RPLPO* mRNA was used as standard, and data were analyzed using the LightCycler 480 analysis software ($2\Delta\text{Ct}$ method).

For additional details, please see the [Extended Experimental Procedures](#).

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Extended Experimental Procedures, four figures, and two tables and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2013.02.004>.

LICENSING INFORMATION

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivative Works License, which permits non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Tom Cooper (Baylor College of Medicine, Houston) and Joelle Marie (CNRS, Gif-sur-Yvette, France) for the gift of the CUG-expressing plasmids, Karen Usdin (NIH, Bethesda, MD, USA) for the gift of the CGG 65x-expressing plasmid, Narry Kim (University of Seoul, Seoul, Korea) for the gift of the Flag-DROSHA and Flag-DGCR8 WT or mutant plasmids, Peng Jin (Emory School of Medicine, Atlanta), who provided the FXTAS model flies, Scott Pletcher (University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA), who provided the Geneswitch flies, and Claudio Sette (University of Tor Vergata, Roma) for the gift of the GFP-SAM68 construct. This work was

supported by ANR GENOPAT grant P007942 (to N.C.-B.), AFM and Jérôme Lejeune funding (to N.C.-B.), Collège de France (to C.S.), NIH grant K08NS069809 (to P.K.T.), NIH-NINDS grant NS062411 (to R.W.), Netherlands Brain Foundation (F2012(1)-101) (to R.W.), NIH grant 1R01GM079235-01A2 (to M.D.D.), and the NIH Roadmap Initiative grants DE019583 and AG032119 (to P.J.H.). Experiments were performed by C.S., F.F., R.T., F.H., T.T., F.R., and V.A. Samples and patient data were obtained from F.T., P.J.H., and R.W. Data were analyzed by C.S., C.T., A.P., M.D.D., P.K.T., H.M., R.W., N.C.-B., and P.J.H. The study was designed and coordinated by N.C.-B.

Received: June 26, 2012

Revised: November 30, 2012

Accepted: February 1, 2013

Published: March 7, 2013

REFERENCES

- Arocena, D.G., Iwahashi, C.K., Won, N., Beilina, A., Ludwig, A.L., Tassone, F., Schwartz, P.H., and Hagerman, P.J. (2005). Induction of inclusion formation and disruption of lamin A/C structure by premutation CAG-repeat RNA in human cultured neural cells. *Hum. Mol. Genet.* *14*, 3661–3671.
- Bañez-Coronel, M., Porta, S., Kagerbauer, B., Mateu-Huertas, E., Pantano, L., Ferrer, I., Guzmán, M., Estivill, X., and Martí, E. (2012). A pathogenic mechanism in Huntington's disease involves small CAG-repeated RNAs with neurotoxic activity. *PLoS Genet.* *8*, e1002481.
- Chen, Y., Tassone, F., Berman, R.F., Hagerman, P.J., Hagerman, R.J., Willemssen, R., and Pessah, I.N. (2010). Murine hippocampal neurons expressing *Fmr1* gene premutations show early developmental deficits and late degeneration. *Hum. Mol. Genet.* *19*, 196–208.
- Davis, T.H., Cuellar, T.L., Koch, S.M., Barker, A.J., Harfe, B.D., McManus, M.T., and Ullian, E.M. (2008). Conditional loss of *Dicer* disrupts cellular and tissue morphogenesis in the cortex and hippocampus. *J. Neurosci.* *28*, 4322–4330.
- DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I.R., Boeve, B.F., Boxer, A.L., Baker, M., Rutherford, N.J., Nicholson, A.M., Finch, N.A., Flynn, H., Adamson, J., et al. (2011). Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of *C9ORF72* causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* *72*, 245–256.
- Denli, A.M., Tops, B.B., Plasterk, R.H., Ketting, R.F., and Hannon, G.J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* *432*, 231–235.
- De Pietri Tonelli, D., Pulvers, J.N., Haffner, C., Murchison, E.P., Hannon, G.J., and Huttner, W.B. (2008). miRNAs are essential for survival and differentiation of newborn neurons but not for expansion of neural progenitors during early neurogenesis in the mouse embryonic neocortex. *Development* *135*, 3911–3921.
- Dignam, J.D., Lebovitz, R.M., and Roeder, R.G. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* *11*, 1475–1489.
- Disney, M.D., Liu, B., Yang, W.Y., Sellier, C., Tran, T., Charlet-Berguerand, N., and Childs-Disney, J.L. (2012). A small molecule that targets r(CGG)(exp) and improves defects in fragile X-associated tremor ataxia syndrome. *ACS Chem. Biol.* *7*, 1711–1718.
- Entezam, A., Biacsi, R., Orrison, B., Saha, T., Hoffman, G.E., Grabczyk, E., Nussbaum, R.L., and Usdin, K. (2007). Regional FMRP deficits and large repeat expansions into the full mutation range in a new Fragile X premutation mouse model. *Gene* *395*, 125–134.
- Fénelon, K., Mukai, J., Xu, B., Hsu, P.K., Drew, L.J., Karayiorgou, M., Fischbach, G.D., Macdermott, A.B., and Gogos, J.A. (2011). Deficiency of *Dgcr8*, a gene disrupted by the 22q11.2 microdeletion, results in altered short-term plasticity in the prefrontal cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *108*, 4447–4452.

- Greco, C.M., Hagerman, R.J., Tassone, F., Chudley, A.E., Del Bigio, M.R., Jacquemont, S., Leehey, M., and Hagerman, P.J. (2002). Neuronal intranuclear inclusions in a new cerebellar tremor/ataxia syndrome among fragile X carriers. *Brain* 125, 1760–1771.
- Greco, C.M., Berman, R.F., Martin, R.M., Tassone, F., Schwartz, P.H., Chang, A., Trapp, B.D., Iwahashi, C., Brunberg, J., Grigsby, J., et al. (2006). Neuropathology of fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Brain* 129, 243–255.
- Gregory, R.I., Yan, K.P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432, 235–240.
- Hagerman, R.J., Leehey, M., Heinrichs, W., Tassone, F., Wilson, R., Hills, J., Grigsby, J., Gage, B., and Hagerman, P.J. (2001). Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. *Neurology* 57, 127–130.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Kim, Y.K., Jin, H., and Kim, V.N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* 18, 3016–3027.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Nam, J.W., Heo, I., Rhee, J.K., Sohn, S.Y., Cho, Y., Zhang, B.T., and Kim, V.N. (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 125, 887–901.
- Handa, V., Saha, T., and Usdin, K. (2003). The fragile X syndrome repeats form RNA hairpins that do not activate the interferon-inducible protein kinase, PKR, but are cut by Dicer. *Nucleic Acids Res.* 31, 6243–6248.
- Haramati, S., Chapnik, E., Sztainberg, Y., Eilam, R., Zwang, R., Gershoni, N., McGlenn, E., Heiser, P.W., Wills, A.M., Wirguin, I., et al. (2010). miRNA malfunction causes spinal motor neuron disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 13111–13116.
- Hashem, V., Galloway, J.N., Mori, M., Willemsen, R., Oostra, B.A., Paylor, R., and Nelson, D.L. (2009). Ectopic expression of CGG containing mRNA is neurotoxic in mammals. *Hum. Mol. Genet.* 18, 2443–2451.
- Hébert, S.S., Papadopoulou, A.S., Smith, P., Galas, M.C., Planel, E., Silahtaroglu, A.N., Sergeant, N., Buée, L., and De Strooper, B. (2010). Genetic ablation of Dicer in adult forebrain neurons results in abnormal tau hyperphosphorylation and neurodegeneration. *Hum. Mol. Genet.* 19, 3959–3969.
- Hoem, G., Raske, C.R., Garcia-Arocena, D., Tassone, F., Sanchez, E., Ludwig, A.L., Iwahashi, C.K., Kumar, M., Yang, J.E., and Hagerman, P.J. (2011). CGG-repeat length threshold for FMR1 RNA pathogenesis in a cellular model for FXTAS. *Hum. Mol. Genet.* 20, 2161–2170.
- Huang, T., Liu, Y., Huang, M., Zhao, X., and Cheng, L. (2010). Wnt1-cre-mediated conditional loss of Dicer results in malformation of the midbrain and cerebellum and failure of neural crest and dopaminergic differentiation in mice. *J. Mol. Cell. Biol.* 2, 152–163.
- Iwahashi, C.K., Yasui, D.H., An, H.J., Greco, C.M., Tassone, F., Nannen, K., Babineau, B., Lebrilla, C.B., Hagerman, R.J., and Hagerman, P.J. (2006). Protein composition of the intranuclear inclusions of FXTAS. *Brain* 129, 256–271.
- Jacquemont, S., Hagerman, R.J., Leehey, M., Grigsby, J., Zhang, L., Brunberg, J.A., Greco, C., Des Portes, V., Jardini, T., Levine, R., et al. (2003). Fragile X premutation tremor/ataxia syndrome: molecular, clinical, and neuroimaging correlates. *Am. J. Hum. Genet.* 72, 869–878.
- Jin, P., Zarnescu, D.C., Zhang, F., Pearson, C.E., Lucchesi, J.C., Moses, K., and Warren, S.T. (2003). RNA-mediated neurodegeneration caused by the fragile X premutation rCGG repeats in *Drosophila*. *Neuron* 39, 739–747.
- Jin, P., Duan, R., Qurashi, A., Qin, Y., Tian, D., Rosser, T.C., Liu, H., Feng, Y., and Warren, S.T. (2007). Pur alpha binds to rCGG repeats and modulates repeat-mediated neurodegeneration in a *Drosophila* model of fragile X tremor/ataxia syndrome. *Neuron* 55, 556–564.
- Kiliszek, A., Kierzek, R., Krzyzosiak, W.J., and Rypniewski, W. (2009). Structural insights into CUG repeats containing the ‘stretched U-U wobble’: implications for myotonic dystrophy. *Nucleic Acids Res.* 37, 4149–4156.
- Kiliszek, A., Kierzek, R., Krzyzosiak, W.J., and Rypniewski, W. (2011). Crystal structures of CGG RNA repeats with implications for fragile X-associated tremor ataxia syndrome. *Nucleic Acids Res.* 39, 7308–7315.
- Krol, J., Fiszer, A., Mykowska, A., Sobczak, K., de Mezer, M., and Krzyzosiak, W.J. (2007). Ribonuclease dicer cleaves triplet repeat hairpins into shorter repeats that silence specific targets. *Mol. Cell* 25, 575–586.
- Kumar, A., Fang, P., Park, H., Guo, M., Nettles, K.W., and Disney, M.D. (2011). A crystal structure of a model of the repeating r(CG) transcript found in fragile X syndrome. *ChemBioChem* 12, 2140–2142.
- Landthaler, M., Yalcin, A., and Tuschl, T. (2004). The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its *D. melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr. Biol.* 14, 2162–2167.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., and Kim, V.N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415–419.
- 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.
- Okamura, K., Hagen, J.W., Duan, H., Tyler, D.M., and Lai, E.C. (2007). The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell* 130, 89–100.
- Ruby, J.G., Jan, C.H., and Bartel, D.P. (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 448, 83–86.
- Schaefer, A., O’Carroll, D., Tan, C.L., Hillman, D., Sugimori, M., Llinas, R., and Greengard, P. (2007). Cerebellar neurodegeneration in the absence of microRNAs. *J. Exp. Med.* 204, 1553–1558.
- Schofield, C.M., Hsu, R., Barker, A.J., Gertz, C.C., Blelloch, R., and Ullian, E.M. (2011). Monoallelic deletion of the microRNA biogenesis gene *Dgcr8* produces deficits in the development of excitatory synaptic transmission in the prefrontal cortex. *Neural Dev.* 6, 11.
- Sellier, C., Rau, F., Liu, Y., Tassone, F., Hukema, R.K., Gattoni, R., Schneider, A., Richard, S., Willemsen, R., Elliott, D.J., et al. (2010). Sam68 sequestration and partial loss of function are associated with splicing alterations in FXTAS patients. *EMBO J.* 29, 1248–1261.
- Sobczak, K., de Mezer, M., Michlewski, G., Krol, J., and Krzyzosiak, W.J. (2003). RNA structure of trinucleotide repeats associated with human neurological diseases. *Nucleic Acids Res.* 31, 5469–5482.
- Sofola, O.A., Jin, P., Qin, Y., Duan, R., Liu, H., de Haro, M., Nelson, D.L., and Botas, J. (2007). RNA-binding proteins hnRNP A2/B1 and CUGBP1 suppress fragile X CGG premutation repeat-induced neurodegeneration in a *Drosophila* model of FXTAS. *Neuron* 55, 565–571.
- Stark, K.L., Xu, B., Bagchi, A., Lai, W.S., Liu, H., Hsu, R., Wan, X., Pavlidis, P., Mills, A.A., Karayiorgou, M., and Gogos, J.A. (2008). Altered brain microRNA biogenesis contributes to phenotypic deficits in a 22q11-deletion mouse model. *Nat. Genet.* 40, 751–760.
- Tan, H., Poidevin, M., Li, H., Chen, D., and Jin, P. (2012). MicroRNA-277 modulates the neurodegeneration caused by Fragile X premutation rCGG repeats. *PLoS Genet.* 8, e1002681.
- Tassone, F., Hagerman, R.J., Loesch, D.Z., Lachiewicz, A., Taylor, A.K., and Hagerman, P.J. (2000). Fragile X males with unmethylated, full mutation trinucleotide repeat expansions have elevated levels of FMR1 messenger RNA. *Am. J. Med. Genet.* 94, 232–236.
- Tassone, F., Iwahashi, C., and Hagerman, P.J. (2004). FMR1 RNA within the intranuclear inclusions of fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *RNA Biol.* 1, 103–105.
- Tassone, F., Adams, J., Berry-Kravis, E.M., Cohen, S.S., Brusco, A., Leehey, M.A., Li, L., Hagerman, R.J., and Hagerman, P.J. (2007). CGG repeat length correlates with age of onset of motor signs of the fragile X-associated

- tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* **144B**, 566–569.
- Wang, Y., Medvid, R., Melton, C., Jaenisch, R., and Blueloch, R. (2007). DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nat. Genet.* **39**, 380–385.
- Willemsen, R., Hoogeveen-Westerveld, M., Reis, S., Holstege, J., Severijnen, L.A., Nieuwenhuizen, I.M., Schrier, M., van Unen, L., Tassone, F., Hoogeveen, A.T., et al. (2003). The FMR1 CGG repeat mouse displays ubiquitin-positive intranuclear neuronal inclusions; implications for the cerebellar tremor/ataxia syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 949–959.
- Zeng, Y., and Cullen, B.R. (2005). Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences. *J. Biol. Chem.* **280**, 27595–27603.
- Zumwalt, M., Ludwig, A., Hagerman, P.J., and Dieckmann, T. (2007). Secondary structure and dynamics of the r(CGG) repeat in the mRNA of the fragile X mental retardation 1 (FMR1) gene. *RNA Biol.* **4**, 93–100.

EXTENDED EXPERIMENTAL PROCEDURES**Constructs**

Plasmids expressing 20, 40 or 60 CGG repeats were constructed by ligation of oligonucleotides containing 20 CGG repeats in pcDNA3.1 digested by Afl2/Xba1. Ectopic pri-miR-124-2, pri-mir-125-b1, pri-miR-26-a1, pri-miR-146 and pri-miR-206 were obtained by PCR on genomic human DNA and cloned into pcDNA3.1 digested by BamHI and XbaI. HIS-DGCR8 Δ corresponding to amino acid 505 to 706 was obtained by PCR on FLAG-DGCR8 and cloned into pet28a digested by NdeI and HindIII. Flag tagged wild-type or mutant DGCR8, deleted for its double stranded RRM (DG 1-483), were kind gift of Prof. Narry Kim (University of Seoul).

In Vitro RNA Transcription

Plasmids containing expanded CGG repeats and pri-miRNA were linearized by XbaI and 100ng were radioactively labeled by run-off in vitro transcription using T7 transcription kit (Ambion) supplemented with 1.0 μ l of α P³²-ATP (800 Ci/mol; PerkinElmer, Waltham, MA). Non-labeled transcripts were synthesized using the Megascript T7 kit (Ambion). Plasmid containing expanded CUG repeats (CUG 95x, gift from Joelle Marie) was linearized by HindIII and transcribed using the Megascript SP6 kit (Ambion). After transcription, 1 unit of DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA) was added, and the sample was incubated for additional 30 min at 37°C. Transcribed RNAs were then purified by gel electrophoresis on a denaturing 6% polyacrylamide gel. The RNAs were isolated and extracted into 300 mM NaCl by tumbling overnight at 4°C. The resulting solution was concentrated with 2-butanol, and the RNA was ethanol precipitated. The RNAs were then resuspended in 50 μ l of NANOpure water and quantified with LS-6500 counter (Beckman).

Recombinant Protein Production and Purification

E. coli BL21(RIL) pRARE competent cells (Invitrogen) were transformed with pet28a-DGCR8 Δ (containing amino acids 505 to 706 of human DGCR8), grown at 37°C in 400 ml of LB medium supplemented with Kanamycin until OD₆₀₀ = 0.5. 0.5 mM IPTG was added and the culture was further incubated 4 hr at 30°C. Harvested cells were sonicated in 50 mM Tris-Cl pH 7.5, 300 mM NaCl, 5% glycerol, 1 mM DTT, 5 mM EDTA, centrifuged 20 min at 20000 g and recombinant HIS-DGCR8 Δ protein was purified using HIS-Kits (Novagen).

Gel Shift Assays

1.0 μ l of labeled RNA was annealed in binding buffer (BB, 50 mM Tris-HCl (pH 7.0), 75.0 mM NaCl, 37.5 mM KCl, 5.25 mM DTT, 0.1 mg/mL BSA, 0.1 mg/mL Bulk tRNA) at 90°C for 5 min. and allowed to cool to room temperature by placing on a bench top. After cooling, MgCl₂ and RNasin were added to a final concentration of 7.5 mM and 0.4 U/ μ L respectively. DGCR8 Δ protein was then added to the above solution and the mixture was incubated on ice for 20 min. The solution mixture was supplemented with 2 μ l of 6X loading buffer (6X LB, 40% (v/v) glycerol, 0.125% (w/v) Bromophenol Blue, and 0.125% (w/v) Xylene cyanol) and was loaded onto a non-denaturing 3.0% (w/v) polyacrylamide gel (acrylamide/bisacrylamide, 29:1, w/w) containing 0.5% agarose made in 0.5X TBE (1X TBE is 90 mM Tris-base, 89 mM Boric acid and 2 mM EDTA (pH 8.0)), which had been pre-electrophoresed at 110 V for 1 hr at room temperature. The gel was electrophoresed at 110 V at room temperature for 30 min. The gel was then dried and exposed to a phosphorimager screen and imaged using a Typhoon 9410 variable mode imager. Competition assays were performed with adding a 10, 30, 100, 300, 900-fold excess of non-radioactively labeled RNA containing either 60 CGG repeats or 100 CUG repeats. The data were fit to the following equation: $y = \min + ((\max - \min) / (1 + (x / IC_{50})^{-HillSlope}))$ where y is the percentage of RNA bound to DGCR8, x is the concentration of DGCR8, min and max are the minimum and maximum percentage of RNA bound to DGCR8 (0%–100%) and IC₅₀ is the concentration where 50% of maximum binding is achieved.

UV-Crosslinking Assays

0.5 to 1 μ g of recombinant HIS-DGCR8 Δ protein was incubated 15 min at 30°C with 10,000 cpm of radiolabeled transcript and, if indicated, non-labeled transcript in 10 μ l of 100 mM NaCl, 20 mM HEPES, 8 mM MgCl₂, 0.1 mg/ml BSA, 0.1 mg/ml heparin and 0.5 mM DTT. Reactions were transferred on parafilm and irradiated 5 min, on ice, at 2.5 cm of a UV lamp (Vilberlomat VL-100C). 1 μ g of RNase A1 was added and incubated 30 min at 37°C. RNA-protein complexes were resolved on 10% SDS-PAGE, coomassie labeled and analyzed using BAS-MS imaging plate (Fuji) and Typhoon 8600 imager (Molecular Dynamics).

Western Blotting Analysis

Proteins were denatured 3 min at 95°C, separated on 7 or 10% SDS-PAGE gel, transferred on nitrocellulose membranes (Whatman Protan), blocked with 5% non-fat dry milk (NFM) in Tris Buffer Saline buffer (TBS), incubated with rabbit anti-DGCR8 (Proteintech 10996-1-AP), anti-Drosha (Abcam AB12286), or mouse anti-GAPDH (Abcam AB8245) in TBS-5% NFM, washed 3 times and incubated with Donkey-anti-rabbit Peroxidase antibody (Jackson ImmunoResearch, 1:10000) 1 hr in TBS-5% NFM, followed by autoradiography using the ECL chemoluminescence system (ThermoFisher).

Northern Blotting Analysis

COS7 cells were co-transfected with pcDNA3.1 containing ectopic pri-miRNA and pcDNA3.1 expressing expanded CGG or CUG repeats using FugenHD reagent (Roche). 24 hr after transfection, total RNA was isolated by TriReagent (Molecular Research Center), DNaseI treated, phenol-chloroform extracted and ethanol precipitated. 40 µg of total RNA were electrophoresed on a 12% polyacrylamide 8M urea gel in 1 X TBE, transferred on Hybond N+ nylon membrane (Amersham Biosciences), cross-linked 4 min (Viberlomat VL-100C), pre-hybridized 90 min at 42°C in SSPE 6x, SDS 0.1%, Denhardt 2x, hybridized over night at 42°C with 50 ng of antisense γ P³²-ATP labeled probe, washed 3 times in SSPE 6x, SDS 0.1% and revealed using BAS-MS imaging plate (Fuji) and Typhoon 9600 imager.

Drosophila Lifespan Assay

All *Drosophila* experiments were performed on standard food in 25°C incubators unless otherwise noted. The flies used were as follows: UAS-(CGG)90-eGFP (kindly provided by Peng Jin^{8,11,13}), gene switch Tubulin-Gal4 (Tub5-Gal4) driver flies (kindly provided by Scott Pletcher). Pasha RNAi (P{TRiP.JF02062}attP2, line 26293) and Drosha RNAi (P{TRiP.JF02784}attP2, line 27704) lines were obtained from Bloomington *Drosophila* Stock Center and knockdown was confirmed by qRT-PCR. Flies with desired genotypes were collected within 0-3 days after eclosion, then were transferred to standard fly food containing 200 µM RU486 without yeast granules. The flies were transferred to fresh food with drug every 5 days. Each genotype started with 4 vials of 25flies/vial (2 vials of males and 2 vials of females) and the survival was determined daily until all flies were dead. As male and female flies demonstrated similar survival patterns, the results from the 4 vials were pooled and plotted as survival curve. The genotypes of the flies used in the study were as follows: control: Tub5-Gal4/+. SiPasha: Tub5-Gal4/+; P{TRiP.JF02062}attP2/+. CGG 90X: UAS-(CGG)90-eGFP/+; Tub5-Gal4/+. CGG 90X + siPasha: Tub5-Gal4/+; P{TRiP.JF02062}attP2/Tub5-Gal4. SiDrosha: Tub5-Gal4/+; P{TRiP.JF02784}attP2/+. CGG 90X +siDrosha: Tub5-Gal4/+; P{TRiP.JF02784} attP2/Tub5-Gal4. Further method information can be found in PLoS Genet. 2010 Dec 9;6(12):e1001240. Histone deacetylases suppress CGG repeat-induced neurodegeneration via transcriptional silencing in models of fragile X tremor ataxia syndrome. Todd PK, Oh SY, Krans A, Pandey UB, Di Prospero NA, Min KT, Taylor JP, Paulson HL.

Oligonucleotides

Cloning

Restrictions sites are underlined:

miR-26-a2 FW: AAAGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGGA
 miR-26-a2 REV: AAATCTAGACTCGAGCAGGCTTCCAATG
 miR-124-1 FW: AAAGGATCCAAGGATGGGGGAGAAACAAA
 miR-124-1 REV: AAATCTAGATTGCATCTCTAAGCCCCCTG
 miR-124-2 FW: AAAGGATCCTAGGCGTGTGCTGTAATG
 miR-124-2 REV: AAATCTAGACGAACACTAGGTTGCTTCC
 miR-146-b FW: AAAGGATCCGGAACCTCCTGTCCATTTC
 miR-146-b REV: AAATCTAGATGCATGCTCGAGGAAGTTG

Pri-miRNA Quantification

Pri-454 FWD: CTGATTTCCAAGGCTTCCAG
 Pri-454 REV: TGATAGGGTTCTAGGATCTGGTG
 Pri-26-1 FWD: ATCCTGGCTGTGCTGTGATA
 Pri-26-1 REV: CCCGTGCAAGTAACCAAGA
 Pri-190 FWD: ATCGGAGTTGCTGCAAAAGT
 Pri-190 REV: TATTAGGAACCCCCGGAGAC
 Pri-220 FWD: GACACCAGGTGGTTGAGGTC
 Pri-220 REV: GAGGCCTAGAACTGCGACTG
 Pri-32 FWD: CATTGCAATTGGGTTTTCA
 Pri-32 REV: ATTGCATTGAGCCGTGAC
 Pri-590 FWD: GTGCACGCTGTCTTGAGT
 Pri-590 REV: GCTGCATGTTCAATCAGAGAC

mRNA Quantification

DLEU2 FWD: GCAGAGAACCAATTCTGGAG
 DLEU2 REV: AAAGTAAGAATTGCTGAGCTA
 ABLIM2 FWD: GCAGAGAACCAATTCTGGAG
 ABLIM2 REV: AAAGTAAGAATTGCTGAGCTA
 TLN2 FWD: AGACATCATCACCTGAAGAAT
 TLN2 REV: GCCGTCAACATATCTGACAC
 CTDSPL FWD: TTTCTTGCTGCTACCG
 CTDSPL REV: GAGGCTGCAATGGGATG

FAM33 FWD: ATCTCACGTGCCAGATTTAT
FAM33 REV: TCCAGTCATTGAAGCCAAAC
RPLP0 FWD: GAAGTCACTGTGCCAGCCCA
RPLP0 REV: GAAGGTGTAATCCGTCTCCA

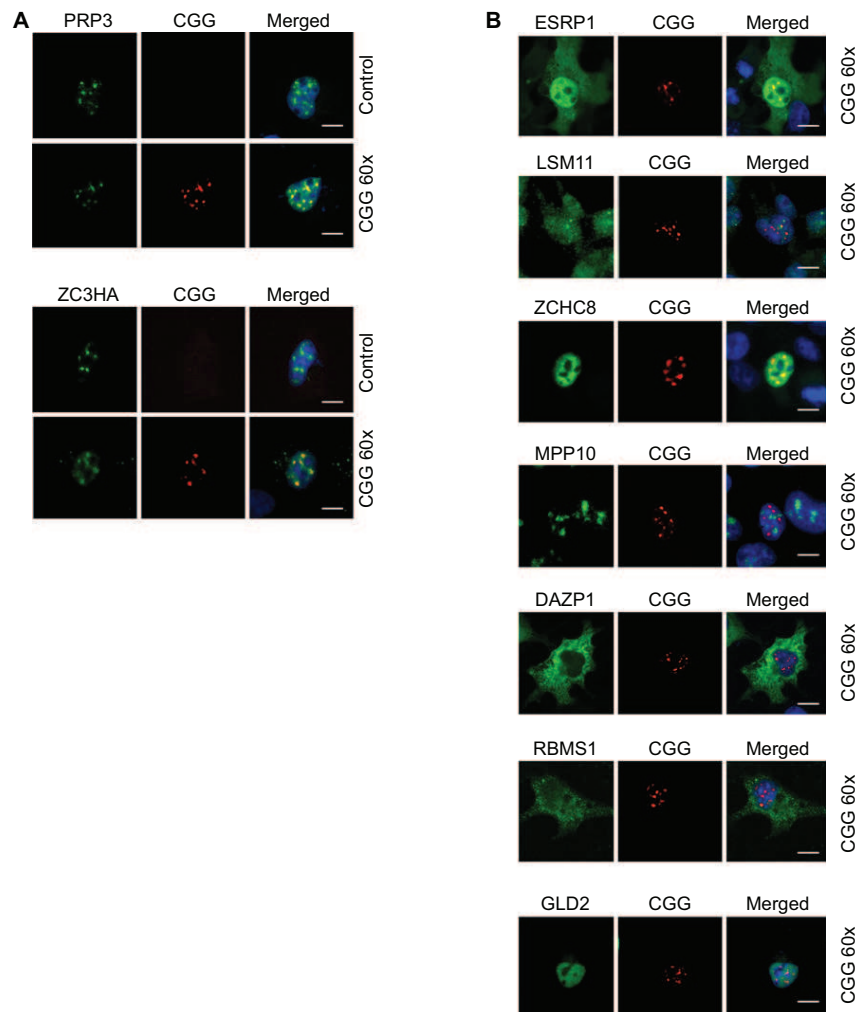


Figure S1. Proteins Binding and Localizing with Expanded CGG Repeats, Related to Figure 1

(A and B) Proteins found to associate preferentially with expanded (60x) CGG repeats by nanoLC-MS/MS were tested for co-localization with aggregates of CGG repeats in COS7 cells transfected with a pCDNA3.1 plasmid expressing either no (CTL) or 60 CGG repeats and were analyzed 24 hr later by RNA FISH using a CGG_{60x}-Cy3 DNA probe followed by immunofluorescence against the protein of interest. Note that PRP3 or ZC3HA are naturally localized in speckles nuclear structures (A); while the other protein tested present diffuse nucleoplasmic localizations (B). Nuclei are labeled by DAPI staining. Magnifications, 630x.

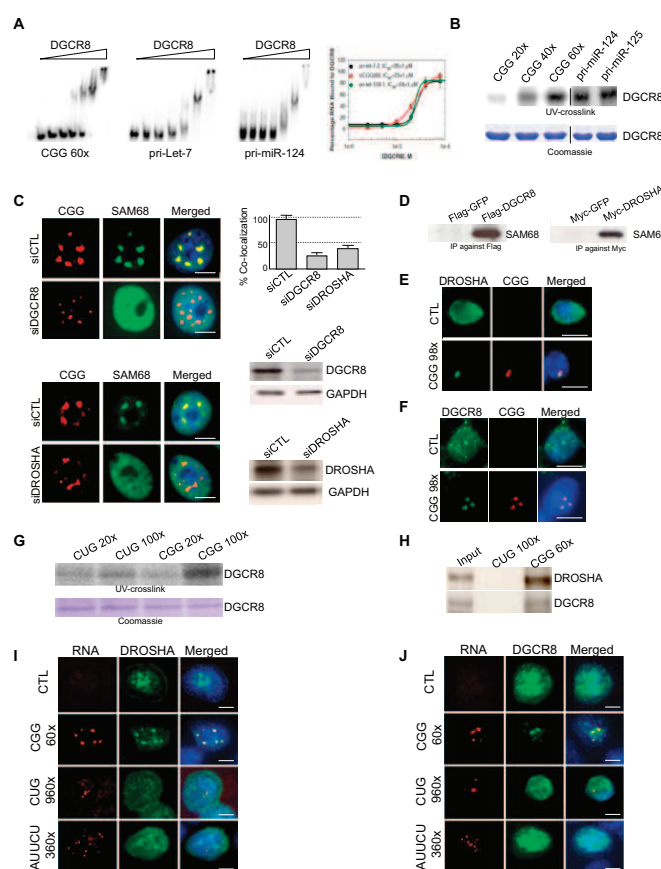


Figure S2. DROSHA and DGCR8 Associate Specifically with Expanded CGG Repeats and Recruit SAM68, Related to Figure 2

(A) Gel-shift quantification demonstrates similar binding of purified recombinant HIS-tagged DGCR8Δ to in vitro radioactively labeled pri-Let-7-a2, pri-miR-124-2 or to 60 CGG repeats RNAs.

(B) UV-cross-linking binding assays of 0.5 μg of His-DGCR8Δ with 10,000 CPM of uniformly [α - 32 P] internally labeled in vitro transcribed pri-miR-124-2, pri-miR-125-b1, CGG 20x, 40x or 60x RNAs.

(C) Depletion of either DROSHA or DGCR8 reduces the recruitment of SAM68 within CGG RNA aggregates. Left panel, RNA FISH using a CCG8x-Cy3 DNA probe coupled to immunofluorescence using an antibody directed against SAM68 (santacruz SC333, 1/100) of COS7 cells co-transfected 24 hr with a plasmid expressing 60 CGG repeats and a siRNA directed against either the luciferase (siCTL), DGCR8 (5'-AACCAUCGGACAAGAGUGUGAUTT-3') or DROSHA (5'-AACGAGUAGGCCUUCUGACUUTT-3'). Nuclei are labeled by DAPI staining. Magnifications, 630x. Scale bars, 10 μm. Right upper panel, quantification of SAM68 colocalization within CGG aggregates. Right middle and lower panel, Western blotting against either DROSHA (Abcam AB12286) or DGCR8 (ProteinTech 10996-1-AP) demonstrate the efficiency of siRNA depletion of DROSHA or DGCR8.

(D) Co-immunoprecipitation assays demonstrate binding of SAM68 to DROSHA-DGCR8. Left panel, COS7 cells were co-transfected with a plasmid expressing either Flag-tagged DGCR8 or Flag-GFP (negative control) and total protein extract was immunoprecipitated using an antibody directed against the Flag tag in presence of RNase A, 150 mM NaCl, 20 mM HEPES, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT. Immunoprecipitated proteins were tested for presence of SAM68 by Western blotting (santacruz SC333, 1/100). Right panel, identical experiment performed with a plasmid expressing either Myc-tagged DROSHA or Myc-tagged GFP as control.

(E and F) RNA FISH against CGG repeats, coupled to immunofluorescence against DROSHA or DGCR8, on brain sections (hippocampal area) of KI mouse expressing either control 8 CGG repeats or expanded 98 CGG repeats. Nuclei are labeled by DAPI staining. Magnifications, 630x. Scale bars, 10 μm.

(G) UV-crosslinking assays demonstrate preferential binding of DGCR8 to expanded CGG repeats compared to expanded CUG repeats. 1 μg of purified recombinant HIS-tagged DGCR8Δ was incubated with in vitro radioactively labeled RNA containing either 20 CUG repeats, 100 CUG repeats, 20 CGG repeats or 100 CGG repeats in 150 mM NaCl, 20 mM TRIS PH7.5, 8 mM MgCl₂; exposed to UV 254nm light, treated with RNases and separated on SDS page. Upper panel, phosphorImager exposition. Lower panel, coomassie staining.

(H) 300 μg of nuclear proteins extracted from whole wild-type mouse brain were captured on streptavidin resin coupled to biotinylated in vitro synthesized RNA composed of 100 CUG repeats or of 60 CGG repeats, washed with 300 mM NaCl, 20 mM HEPES, 2 mM MgCl₂, eluted, separated on SDS gel and analyzed by Western blotting using antibodies against DROSHA (Abcam AB12286) or against DGCR8 (ProteinTech 10996-1-AP).

(I) RNA FISH coupled to immunofluorescence analyzes demonstrate preferential recruitment of DROSHA and DGCR8 within CGG RNA aggregates compared to CUG or AUUCU RNA aggregates. COS7 cells were transfected with a plasmid expressing either no repeats (CTL), 60 CGG repeats, 960 CUG repeats or 360 AUUCU repeats and analyzed 24 hr after transfection by RNA FISH using a CCG8x- or CAG8x- or TAAGA8x-Cy3 DNA probe coupled to immunofluorescence using an antibody directed either against DROSHA (Abcam AB12286). Nuclei are labeled by DAPI staining. Magnifications, 630x. Scale bars, 10 μm.

(J) RNA FISH coupled to immunofluorescence analyzes on transfected cells similarly as panel (I), but immunofluorescence was performed using an antibody directed against DGCR8 (Sigma HPA019965).

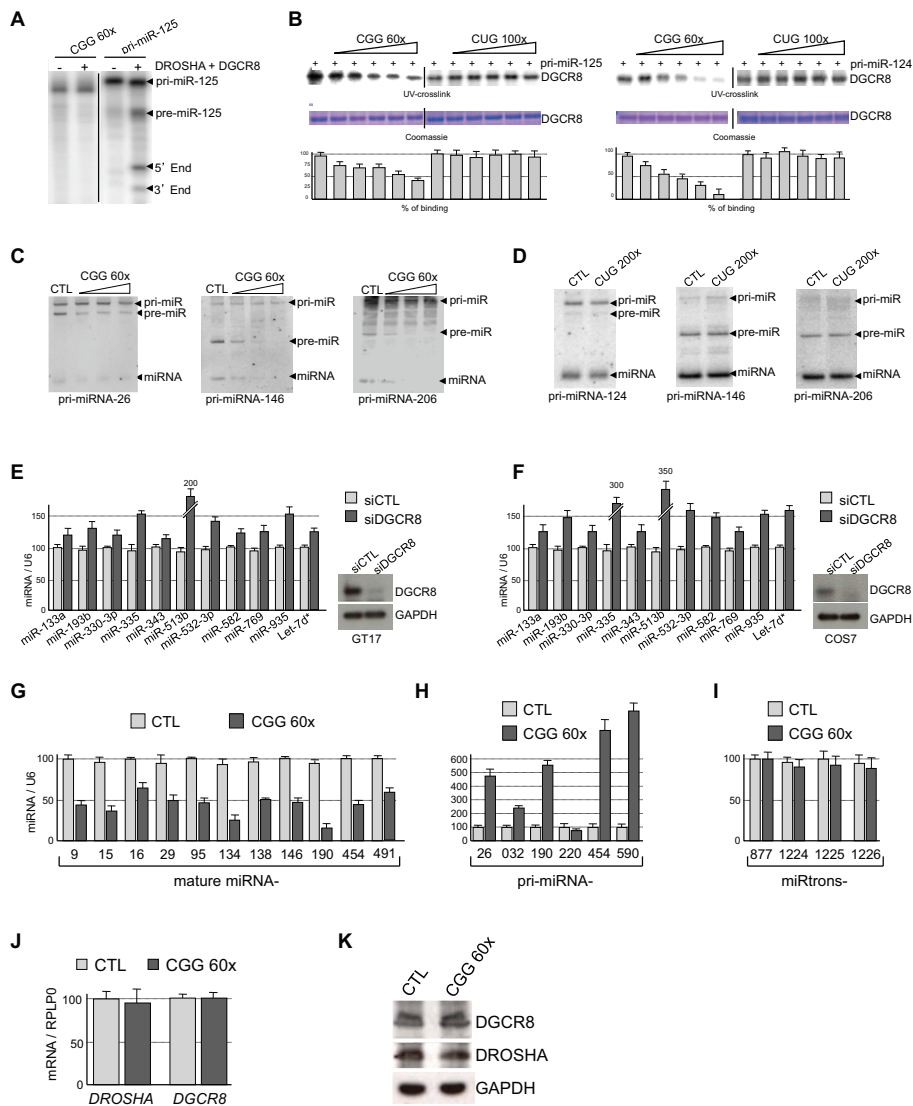


Figure S3. Expanded CGG Repeats Alter the Biogenesis of Pri-miRNAs, Related to Figure 3

(A) In vitro processing assay of 10000 CPM of in vitro synthesized and radioactively labeled RNA containing either 60 CGG repeats or pri-miR-125-b1 in presence of immunoprecipitated Flag-DROSHA and Flag-DGCR8 from transfected HEK293 cells.

(B) Upper panel, UV-cross-linking binding of 0.5 μ g of His-DGCR8 Δ to 10,000 CPM of uniformly [α - 32 P] internally labeled in vitro transcribed pri-miR-125-b1 (left panel), or to pri-miR-124-2 (right panel) was competed by increasing amounts (0.4, 0.8, 2.5, 5 and 10 μ M) of unlabeled RNA containing 100 CUG or 60 CGG repeats. Middle panel, equal loading was verified by Coomassie staining. Lower panel, quantification of DGCR8 binding to pri-miRNA-124 or pri-miRNA-125. Error bars indicate standard deviation.

(C) 20 μ g of total RNA extracted from COS7 cells co-transfected with a plasmid expressing pri-miR-26, pri-miR-146 or pri-miR-206 and increasing amounts of a plasmid expressing 60 CGG repeats were analyzed by northern-blotting using a miR-26, a miR-146 or a miR-206 γ P 32 -labeled antisense probe.

(D) Northern-blotting analyses of transfected cells as in panel C but using a plasmid expressing pri-miR-124, pri-miR-146 or pri-miR-206 and either a plasmid expressing no repeats (CTL) or 200 CUG repeats.

(E) GT17 neuronal cells were transfected 24 hr with a siRNA directed against either the luciferase (siCTL) or against DGCR8 (5'-AACAU CGGACAAGAGUGU GAUTT-3'). Left panel, quantitative RT-PCR of miRNAs relative to U6 snRNA. Error bars indicate standard deviation. Right panel, Western blotting against DGCR8 (ProteinTech 10996-1-AP) demonstrates the efficiency of siRNA depletion. Note that most of miRNAs were down-expressed upon DGCR8 depletion, and that only a minority (~10) of miRNAs, which is shown here, was upregulated.

(F) Similar to panel E, but COS7 cells were transfected 24 hr with a siRNA directed against either the luciferase (siCTL) or against DGCR8.

(G-I) Quantitative RT-PCR of RNA extracted from COS7 cells transfected 24 hr with a plasmid expressing either no (CTL) or 60 CGG repeats. Quantities of miRNAs (G), pri-miRNAs (H) and miRtrons (I) are relative to U6 snRNA. Error bars indicate standard deviation.

(J) COS7 cells were transfected 24 hr with a plasmid expressing either no (CTL) or 60 CGG repeats and expressions of *DROSHA* and *DGCR8* mRNAs were quantified by RT-qPCR. Quantities of *DROSHA* and *DGCR8* mRNAs are relative to *RPLP0*. Error bars indicate standard deviation.

(K) Similar to panel J, but expression of *DROSHA* or *DGCR8* was quantified by Western blotting (*DROSHA*: Abcam AB12286; *DGCR8*: ProteinTech 10996-1-AP).

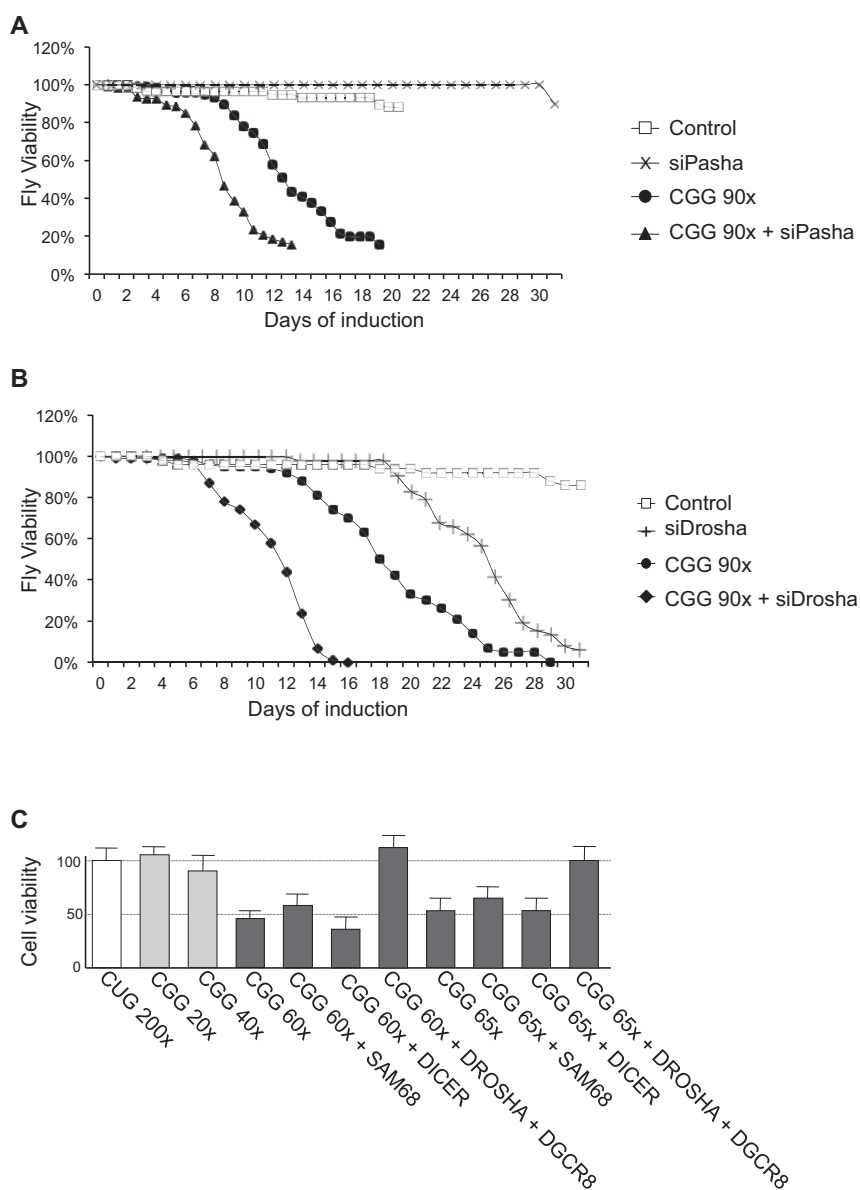


Figure S4. Pasha or Drosha Depletion Aggravates CGG Toxicity in Fly, Related to Figure 5

(A) Adult *Drosophila* expressing a Tubulin Geneswitch driver alone (control), with uas-(CGG)90eGFP (CGG 90x), uas-Pasha RNAi (siPasha), or both were transferred to food containing RU-486 to activate expression of the ubiquitous driver at 0-3 days post eclosion. Data is expressed as % survival over days. N = 100/genotype.

(B) Adult *Drosophila* expressing a Tubulin Geneswitch driver alone (control), with uas-(CGG)90eGFP (CGG 90x), uas-Drosha RNAi, or both were transferred to food containing RU-486 to activate expression of the ubiquitous driver at 0-3 days post eclosion. Data is expressed as % survival over days. N = 100/genotype.

(C) COS7 cells were co-transfected with a plasmid expressing either 200 CUG repeats, 20 CGG, 40 CGG, 60 CGG or 65 CGG repeats alone, or 60 or 65 CGG repeats plus a plasmid expressing either GFP (CTL), GFP-SAM68, FLAG-DICER, FLAG-DROSHA and/or FLAG-DGCR8. Cell viability was quantified 24 hr after transfection using the tetrazolium salt/formazan method (CellTiter 96 Aqueous One Solution, Promega). Error bars indicate standard deviation.

ANNEXE 2

Publication 4 en préparation:

**RBFOX proteins chase MBNL1 from CCUG RNA
aggregates and alleviate symptoms of
myotonic dystrophy type 2.**

Sellier Chantal, Freyermuth Fernande, Blatter Markus, Mario Siritto, Fugier Charlotte, Caroline Hammer, Ruffenach Frank, Page Adeline, Puymirat Jack, Udd Bjarne, Meola Giovanni, Schoser Benedikt, Bassez Guillaume, Sarkar Partha, Allain Frédéric, Krahe Ralf, Bergmann Andreas, Furling Denis, Charlet-Berguerand Nicolas

Les dystrophies myotoniques de type 1 et de type 2 se distinguent par la séquence, la taille et le type de répétitions. En effet, les DM1 sont dues à des expansions de 100 à plusieurs milliers de répétitions CTG, alors que les DM2 sont dues à plusieurs dizaines de milliers de répétitions CCTG. De plus, ces maladies se distinguent également par la sévérité de leurs symptômes. Ainsi, les symptômes de la DM2 sont globalement moins sévères et plus tardifs que ceux de la DM1. Cette observation met en évidence un paradoxe. En effet, si les symptômes des DM sont dus à une séquestration des protéines MBNL, une augmentation de la taille des répétitions devrait conduire à une plus grande sévérité. Ainsi, on observe une sévérité accrue de la forme CDM en comparaison à la forme DM1, mais l'absence de corrélation entre la taille et la sévérité entre forme DM1 et DM2 remet en question ce modèle. Cette observation suggère donc qu'un mécanisme moléculaire inconnu module la sévérité des symptômes chez les patients DM1 ou DM2.

Nous avons recherché de nouvelles protéines pouvant lier spécifiquement les expansions de répétitions CUG ou CCUG. Nous avons ainsi identifié que les facteurs d'épissage RBFOX1, RBFOX2 et RBFOX3 lient spécifiquement les répétitions CCUG et non les répétitions CUG. Toutefois, l'absence d'altération d'épissage des ARNm cibles des protéines RBFOX chez les patients DM2 indiquent que ces protéines ne sont pas séquestrées par les répétitions CCUG. Nous avons alors recherché quelles pourraient être les conséquences du recrutement des protéines RBFOX sur les agrégats d'ARN CCUG. Des expériences *in vitro* et *in cellulo* montrent que RBFOX1 compète la liaison de MBNL1 aux répétitions CCUG et allège ainsi la séquestration de MBNL1. Enfin, la surexpression de RBFOX1 dans l'œil de drosophiles exprimant des répétitions CCUG restaure un phénotype normal. Ces résultats suggèrent que les protéines RBFOX, en chassant les protéines MBNL des agrégats CCUG, participent à la moindre sévérité des symptômes des patients DM2.

Ma contribution à ce travail fut d'identifier la présence d'une protéine, RBFOX, liant spécifiquement les répétitions CCUG et non les ARNs CUG. Puis, j'ai montré par des tests *in vitro* que l'interaction de RBFOX avec les répétitions CCUG est spécifique. Enfin, des tests de liaisons montrent que RBFOX compète la liaison de MBNL1 aux répétitions CCUG. Ces résultats suggèrent que RBFOX pourrait contribuer à diminuer la quantité de protéines MBNL1 séquestrées chez les patients DM2.

rbFox proteins chase MBNL1 from CCUG RNA aggregates and alleviate symptoms of myotonic dystrophy type 2.

Sellier Chantal^{1,2}, Freyermuth Fernande¹, Blatter Markus³, Mario Sirito⁴, Fugier Charlotte¹, Caroline Hammer¹, Ruffenach Frank¹, Page Adeline¹, Puymirat Jack⁵, Udd Bjarne⁶⁻⁸, Meola Giovanni⁹, Schoser Benedikt¹⁰, Bassez Guillaume¹¹, Sarkar Partha¹², Allain Frédéric³, Krahe Ralf⁴, Bergmann Andreas¹³, Furling Denis¹⁴, Charlet-Berguerand Nicolas^{1#}

1. IGBMC, INSERM U964, CNRS UMR7104, University of Strasbourg, Illkirch, France.
2. College de France, France.
3. Institute for Molecular Biology and Biophysics, Swiss Federal Institute of Technology (ETH) Zurich, Zurich, Switzerland.
4. Department of Genetics, University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA.
5. Human Genetics Research Unit, Laval University, CHUQ, Ste-Foy, Quebec, Canada.
6. Neuromuscular Research Center, Tampere University, Tampere, Finland.
7. Folkhälsan Institute of Genetics, Department of Medical Genetics, Helsinki University.
8. Department of Neurology, Vasa Central Hospital.
9. Department of Neurology, University of Milan, IRCCS Policlinico San Donato, Italy
10. Friedrich Baur Institute, Ludwig Maximilian University, Munich, Germany.
11. INSERM U841, Mondor Biomedical Research Institute, Faculty of Medicine Paris XII, Paris, France.
12. Department of Neurology, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, USA.
13. Department of Cancer Biology, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA, USA.
14. Université Pierre et Marie Curie-Paris6 UMRS974, INSERM U974, CNRS UMR7215, Institut de Myologie, 75013 Paris, France.

Correspondence to: Nicolas Charlet-Berguerand, Department of Translational Medicine, IGBMC, 1 rue Laurent Fries, Illkirch, F-67400, France. Phone: +33 388 653 309, Fax: +33 388 653 201, Email: ncharlet@igbmc.fr

ABSTRACT:

Myotonic dystrophy (DM) is the most common muscular dystrophy in adults and the first recognized example of a RNA-mediated disease, in which mutant RNAs containing expanded CUG or CCUG repeats sequester the splicing regulator MBNL1 and interfere with the splicing of other pre-mRNAs. Myotonic dystrophy encompasses two genetically distinct entities, DM1 and DM2, which are caused by expanded CTG and CCTG repeats, respectively. An important difference between these two forms is that DM2 follows a more favorable clinical course than DM1. A puzzling observation since DM2 is characterized by higher size of expanded repeats compared to DM1 and which suggests that a yet unknown mechanism modulates the severity of DM pathologies. Searching for novel RNA binding proteins involved in DM, we identified that the rbFOX1 and rbFOX2 proteins bind to CCUG (DM2), but not to CUG (DM1), expanded repeats. Importantly, rbFOX1 competes the binding of MBNL1 to CCUG expanded repeats and alleviates the sequestration of MBNL1 from CCUG RNA aggregates both *in vitro* and in primary culture of muscle cells from DM2 patients. Finally, overexpression of rbFOX1 reduces eye degeneration in a novel *Drosophila* model of DM2. We propose that rbFOX proteins by releasing MBNL1 from CCUG RNA aggregates, participate to the lesser severity of DM2 compared to DM1.

INTRODUCTION

Myotonic dystrophy is the most common adult-onset muscular dystrophy and comprises two genetically distinct forms. Myotonic dystrophy of type 1 (DM1) and its severe congenital form (CDM1) are caused by a CTG-repeat expansion in the 3' untranslated region of the *DMPK* gene¹⁻³. In contrast, myotonic dystrophy of type 2 (DM2) is caused by an expansion of CCTG repeats within the first intron of the *ZNF9* (also known as *CNBP*) gene⁴. DM pathologies are RNA gain-of-function diseases caused by the expression of mutant RNAs containing hundred to thousand of CUG or CCUG repeats that interfere with the splicing of other pre-mRNAs through dysfunction of two classes of RNA binding proteins⁵⁻⁷. Muscleblind-like 1 and muscleblind-like 2 (MBNL1 and MBNL2) are sequestered within nuclear RNA aggregates formed by expanded CUG and CCUG repeats⁸⁻¹⁰, whereas expression of the CUG-binding protein 1 (CUGBP1) is increased in DM1 heart samples¹¹ and in DM2 muscle cells¹²⁻¹³. MBNL1, MBNL2 and CUGBP1 are RNA splicing factors, and alterations of their functional levels in myotonic dystrophic tissues results in reversion to embryonic splicing patterns for several mRNAs, such as the insulin receptor (*INSR*), the muscle chloride channel (*CLCN1*), the Amphiphysin2 (*BINI*) and the muscle calcium channel *CAV1.1* (*CACNA1S*), contributing to the insulin resistance, myotonia and muscle weakness observed in DM patients, respectively¹⁴⁻¹⁸.

DM2 closely resembles adult-onset DM1 with autosomal dominant inheritance pattern and similar clinical features, including progressive muscle weakness, myotonia, cardiac arrhythmias and conduction defects, posterior subcapsular iridescent cataract, insulin resistance, hypogammaglobulinemia as well as some cognitive and personality changes¹⁹⁻²⁴. Despite these striking similarities, there are clear differences between DM1 and DM2, including preferential type 2 muscle fibers atrophy in DM2 versus type 1 muscle fibers atrophy in DM1, predominant proximal muscle weakness in DM2 versus distal muscle weakness in DM1, muscle and joint pain in DM2 and absence of congenital and childhood-onset forms of DM2. One further and important distinction is that the clinical course is usually more favorable in DM2 compared to DM1, with an onset of the disease that occurs rarely before 40 years and with symptoms considered generally as milder in DM2 compared to DM1, including slower and less severe progression of the disease, reduced severity of the cardiac involvement, no prominent late weakness of the respiratory, facial and bulbar muscles, less evocable myotonia and preserved social and cognitive abilities¹⁹⁻²⁴. Importantly, these milder features are in contradiction with the average size of expanded repeats being

higher in DM2 (up to ~11 000 CCUG repeats) than in adult-onset DM1 (up to ~1 000 CUG repeats). These data suggest the existence of both common and distinct mechanisms involved in the pathogenesis of DM1 and DM2.

Searching for novel RNA binding proteins that interact with either CUG or CCUG expanded repeats, we identified that the RNA binding proteins, rbFOX1 and rbFOX2, bind specifically to CCUG expanded repeats. The family of rbFOX proteins comprises three members, rbFOX1 (also named Fox-1, A2BP1, HRNBP1), rbFOX2 (Fox-2 RBM9, Fxh, HRNBP2) and rbFOX3 (Fox-3, NeuN, HRNBP3), which are involved in the regulation of a subset of alternative splicing events²⁵⁻³⁴. rbFOX2 is widely distributed, rbFOX1, like MBNL1, is enriched in skeletal muscle, heart and brain, while rbFOX3 expression is restricted to neuronal cells. All three rbFOX proteins possess an identical or near-identical RNA-binding domain, of the RRM type, that recognizes the UGCAUGY consensus sequence. Here, we demonstrated that the rbFOX1 and rbFOX2 proteins bind specifically to CCUG, but not to CUG, expanded repeats *in vitro*, *in cellulo* and in DM patient muscle biopsies. Next, we found that rbFOX1 competes the binding of MBNL1 to CCUG expanded repeats and alleviates the sequestration of MBNL1 from CCUG RNA aggregates both *in vitro* and in primary culture of muscle cells from DM patients. Finally, overexpression of rbFOX1 reduces eye degeneration in a novel *Drosophila* model of DM2. We propose that the rbFOX proteins, by modulating the sequestration of MBNL1 within CCUG RNA aggregates, are involved in the lesser severity of the type 2 of Myotonic Dystrophy.

RESULTS

Identification of proteins associated specifically with expanded CCUG repeats.

Decreased severity in DM2 compare to DM1, despite higher number of repeats, raises the hypothesis that other RNA binding proteins, beyond MBNL1 and CUGBP1, are involved in DM. To test this hypothesis, 32P-labeled RNAs containing expanded CUG or CCUG repeats were incubated with nuclear extract of differentiated C2C12 muscle cells and analyzed by UV-light crosslink followed by SDS page gel electrophoresis (Figure 1A). Consistent with previous reports^{8,35}, a UV-crosslink signal around 42-45 kDa, corresponding to MBNL1 size, was evident in both CUG and CCUG RNAs. In contrast, a signal at ~40 kDa was evident only in CCUG expanded repeats (Figure 1A). This ~40 kDa UV-crosslink signal was absent or weak when HeLa or undifferentiated C2C12 nuclear extracts were tested, but detectable when mouse brain nuclear extract was assayed (data not shown), suggesting that a yet unidentified RNA binding protein, enriched in muscle and brain tissues, binds to CCUG, but not to CUG repeats.

To identify this factor, proteins extracted from mouse brain nuclei were captured on streptavidin resin coupled to biotinylated RNA composed of expanded CUG or CCUG repeats, eluted, separated on SDS-PAGE gels, and identified by nanoLC/MS-MS analysis (Figure 1B). Around 50 RNA binding proteins were identified (Supplementary Table 1), including MBNL1 and DDX proteins, which were identified in previous studies^{8,35}. As expected, these proteins were recruited both on CUG and CCUG repeats. In contrast, seven proteins (PCBP1, PCBP2, hnRNP L, SRSF3, rbFOX1, rbFOX2 and rbFOX3) were found preferentially associated with expanded CCUG repeats (Figure 1C). Western blotting analysis of the proteins eluted from the RNA affinity columns confirmed that rbFOX1 is bound to expanded CCUG repeats, but not to CUG repeats (Figure 1D). As control, MBNL1 is found associated to both CUG and CCUG expanded repeats RNA (Figure 1E).

Next, to discard non-specific RNA binding proteins, candidates were tested for co-localization with the RNA aggregates formed by expanded CUG and CCUG repeats. Among the ten candidates tested, only MBNL1 co-localized with both CUG and CCUG RNA aggregates, while rbFOX1 co-localized only with CCUG RNA aggregates (Figure 1F and Supplementary Figure 1). Thus, we pursued our study on the one protein found specifically associated with expanded CCUG repeats, rbFOX1.

rbFOX1 and rbFOX2 bind to expanded CCUG repeats.

Recruitment of all three rbFOX proteins to biotinylated CCUG repeats questions whether these proteins bind directly, or through indirect protein-protein interactions, to CCUG RNA. Gel-shift assays showed that purified recombinant GST-tagged rbFOX1 contacts directly RNAs containing 30 CCUG repeats, but not RNA containing expanded CUG repeats (Figure 2A). We confirmed that rbFOX1 binds specifically to CCUG repeats, but not to expanded CUG repeats, using either shorter (10x) or longer (100x) CUG and CCUG repeats (Figure 2B). UV-crosslinking experiments further confirmed that rbFOX1 directly binds to expanded CCUG repeats, but not to expanded CUG repeats (Supplementary Figure 2A). Similarly, both gel-shift and UV-crosslinking assays demonstrated that recombinant purified GST-tagged rbFOX2, the paralog of rbFOX1, also binds directly to expanded CCUG repeats (Supplementary Figures 2B and 2C). As control, recombinant purified GST-tagged MBNL1 binds to both CUG and CCUG expanded repeats in gel-shift assays (Figures 2C and 2D) and in UV-crosslinking experiments (Supplementary Figure 2D). We then characterized further these RNA-protein interactions by measuring their corresponding apparent K_D (Figures 2B and 2D). Consistent with previous reports^{36,37}, MBNL1 displayed slightly better affinities for CCUG repeats (K_D of 2.6 +/- 0.5 nM; 6.1 +/- 0.7 nM and 11.3 +/- 1.0 nM for CCUG 100x, 30x and 10x, respectively) than for CUG repeats (K_D of 6.6 +/- 1.3 nM; 10.4 +/- 1.6 nM and 22.3 +/- 2.8 nM for CUG 100x, 30x and 10x, respectively). These affinities were in the same range than the apparent K_D of rbFOX1 for expanded CCUG repeats (K_D of 4.2 +/- 0.3 nM; 7.3 +/- 0.8 nM and 12.4 +/- 1.4 nM for CCUG 100x, 30x and 10x, respectively). Note that MBNL1 binds as well mutant CUG and CCUG repeats as its normal pre-mRNA intronic targets (*BINI*, *INSR*, *TNNT3*, etc.)^{17,37,38}, while rbFOX1 binds to expanded CCUG repeats with a 20 fold lesser affinity than its normal UGCAUG RNA motif target³⁹. Since rbFOX proteins are known to bind specifically to the UGCAUG(Y) sequence through their RRM domain, this questions how rbFOX1 can interact, even with a weaker affinity, with expanded CCUG repeats. NMR structure of the RRM of rbFOX1 in complex with the UGCAUG RNA motif reveals that the central adenosine is not involved in any direct RNA-protein interaction³⁹ suggesting that substitution of the central adenosine by a cytosine does not affect a rbFOX1-RNA complex which is consistent with our *in vitro* gel-shifts and UV-crosslinking results. All together, these results indicate that rbFOX1 binds specifically CCUG repeats and not CUG repeats *in vitro*.

The *in vitro* binding of rbFOX1 and rbFOX2 to expanded CCUG repeats questions whether

rbFOX proteins are also associated *in cellulo* with the RNA aggregates of CUG and CCUG expanded repeats. RNA FISH coupled to immunofluorescence demonstrated that endogenous rbFOX1 was recruited within CCUG repeats induced RNA aggregates that formed in differentiated muscle C2C12 cells transfected with a plasmid expressing 400 CCUG repeats (Figure 2F). Identical results were obtained when rbFOX1 paralog, rbFOX2, was assayed in non-differentiated C2C12 muscle cells transfected with a plasmid expressing 400 expanded CCUG repeats (Supplementary Figure 2E). The binding and recruitment of rbFOX1 and rbFOX2 to expanded CCUG repeats raises the question as to how specific these interactions are, and notably whether rbFOX proteins can also recognize other expanded repeats. RNA FISH coupled to immunofluorescence analysis demonstrated that endogenous rbFOX1 did not co-localize within RNA aggregates formed in muscle C2C12 cells by transfection of plasmids expressing either expanded CUG, CGG or AUUCU repeats, which are involved in DM1, Fragile X Tremor and Ataxia Syndrome (FXTAS) and spinocerebellar ataxia of type 10 (SCA10), respectively (Supplementary Figure 2F). Identical results were observed with rbFOX2 (Supplementary Figure 2G), demonstrating that the recruitment of rbFOX1 and rbFOX2 were specific to CCUG expanded repeats.

The cell transfection experiments described above were performed through over-expression of a plasmid expressing expanded CCUG repeats, thus questioning whether endogenous rbFOX proteins co-localize with endogenous CCUG RNA aggregates in DM2 patients. First, RNA FISH coupled to immunofluorescence labeling revealed that endogenous rbFOX1 co-localizes within CCUG RNA aggregates in primary cultures of differentiated muscle cell from DM2 patients (Supplementary Figure 2I). In contrast, rbFOX1 remained diffuse within the nuclei and was not recruited within CUG aggregates in DM1 myotubes. As control, concomitant labeling of endogenous MBNL1 demonstrated co-localization of MBNL1 in both CUG and CCUG RNA aggregates (Supplementary Figure 2I). Similarly, rbFOX2 co-localized with CCUG RNA aggregates, but not with CUG RNA aggregates, in primary cultures of non-differentiated myoblasts from DM2 and DM1 patients (data not shown). Then, we analyzed the localization of endogenous rbFOX1 and CCUG aggregates in skeletal muscle sections from DM2 patients. RNA FISH coupled to immunofluorescence experiments showed that rbFOX1 consistently co-localized with CCUG nuclear RNA aggregates in muscle sections of DM2 patients, while rbFOX1 was diffusely localized within the nucleoplasm of muscle section of DM1 patients (Figures 2G). Identical results were obtained when rbFOX2 was assayed, rbFOX2 co-localized with CCUG RNA aggregates in skeletal muscle sections of DM2 patients, but did not co-localized within CUG RNA aggregates in muscle samples of

DM1 patients (Figure 2H). As control, concomitant labeling of endogenous MBNL1 demonstrated co-localization of MBNL1 with CUG and CCUG aggregates in both DM1 and DM2 muscle samples (Figures 2G and 2H). Quantification of the co-localization of rbFOX1 and rbFOX2 within CUG or CCUG aggregates in a hundred nuclei from DM1 or DM2 muscle sections confirmed a robust co-localization of rbFOX1 and of rbFOX2 within CCUG RNA aggregates (Figures 2G and 2H). Overall, these data establish that the rbFOX1 and rbFOX2 proteins are specific components of the CCUG aggregates in DM2.

rbFOX proteins are not sequestered within CCUG aggregates.

MBNL1 recruitment within CUG and CCUG RNA aggregates leads to its partial immobilization and consequently, in depletion of the quantity of free MBNL1 available, ultimately resulting in changes of the alternative splicing events regulated by MBNL1⁸⁻¹⁰. This model questions whether the co-localization of rbFOX1 and rbFOX2 within CCUG aggregates in DM2 also leads to an immobilization of the rbFOX proteins, resulting in alterations of the alternative splicing events modulated by rbFOX1 and rbFOX2.

We tested whether the expression of expanded CCUG repeats modifies the alternative splicing of pre-mRNAs regulated by rbFOX1 and rbFOX2. Indeed, according to an RNA gain-of-function model, titration of the free rbFOX proteins into CCUG nuclear RNA aggregates should deplete their functional activity and result in detectable pre-mRNA splicing changes. To test this hypothesis, we first co-transfected in C2C12 muscle cells a construct encoding 400 CCUG repeats with a minigene of the human mitochondrial ATP synthase gamma-subunit (*ATP5C1* also named F1gamma) exon 9, which splicing is directly regulated by rbFOX proteins²⁷. We confirmed that over-expression of rbFOX1 promoted exclusion of that exon, while MBNL1 had no effect (Figure 3A). Over-expression of expanded CCUG repeats did not modify the inclusion or exclusion of the exon 9 of F1gamma minigene (Figure 3A). As control, a minigene of the insulin receptor exon 11, which is regulated by MBNL1, responded to over-expression of expanded CCUG repeats (Supplementary Figure 3A). Since minigenes are artificial models, we next tested whether the alternative splicing of endogenous *Fmn13* pre-mRNA, which is regulated by rbFOX1, is also altered by over-expression of expanded CCUG repeats. In agreement with previous studies³⁰⁻³², transfection of a plasmid expressing rbFOX1 promoted the inclusion of the endogenous exon 26 of the *Fmn13* mRNA, while depletion of rbFOX1 by siRNA inhibited its inclusion (Figure 3B). In contrast, over-expression of 400 CCUG repeats had no significant effect, suggesting that CCUG repeats did not alter the splicing activity of rbFOX1 (Figure 3B). Similar RT-PCR analysis of

endogenous *Tbx3* exon 25, *Enah* exon 11A, and *Ect2* exon 25 demonstrated, that while rbFOX1 regulated the alternative splicing of these exons, the over-expression of expanded CCUG repeats had no effect (Supplementary Figures 3B, 3C and 3D). We controlled that alternative splicing of these exons were regulated by rbFOX1, but not modulated by MBNL1, as over-expression or siRNA-mediated depletion of MBNL1 did not change the alternative splicing of *Fmnl3*, *Tbx3*, *Enah*, and *Ect2* (Figures 3B and Supplementary Figures 3B, 3C and 3D). Finally, we tested whether alternative splicing of these rbFOX-regulated exons were altered in muscle samples of DM2 patients. RT-PCR analysis demonstrated that neither the exon 26 of *FMNL3*, the exon 11A of *ENAH*, nor the exon 25 of *ECT2* displayed splicing abnormalities in DM2 compared to control skeletal muscle samples (Figures 3C, 3D and 3E). As control, alternative splicing of the exon 29 of *CACNAIS* (CAV1.1), exon AS1 of *RYR1*, exon 22 of *ATP2A1* (SERCA), exon 7 of *MBNL1* and exon 11 of *LDB3* (CYPHER/ZASP), which all respond to MBNL1, were altered in DM2 muscle samples (Supplementary Figures 3E, 3F, 3G, 3H and 3I). Of interest, RT-PCR analyzes also demonstrated that the alterations of alternative splicing of *CACNAIS*, *RYR1*, *ATP2A1*, *MBNL1* and *LDB3* pre-mRNAs were consistently stronger in DM1 muscle samples compared to DM2 muscle samples, which is consistent with the greater severity of the muscle alterations in DM1 patients compared to DM2 (Supplementary Figures 3E, 3F, 3G, 3H and 3I). Overall, these results indicate that, in contrast to MBNL1, the mobility and the splicing activity of the rbFOX proteins are not altered by the expression of expanded CCUG repeats.

rbFOX1 competes the binding of MBNL1 to expanded CCUG repeats.

The direct interaction of both MBNL1 and rbFOX1 to expanded CCUG repeats questions whether these binding are mutually exclusive. To test whether rbFOX1 can displace MBNL1 from CCUG RNA, we first assayed the *in vitro* binding of a constant amount of MBNL1 protein to an RNA composed of expanded CCUG repeats in presence of an increasing amount of recombinant purified GST-tagged rbFOX1. UV-crosslinking experiments demonstrated that an excess of rbFOX1 chased MBNL1 from binding to expanded CCUG repeats (Figure 4A). Consistent with similar affinity of rbFOX1 and MBNL1 toward expanded CCUG repeats, a one fold excess of rbFOX1 decreased the binding of MBNL1 to CCUG repeats by half, while a two fold excess of rbFOX1 reduced MBNL1 binding by more than 80% (Figure 4A). Similar competition of the binding of MBNL1 to expanded CCUG repeats was observed when increased amounts of GST-tagged purified rbFOX2 was tested to the UV-crosslinking reactions (Supplementary Figure 4A).

A competition mechanism requires that a sufficient quantity of rbFOX1 is expressed to prevail over MBNL1. Western-blotting analysis indicated that both rbFOX1 and MBNL1 were expressed at similar levels in control and DM2 adult human muscle samples (Figure 4B). To avoid a possible bias due to antibody differences, recombinant purified proteins were used as standards (Supplementary Figure 4B). Quantifications yielded a concentration of MBNL1 and rbFOX1 in the similar range (~20 to 40 femtomol/ μg), indicating that rbFOX1 is sufficiently expressed to compete MBNL1 in adult muscle. These results were further confirmed by quantitative real time PCR that indicated that *rbFOX1* and *MBNL1* expressions were not altered in DM2 patients compared to control muscle samples (Figure 4C). Consistent with previous studies^{8,26,27}, quantitative RT-PCR analyzes confirmed that the expression of *rbFOX1*, *rbFOX2*, *MBNL1* and *MBNL2* were induced during development of the skeletal muscle, both in human (Supplemental Figure 4C) and in mouse (Supplemental Figure 4D). Importantly, quantitative RT-PCR analyzes also indicated that the expression of *ZNF9*, hosting the expanded CCUG repeats, was low in fetal muscle samples compared to adult, an observation consistent with the absence of a congenital form of DM2. As control *DMPK*, hosting the expanded CUG repeats, was expressed as well in fetus as in adult muscle samples (Supplemental Figures 4C and 4D).

In vitro competitions assays were performed with purified recombinant proteins, thus questioning whether rbFOX1 could compete and relieve MBNL1 sequestration from CCUG RNA aggregates in a more complex context. Thus, we modulated the expression of rbFOX1 and quantified the recruitment of endogenous MBNL1 within CCUG RNA aggregates in primary cultures of muscle cells from DM2 patients. Consistent with previous studies^{41,42}, RNA FISH coupled to immunofluorescence demonstrated that most of the MBNL1 labeling was observed within CCUG RNA aggregates, with less than ~30% of the MBNL1 signal located diffusely within the nucleoplasm (Figure 4D). Importantly, transfection of a plasmid expressing rbFOX1 resulted in a significant decreased of the quantity of MBNL1 present within the CCUG aggregates, with a concomitant increase of the labeling of free endogenous MBNL1 (Figure 4D). Similarly, a reduced sequestration with an increased labeling of free MBNL1 was observed when myoblasts of DM2 patients were transfected with a plasmid expressing rbFOX2 (data not shown). As control, over-expression of rbFOX1 had no effect on the distribution of free versus sequestered MBNL1 in primary cultures of DM1 myoblasts (Supplementary Figure 4E). Since, an excess of rbFOX1 or rbFOX2 were able to reduce MBNL1 recruitment within CCUG aggregates, we tested the reverse experiment, and notably, whether a depletion of endogenous rbFOX1 had any effect on MBNL1 sequestration.

Transduction of differentiated DM2 muscle cell primary cultures with adenovirus expressing an shRNA against endogenous rbFOX1 resulted in an increased localization of endogenous MBNL1 within CCUG aggregates with a concomitant decrease of the quantity of free nucleoplasmic MBNL1 (Figure 4E). As control, similar rbFOX1 depletion in differentiated DM1 muscle cells had no significant effect on the localization of MBNL1 within CUG aggregates (Supplementary Figure 4F). Overall, these results suggest that rbFOX1 displaces MBNL1 from CCUUG RNA aggregates in DM2 muscle cells.

Overexpression of rbFOX1 alleviates the pathogenic effect of expanded CCUG repeats.

A model of competition between rbFOX1 and MBNL1 to bind to expanded CCUG repeats in DM2 patients predicts that over-expression of rbFOX1 would reduce any phenotype caused by MBNL1 sequestration within CCUG RNA aggregates. To test that hypothesis, we developed a *Drosophila* model of DM2, expressing 105 CCUG repeats in the eye. Flies expressing expanded CCUG repeats in the eye displayed disorganized ommatidia, depigmentation and progressive loss of photoreceptor neurons (Figures 4F). Consistent with results in mice^{43,44}, over-expression of MBNL1 in CCUG flies rescued the deleterious effect of expanded CCUG repeats and restored a normal eye phenotype. Importantly, over-expression of rbFOX1 also rescued eye degeneration, demonstrating that the sole expression of rbFOX1 can alleviate the toxic effect of the CCUG expanded repeats (Figure 4F). As control, over-expression of CUGBP1 had no effect, highlighting the relevance and specificity of rbFOX1 for DM2 pathology.

DISCUSSION

An RNA gain-of-function model predicts that an increased quantity of mutant RNA or a higher size of either expanded CUG or expanded CCUG repeats should mathematically lead to a greater titration of the MBNL proteins, ultimately resulting in an increased severity of the disease. A model consistent with the higher number of CTG repeats and increased severity in congenital CDM1 compared to adult-onset DM1. However, and despite size of expanded repeats higher in DM2 than in DM1, DM2 is less severe than DM1, suggesting the existence of other mechanisms beyond the sequestration of MBNL1 and MBNL2. Several hypotheses were proposed to explain the difference in severity between DM1 and DM2. (i) A lower affinity of MBNL1 toward CCUG repeats compared to CUG repeats was excluded, as MBNL1 binds to both expanded CCUG and CUG repeats with similar, or even better affinity toward CCUG repeats^{36,37}. (ii) A lower expression of the *ZNF9* gene compared to the *DMPK* gene in adults was also excluded⁴⁵, as well as a direct implication of the *ZNF9* or *DMPK* gene^{4-8,46-48}. (iii) Increased levels of CUGBP1 were reported in DM1, but are also now reported in some DM2 samples^{12,13}. (iv) Lastly and topic of this work, the hypothesis that other proteins may modulate the titration of MBNL1, led us to the identification of a family of RNA binding protein, the rbFOX proteins, which bind specifically to CCUG expanded repeats, resulting in a lesser sequestration of MBNL1 and a decreased severity of the disease in a fly model of DM2.

This work raises several questions. First, rbFOX proteins are known to bind to the consensus sequence, UGCAAUGY. However, we found that rbFOX1 could also bind to UGCCCUGC expanded repeats, although with a 20 fold decreased affinity. This questions whether rbFOX1 could recognize a UGCCCUGY motif within a pre-mRNA and consequently regulates alternative splicing. Against this hypothesis, we found that the binding of rbFOX1 to 10 repeated UGCCCUGC motifs was much lower than the binding to a single UGCAAUGC motif, and that the binding of rbFOX1 to a single UGCCCUGC motif was barely detectable. Furthermore, mutation of a UGCAAUGC motif into UGCCCUGC in a minigene (BIN1 exon 11) responding to rbFOX1 abolished the splicing regulation mediated by rbFOX1. Thus, even if the structure of rbFOX1 can accommodate a central cytosine, the binding of rbFOX1 to a single UGCCCUGC motif is weak and not sufficient to regulate alternative splicing. In contrast, the extensive repetition of that motif in DM2 patients (up to 11 000 CCUG repeats) probably compensates this low affinity, resulting in the abnormal recruitment of rbFOX1 within CCUG RNA aggregates.

Next, we found that, while rbFOX1 and rbFOX2 are recruited within CCUG RNA aggregates, splicing events regulated by the rbFOX proteins are not altered in CCUG-expressing cells or in DM2 patients. These data suggest that, in contrast to the MBNL proteins, the rbFOX proteins are not immobilized within CCUG aggregates, highlighting that a co-localization is not a sequestration. The molecular reasons underlying liberty to rbFOX1 but captivity for MBNL1 are unclear. Possible explanations may lie in the lower affinity of rbFOX1 toward CCUG repeats compared to its normal pre-mRNA targets containing UGCAUGY motifs, or in the structural differences between MBNL and rbFOX proteins. Indeed, the rbFOX proteins contain one RRM that binds to one UGCAUGY motif, hence one RNA molecule at a time, while MBNL1 possesses two pairs of opposed CCCH zinc-fingers, which bind to two antiparallel-orientated pair of YGC motifs^{39,49}. Such structure enables MBNL1 to bind to four YGC motifs potentially located either in one looped RNA molecule, or in two separated RNA molecules, suggesting that MBNL1 may form intra- or inter-strand RNA bridges. Such ability of MBNL1 to fold or to link different RNA molecules containing expanded CUG or CCUG repeats may result in formation of unwanted bonds, leading to formation of an RNA web from which it may prove to be difficult to escape.

Thirdly, our study focused on rbFOX1 and rbFOX2, which are the main rbFOX proteins expressed in skeletal muscle. However, a third paralog of rbFOX1 (namely rbFOX3) binds to similar sequences but is expressed only in neurons. This questions whether rbFOX3 can also binds to CCUG expanded repeats and compete MBNL2 from CCUG RNA aggregates, resulting in lesser cognitive impairment of DM2 patients compared to DM1. Similarly, the influence of rbFOX1 and rbFOX2 on MBNL1 sequestration in heart, smooth muscle and other tissues affected in DM2 remains to be determined. Finally, we focused on detectable CCUG aggregates, but it is possible that soluble mutant RNAs, not yet trapped in aggregates, may exist and have toxic effects⁵⁰. Whether such soluble expanded CCUG repeats exist, and whether the rbFOX proteins relieve MBNL1 from binding these RNAs is an attractive hypothesis that remains to be tested.

Finally, there is no congenital form of DM2. We found that *ZNF9* mRNA is expressed in skeletal muscle of fetuses, although much less than in adults. We propose that the competition between the rbFOX and MBNL proteins associated to the lower expression of *ZNF9* in fetuses may contribute to the absence of a congenital form in DM2.

In conclusion, we found that the binding of MBNL1 and rbFOX1/ rbFOX2 to CCUG expanded repeats are mutually exclusive, and that over-expression of rbFOX1 or rbFOX2 chases MBNL1 from CCUG RNA aggregates. rbFOX1 and MBNL1 proteins are expressed at

similar levels in adult human skeletal muscle tissues and display roughly similar affinity toward CCUG repeats, rendering competition possible in endogenous tissues. These data suggest that the rbFOX proteins prevent the MBNL proteins from being extensively trapped into CCUG aggregates, resulting in a higher fraction of free MBNL1 available in the nucleoplasm to function as splicing regulator. We propose that the rbFOX proteins, by modulating the sequestration of the MBNL proteins within expanded CCUG repeats, may contribute to the milder disease course of DM2 patients compared to DM1.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Tom Cooper for gift of the DT960 vector and the *INSR* exon 11 and *TNNT2* exon 5 minigenes, Kunio Inoue for gift of the human mitochondrial ATP synthase gamma-subunit exon 9 minigene (F1gamma), Partha Sarkar for gift of the CCTG 400x and CCTG 1000X expression plasmids, Christiane Branlant for gift of the pGEX-MBNL1-Δ101 vector, Douglas Black for gift of the rbFOX1 and rbFOX2 expression plasmids and the kind gift of monoclonal anti-rbFOX1 antibody, Charles Thornton for gift of the anti-MBNL1 polyclonal antibody and all members of the French DM Network for fruitful discussion.

FUNDING CONTRIBUTIONS

This work was supported by INSERM AVENIR (NCB), ANR GENOPAT (P007942) (NCB) and AFM funding (MNM1-12982) (NCB).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Experiments were performed by Sellier Chantal, Freyermuth Fernande, Charlotte Fugier, Markus Blatter, Ruffenach Frank, Page Adeline. Clinical samples and patient data were obtained from Jack Puymirat, Bjarne Udd, Giovanni Meola, Benedikt Schoser, Guillaume Bassez and Denis Furling. Data were collected and analyzed by Frédéric Allain, Ralf Krahe, Andreas Bergmann, Partha Sarkar, Denis Furling and Charlet-Berguerand Nicolas. The study was designed and coordinated by Denis Furling and Charlet-Berguerand Nicolas.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Identification of proteins bound to expanded CUG and CCUG repeats.

(A) UV-crosslinking binding assays of 20 μ g of nuclear extract from C2C12 muscle cells differentiated four days incubated with 10,000 CPM of uniformly [α - 32 P] internally labeled *in vitro* transcribed RNAs containing either 30 CUG or 30 CCUG repeats. (B) Silver staining of proteins extracted from mouse brain and captured on streptavidin resin coupled to biotinylated *in vitro* transcribed RNA containing either 30 CUG or 30 CCUG repeats. (C) List of the major proteins identified by nanoLS-MS/MS that are associated with expanded CUG or CCUG repeats. MW, molecular weight. A complete list of the proteins is presented in the supplementary table 1. (D) Western blotting against rbFOX1 on mouse brain proteins captured by RNA-column containing expanded CUG or CCUG repeats. (E) Western blotting against MBNL1 on mouse brain proteins captured by RNA-column containing expanded CUG or CCUG repeats. (F) Percent of co-localization of the tested candidate proteins with CUG or CCUG RNA aggregates in primary cultures of DM1 or DM2 biopsies, respectively. Candidate proteins were visualized by immunofluorescence while the aggregates of expanded CUG or CCUG repeats were detected by RNA FISH. Representative images are presented in the supplementary figure 1.

Figure 2. rbFOX1 and rbFOX2 bind to expanded CCUG RNA repeats.

(A) Gel-shift assays of 3, 10, 30 and 100 nM of purified bacterial recombinant GST-rbFOX1 Δ with 100 pM (30,000 CPM) of uniformly [α - 32 P] internally labeled *in vitro* transcribed RNAs containing either 30 CUG or 30 CCUG repeats. (B) Gel-shift quantification of GST-rbFOX1 Δ binding to RNAs containing either 10, 30 or 100 CUG or CCUG repeats. (C) Gel-shift assays of purified bacterial recombinant GST-MBNL1 Δ with 100 pM (30,000 CPM) of uniformly [α - 32 P] internally labeled *in vitro* transcribed RNA containing either 30 CUG or 30 CCUG repeats. (D) Gel-shift quantification of GST-MBNL1 Δ binding to RNAs containing either 10, 30 or 100 CUG or CCUG repeats. (E) RNA FISH against CCUG repeats, coupled to immunofluorescence against rbFOX1, on four days differentiated C2C12 cells transfected with a plasmid expressing either no (CTL) or 400 CCUG repeats. (F) Left panel, RNA FISH of CUG or CCUG repeats coupled to immunofluorescence of MBNL1 and rbFOX1 on skeletal muscle sections of DM1 or DM2 patients. Magnification, 630x. Scale bars, 10 μ m. Nuclei were counterstained with DAPI. Right panel, quantification of the co-localization of rbFOX1 within a hundred CUG or CCUG RNA aggregates. (G) Left panel, RNA FISH of

CUG or CCUG repeats coupled to immunofluorescence of MBNL1 and rbFOX2 on skeletal muscle sections of DM1 or DM2 patients. Magnification, 630x. Scale bars, 10 μ m. Nuclei were counterstained with DAPI. Right panel, quantification of the co-localization of rbFOX2 within a hundred CUG or CCUG RNA aggregates.

Figure 3. rbFOX1 is not sequestered within the CCUG RNA aggregates.

(A) Splicing analysis revealed no splicing alterations in cells expressing CCUG repeats. C2C12 cells were co-transfected with a minigene expressing the exon 9 of the mitochondrial ATP synthase gamma-subunit gene and either with a plasmid expressing rbFOX1, MBNL1, 960 CUG repeats or 400 CCUG repeats or with a siRNA directed against *rbFox1* or *Mbnl1*. C2C12 cells were differentiated two days and the ratio of exon 9 inclusion was quantified by RNA extraction followed by RT-PCR. (B) C2C12 cells were co-transfected with a plasmid expressing the GFP and either with a plasmid expressing rbFOX1, MBNL1, 960 CUG repeats or 400 CCUG repeats or with a siRNA directed against *rbFox1* or *Mbnl1*. C2C12 cells were differentiated two days, GFP-positive FAX isolated and the ratio of the exon 26 inclusion of *Fmnl3* was quantified by RNA extraction followed by RT-PCR. (C, D, E) RT-PCR analysis (left panel) and quantification (right panel) of the alternative splicing of *FMNL3*, *ENAH* and *ECT2* pre-mRNAs by RT-PCR performed on total RNA extracted from adult skeletal muscle of controls or DM2 patients. Error bars indicate s.e.m.

Figure 4. rbFOX1 competes MBNL1 binding to expanded CCUG repeats.

(A) Upper panel, UV-cross-linking binding of 1 μ g of GST-MBNL1 Δ to 10,000 CPM of uniformly [α^{32} P] internally labeled *in vitro* transcribed RNA containing 30 CCUG repeats was competed by increasing amounts (0.25, 0.5, 1 and 2 μ g) of GST-rbFOX1 Δ . Middle panel, loading of MBNL1 and of rbFOX1 was verified by coomassie staining. Lower panel, quantification of the binding of MBNL1 and rbFOX1 to expanded CCUG repeats. Error bars indicate s.e.m. (B) Western-blotting analysis of 50 μ g of control or DM2 muscle samples using an antibody against rbFOX1 or against MBNL1. (C) Quantitative RT-real time PCR analysis of the expression of the *rbFOX1* and *MBNL1* mRNAs relative to the expression to the *RPLP0* mRNA in control (N=6) and in DM2 (N=7) muscle samples. Error bars indicate s.e.m. (D) Left panel, RNA FISH of expanded CCUG repeats coupled to immunofluorescence of MBNL1 on primary cultures of muscle cells from DM2 patients transfected with a control pCDNA3.1 vector or a plasmid expressing GFP-tagged rbFOX1. Magnification, 630x. Scale bars, 10 μ m. Nuclei were counterstained with DAPI. Right panel, quantification of the signal

of MBNL1 either localized diffusely within the nucleoplasm (free MBNL1) or localized within the CCUG RNA aggregates (MBNL1 foci). Error bars indicate s.e.m. (E) Left panel, RNA FISH of expanded CCUG repeats coupled to immunofluorescence of MBNL1 on primary cultures of muscle cells from DM2 patients transduced with an adenovirus expressing an shRNA directed either against the luciferase (CTL) vector or against *rbFOX1*. Magnification, 630x. Scale bars, 10 μ m. Nuclei were counterstained with DAPI. Right panel, quantification of the signal of MBNL1 either localized diffusely within the nucleoplasm (free MBNL1) or localized within the CCUG RNA aggregates (MBNL1 foci). Error bars indicate s.e.m. (F) Overexpression of RbFOX1 or MBNL1 suppresses rCCUG-mediated eyes degeneration in the *Drosophila* expressing CCUG repeats.

MATERIALS AND METHODS

nanoLC-MS/MS analysis.

Nuclear extract were prepared from C2C12 muscle cells differentiated four days as described by Dignam *et al.*, 1983. Two milligrammes of nuclear extract was passed over an synthetic biotinylated CCUG15x or CUG20x RNA (30 nmoles, Thermo Scientific) bound to streptavidin coated magnetic beads (Dynabeads M-280 streptavidin, Invitrogen) in the presence of 20 mM Hepes, 300 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.01% NP40, 1 mM DTT and protease inhibitor (PIC, Roche). The magnetic beads with immobilized RNA and its bound proteins were washed three times with the binding buffer and bound proteins were eluted by boiling 3 min the in sample buffer prior to 4-12% SDS-PAGE (NuPAGE 4-12% bis-Tris Gel, Invitrogen) separation and silver staining (SilverQuest, Invitrogen). The protein bands were excised digested and identified using NanoESI_Ion Trap (LTQ XL Thermo Fisher Scientific).

Recombinant protein production and purification.

E. coli BL21(RIL) pRARE competent cells (Invitrogen) were transformed with pet28a-GST-rbFOX1 Δ , which contains the GST tag fused to amino acids 1 to 215 of mouse rbFOX1, grown at 30°C in 400 ml of LB medium supplemented with Kanamycin until OD₆₀₀=0.5, 0.5 mM IPTG was added and the culture was further incubated 4 hours at 30°C. Harvested cells were sonicated in 50 mM Tris-Cl pH 7.5, 300 mM NaCl, 5% glycerol, 1 mM DTT, 5 mM EDTA, centrifuged 20 min at 20000 g and recombinant GST-rbFOX1 Δ protein was purified using GST-BindTM Kits (Novagen).

In vitro RNA transcription.

Plasmids containing expanded CUG10x, CUG30x, CUG100x, CCUG10x, CCUG30x or CCUG100x repeats were linearized by XbaI and 100ng were transcribed using T7 transcription kit (Ambion) in presence of 1 μ l of α P32-UTP (Perkin Elmer), analyzed on 8% denaturing polyacrylamide and quantified with LS-6500 counter (Beckman). Non-labeled transcripts were synthesized using the Megascript T7 kit (Ambion). Plasmid containing expanded CUG repeats (CUG 95x, gift from Joelle Marie) was linearized by HindIII and transcribed using the Megascript SP6 kit (Ambion). After transcription, 1 unit of DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA) was added, and the sample was incubated for additional 30 min at 37°C. Transcribed RNAs were then purified by micro Bio-Spin 6 chromatography columns

(Bio-rad) according to the manufacturer's instructions. The sizes of RNAs were checked by gel electrophoresis on a denaturing 6% polyacrylamide gel.

Gel Shift assays.

1 μ L of labeled RNA was annealed in binding buffer (BB, 50 mM Tris-HCl (pH 7.0), 75.0 mM NaCl, 37.5 mM KCl, 5.25 mM DTT, 0.1 mg/mL BSA, 0.1 mg/mL Bulk tRNA) at 90°C for 5 min. and allowed to cool to room temperature by placing on a bench top. After cooling, MgCl₂ and RNAsin were added to a final concentration of 0.75 mM and 0.4 U/ μ L respectively. GST-MBNL1- Δ 101 protein or GST-rbFOX1 Δ or GST-rbFOX2 was then added to the above solution and the mixture was incubated on ice for 20 min. The solution mixture was loaded onto a non-denaturing 6.0% (w/v) polyacrylamide gel (acrylamide/bisacrylamide, 40:1, w/w) containing 0.5X TBE (1X TBE is 90 mM Tris-base, 89 mM Boric acid and 2 mM EDTA (pH 8.0)), which had been pre-electrophoresed at 110 V for 20 min. at 4°C. The gel was electrophoresed at 110 V at 4°C for 3 hours. The gel was then dried and exposed to a phosphorimager screen and imaged using a Typhoon 9410 variable mode imager. The data were fit to the following equation: $y = \min + ((\max - \min) / (1 + (x / IC_{50})^{\text{HillSlope}}))$ where y is the percentage of RNA bound to MBNL1 or rbFOX1, x is the concentration of MBNL1, min and max are the minimum and maximum percentage of RNA bound to MBNL1 or rbFOX1 or rbFOX2 (0-100%) and IC₅₀ is the concentration where 50% of maximum binding is achieved.

UV-Crosslinking assays.

20 μ g of nuclear extract from C2C12 muscle cells differentiated four days or 0.5 to 1 μ g of recombinant GST-rbFOX1 Δ protein were incubated with 1 μ l (40,000 CPM) of in vitro transcribed RNAs containing either 30 CUG or 30 CCUG repeats of uniformly [α -³²P] internally labeled, in 15 μ l of 100 mM NaCl, 20 mM Hepes, 8 mM MgCl₂, 0.1 mg/ml BSA, 0.1 mg/ml heparin and 0.5 mM DTT during 15 min at 30°C. Reactions were transferred on parafilm and irradiated 5 min, on ice, at 2.5 cm of a UV lamp (Vilberlomat VL-100C). 1 μ g of RNase A1 was added and incubated 30 min at 37°C. RNA-protein complexes were resolved on 10% SDS-PAGE, coomassie labeled and analyzed using BAS-MS imaging plate (Fuji) and Typhoon 8600 imager (Molecular Dynamics).

Cell cultures, transfections and transduction.

C2C12 cells were grown in DMEM, 1 g^l-1 glucose, 20% fetal calf serum and gentamycin at 37 °C, 5% (v/v) CO₂. C2C12 were transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions with control plasmid or plasmid expressing 400 CCUG repeats. Six hours after transfection, the medium is removed and cells are differentiated two days in DMEM, 1 g^l-1 glucose, 2% fetal calf serum, insulin 10 µg/ml and gentamycin medium before RNA-FISH coupled to immunofluorescence

For endogenous splicing assays, C2C12 were co-transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) with plasmid expressing GFP and plasmide expressing rbFOX1 or MBNL1 or 900 CUG repeats or 400 CCUG repeats. GFP positive cells are isolated two days differentiation by using FACS Diva. siRNA against rbFOX1 or MBNL1 are transfected by using RNAimax (Invitrogen) according to the manufacturer's instruction.

For minigene splicing assays, C2C12 were co-transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) with plasmid expressing minigen and plasmide expressing rbFOX1 or MBNL1 or 900 CUG repeats or 400 CCUG repeats or siRNA against rbFOX1 or MBNL1. C2C12 were differentiated 2 days before analysis.

For competition experiments, primary culture of muscle cells from DM2 patient were grown in DMEM, 1 g^l-1 glucose, medium 199 (4 :1), 20% fetal calf serum and gentamycin at 37 °C, 5% (v/v) CO₂ and transfected with a control pCDNA3.1 plasmid or a plasmid expressing GFP tagged rbFOX1 according to the Lipofectamine 2000 manufacturer's instructions. Cells were differentiated in DMEM, 1 g^l-1 glucose, medium 199 (4 :1), 2% fetal calf serum, insulin 10 µg/ml and gentamycin four days before analyse.

Transductions are realised on primary culture of muscle cells from DM2 patient differentiated two days with recombinant shRNA directed against the luciferase or against rbFOX1 adenovirus. Medium was replaced 24 h after infection, and cells were analyzed 48 h after infection.

RNA FISH combined with immunofluorescence.

Frozen human muscle sections were incubated in PBS 1X during 10 min before RNA FISH. Glass coverslips containing plated cells or human sections treated as described above were fixed in PFA 4% during 15 min and washed two times with PBS. The coverslips or slides were incubated for 10 min in PBS plus 0.5% Triton X-100 and washed three times with PBS before pre-hybridization in 40% DMSO, 40% formamide, 10% BSA (10 mg/ml), 2 × SCC for 30 min. The coverslips or slides were hybridized for 2 h in 40% formamide, 10% DMSO, 2 ×

SCC, 2 mM vanadyl ribonucleoside, 60 µg/ml tRNA, 30 µg/ml BSA plus 0.75 µg CAG8x- or CAGG8x-Cy3 DNA oligonucleotide probe (Sigma). The coverslips or slides were washed twice in 2 × SCC/50% formamide and twice in 2 × SCC. Following FISH, the coverslips or slide were washed twice successively in 2 × SCC/50% formamide, in 2 × SCC and in PBS. The coverslips or slides were incubated 2 hours with primary antibody against polyclonal MBNL1 (1/100 dilution, gift by Dr Thornton) and monoclonal FOX1 (gift by Pr Black 1/100 dilution) or monoclonal FOX2 (Abcam ab57154). Slides or coverslips were washed twice with PBS before incubation with a goat anti-rabbit secondary antibody conjugated with Alexa-Fluor 488 (1/500 dilution; Fisher Scientific SA) and donkey anti mouse secondary antibody conjugated with Cy5 (1/500 dilution; Interchim SA) for 60 min; incubated for 10 min in 2 × SCC/DAPI (1/10 000 dilution) and rinsed twice in 2 × SSC before mounting in Pro-Long media (Molecular Probes). Slides were examined using a fluorescence microscope (Leica).

Western blotting analyzes.

Proteins were denatured 3 min at 95°C, separated on 4-12% SDS-PAGE gel (Invitrogen), transferred on nitrocellulose membranes (Whatman Protan), blocked with 5% non-fat dry milk (NFM) in Tris Buffer Saline buffer (TBS), incubated with rabbit anti-FOX-1 (Abcam ab83574), anti-MBNL1 (gift by Dr Glenn) in TBS-5% NFM, washed 3 times and incubated with anti-rabbit or -mouse Peroxidase antibody (Jackson Immunoresearch, 1:10000) 1 hour in TBS-5% NFM, followed by autoradiography using the ECL chemoluminescence system (ThermoFisher).

RT-PCR analyzes.

Total RNA from cells or patient muscle were isolated by TriReagent (Molecular Research Center). cDNAs were generated using the Transcriptor High Fidelity cDNA synthesis kit (Roche Diagnostics) for quantification of mRNAs. PCR was performed with Taq polymerase (Roche), one denaturation step at 94 °C for 2 min, 30 cycles of amplification 94 °C for 1 min, 60 °C for 1 min, 72 °C for 2 min and a final step at 72 °C for 5 min using the primer described in the table 1. The PCR products were precipitated, analyzed by eletrophoresis on a 6.5% polyacrylamide gel, stained with ethidium bromide and quantified with a Typhoon scanner.

Oligonucleotides.

MINIGENE

INSR-FW	TAATACGACTCACTATAGGGC
INSR-REV	GCTGCAATAAACAAGTTCTGC
ATP5C1-FW	GTCATCACAAAAGAGTTGATTG
ATP5C1-REV	CACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGT

ENDOGENE RT-PCR

TBX3-FW	CACGGTAGAACGAGGCATTT
TBX3-REV	AGACGGGGCTGATTAACCTT
ENAH-FW	TGCTTCAGCCTGTCATAGTCA
ENAH-REV	TGGCAGCAAGTCACCTGTTA
ECT2-FW	CAGAATCCTGAAAGTCCGTGA
ECT2-REV	TTGGTTCAAGAAGCTGGAAAA
CACNA1S-FW	AGGAGGGTTCGCACTCCTTCT
CACNA1S-REV	GCTACTTTGGAGACCCCTGGA
RYR1-FW	GACAACAAAAGCAAAATGGC
RYR1-REV	CTTGGTGC GTTCCTGGTCCG
ATP2A1-FW	CCATCGGTGCATGCCGAACGAGC
ATP2A1-REV	CTCGTGGGCTCCATCTGCCTGTCC
LDB3-FW	GCAAGACCCTGATGAAGAAGCTC
LDB3-REV	GACAGAAGGCCGGATGCTG
MBNL1-FW	GCTGCCCAATACCAGGTCAAC
MBNL1-REV	TGGTGGGAGAAATGCTGTATG

ENDOGENE – qRT-PCR

Human MBNL1 FW	CATTTGCAAGCCAAGATCAA
Human MBNL1 REV	AACTGGTGGGAGAAATGCTG
Human MBNL2 FW	GCCCAGGCAGATGCAATTTAT
Human MBNL2 REV	GTGGACTTCCGGGAACAATA
Human FOX1 FW	CCCGAGCACACATTAACCT
Human FOX1 REV	CGGAACCTCAAGGGGATATT
Human FOX2 FW	AAGCCCAGTAGTTGGAGCTG

Human FOX2 REV	CAAATGGGCTCCTCTGAAAG
Human ZNF9 FW	TGCTATAACTGCGGTAGAGGT
Human ZNF9 REV	TTGAATGTGTCCGAATTCTCC
Human DMPK FW	CATGAACAAGTGGGACATGC
Human DMPK REV	CAATCTCCGCCAGGTAGAAG
Mouse MBNL1 FW	CGGGACACAAAATGGCTAAC
Mouse MBNL1 REV	TTGCAGTTCTCTCTGGAGCA
Mouse MBNL2 FW	TTTTCCCACATCCTCCAAAG
Mouse MBNL2 REV	GAATGTGTCAGCAAGCAGGA
Mouse FOX1 FW	GCATAGAAGTCGGGGCTGTA
Mouse FOX1 REV	GAGGGAGAAATTGCACGGTA
Mouse FOX2 FW	AACCAGGAGCCAACAACAAC
Mouse FOX2 REV	TGTCTGTGCTCCACCTTCTG
Mouse ZNF9 FW	TCACCTTGGTGCAGTCTTTTT
Mouse ZNF9 REV	ACTGCAAGGAGCCCAAGAG
Mouse DMPK FW	AGCGGTGGTGAAGATGAAAC
Mouse DMPK REV	AGTGCAGCTGTGTGATCCAG
RPLO FW	GAAGGTGTAATCCGTCTCCA
RPLO REV	GAAGTCACTGTGCCAGCCCA

REFERENCES

1. Brook, J.D. *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* 68, 799–808 (1992).
2. Fu, Y.H. *et al.* An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* 255, 1256–1258 (1992).
3. Mahadevan, M. *et al.* Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science* 255, 1253–1255 (1992).
4. Liquori, C.L. *et al.* Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science* 293, 864–867 (2001).
5. Philips, A.V., Timchenko, L.T. & Cooper, T.A. Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science* 280, 737–741 (1998).
6. Mankodi, A. *et al.* Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science* 289, 1769–1773 (2000).
7. Seznec, H. *et al.* Mice transgenic for the human myotonic dystrophy region with expanded CTG repeats display muscular and brain abnormalities. *Hum. Mol. Genet.* 10, 2717–2726 (2001).
8. Miller, J.W. *et al.* Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)_n expansions associated with myotonic dystrophy. *EMBO J.* 19, 4439–4448 (2000).
9. Kanadia, R.N. *et al.* A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science* 302, 1978–1980 (2003).
10. Ho, T.H. *et al.* Muscleblind proteins regulate alternative splicing. *EMBO J.* 23, 3103–3112 (2004).
11. Kuyumcu-Martinez, N.M., Wang, G.S. & Cooper, T.A. Increased steady-state levels of CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation. *Mol Cell.* 28, 68–78 (2007).
12. Salisbury E, Schoser B, Schneider-Gold C, Wang GL, Huichalaf C, Jin B, Sirito M, Sarkar P, Krahe R, Timchenko NA, Timchenko LT. Expression of RNA CCUG repeats dysregulates translation and degradation of proteins in myotonic dystrophy 2 patients. *Am J Pathol.* 2009 Aug;175(2):748-62.
13. Jones K, Jin B, Iakova P, Huichalaf C, Sarkar P, Schneider-Gold C, Schoser B, Meola G, Shyu AB, Timchenko N, Timchenko L. RNA Foci, CUGBP1, and ZNF9 are the primary targets of the mutant CUG and CCUG repeats expanded in myotonic dystrophies type 1 and type 2. *Am J Pathol.* 2011 Nov;179(5):2475-89.
14. Savkur, R.S., Philips, A.V. & Cooper, T.A. Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat. Genet.* 29, 40–47 (2001).
15. Mankodi, A. *et al.* Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of ClC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. *Mol. Cell* 10, 35–44 (2002).
16. Charlet, B.N. *et al.* Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol. Cell* 10, 45–53 (2002).
17. Fugier C, Klein AF, Hammer C, Vassilopoulos S, Ivarsson Y, Toussaint A, Tosch V, Vignaud A, Ferry A, Messaddeq N, Kokunai Y, Tsuburaya R, de la Grange P, Dembele D, Francois V, Precigout

G, Boulade-Ladame C, Hummel MC, Lopez de Munain A, Sergeant N, Laquerrière A, Thibault C, Deryckere F, Auboeuf D, Garcia L, Zimmermann P, Udd B, Schoser B, Takahashi MP, Nishino I, Bassez G, Laporte J, Furling D, Charlet-Berguerand N. Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy. *Nat Med.* 2011 Jun;17(6):720-5.

18. Tang ZZ, Yarotsky V, Wei L, Sobczak K, Nakamori M, Eichinger K, Moxley RT, Dirksen RT, Thornton CA. Muscle weakness in myotonic dystrophy associated with misregulated splicing and altered gating of Ca(V)1.1 calcium channel. *Hum Mol Genet.* 2012 Mar 15;21(6):1312-24

19. Day JW, Ricker K, Jacobsen JF, Rasmussen LJ, Dick KA, Kress W, Schneider C, Koch MC, Beilman GJ, Harrison AR, Dalton JC, Ranum LP. Myotonic dystrophy type 2: molecular, diagnostic and clinical spectrum. *Neurology.* 2003 Feb 25;60(4):657-64.

20. Schoser BG, Schneider-Gold C, Kress W, Goebel HH, Reilich P, Koch MC, Pongratz DE, Toyka KV, Lochmüller H, Ricker K. Muscle pathology in 57 patients with myotonic dystrophy type 2. *Muscle Nerve.* 2004 Feb;29(2):275-81.

21. Bassez G, Chapoy E, Bastuji-Garin S, Radvanyi-Hoffman H, Authier FJ, Pellissier JF, Eymard B, Gherardi RK. Type 2 myotonic dystrophy can be predicted by the combination of type 2 muscle fiber central nucleation and scattered atrophy. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2008 Apr;67(4):319-25.

22. Meola G, Moxley RT 3rd. Myotonic dystrophy type 2 and related myotonic disorders. *J Neurol.* 2004 Oct;251(10):1173-82.

23. Logigian EL, Ciafaloni E, Quinn LC, Dilek N, Pandya S, Moxley RT 3rd, Thornton CA. Severity, type, and distribution of myotonic discharges are different in type 1 and type 2 myotonic dystrophy. *Muscle Nerve.* 2007 Apr;35(4):479-85.

24. Udd B, Meola G, Krahe R, Wansink DG, Bassez G, Kress W, Schoser B, Moxley R. Myotonic dystrophy type 2 (DM2) and related disorders report of the 180th ENMC workshop including guidelines on diagnostics and management 3-5 December 2010, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord.* 2011 Jun;21(6):443-50.

25. Nakahata S, Kawamoto S. Tissue-dependent isoforms of mammalian Fox-1 homologs are associated with tissue-specific splicing activities. *Nucleic Acids Res.* 2005 Apr 11;33(7):2078-89.

26. Underwood JG, Boutz PL, Dougherty JD, Stoilov P, Black DL. Homologues of the *Caenorhabditis elegans* Fox-1 protein are neuronal splicing regulators in mammals. *Mol Cell Biol.* 2005 Nov;25(22):10005-16.

27. Jin Y, Suzuki H, Maegawa S, Endo H, Sugano S, Hashimoto K, Yasuda K, Inoue K. A vertebrate RNA-binding protein Fox-1 regulates tissue-specific splicing *via* the pentanucleotide GCAUG. *EMBO J.* 2003 Feb 17;22(4):905-12.

28. Ponthier JL, Schluepen C, Chen W, Lersch RA, Gee SL, Hou VC, Lo AJ, Short SA, Chasis JA, Winkelmann JC, Conboy JG. Fox-2 splicing factor binds to a conserved intron motif to promote

- inclusion of protein 4.1R alternative exon 16. *J Biol Chem*. 2006 May 5;281(18):12468-74. Epub 2006 Mar 14.
29. Kim KK, Adelstein RS, Kawamoto S. Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors. *J Biol Chem*. 2009 Nov 6;284(45):31052-61.
30. Zhang C, Zhang Z, Castle J, Sun S, Johnson J, Krainer AR, Zhang MQ. Defining the regulatory network of the tissue-specific splicing factors Fox-1 and Fox-2. *Genes Dev*. 2008 Sep 15;22(18):2550-63.
31. Yeo GW, Coufal NG, Liang TY, Peng GE, Fu XD, Gage FH. An RNA code for the FOX2 splicing regulator revealed by mapping RNA-protein interactions in stem cells. *Nat Struct Mol Biol*. 2009 Feb;16(2):130-7.
32. Venables JP, Klinck R, Koh C, Gervais-Bird J, Bramard A, Inkel L, Durand M, Couture S, Froehlich U, Lapointe E, Lucier JF, Thibault P, Rancourt C, Tremblay K, Prinos P, Chabot B, Elela SA. Cancer-associated regulation of alternative splicing. *Nat Struct Mol Biol*. 2009 Jun;16(6):670-6.
33. Gehman LT, Meera P, Stoilov P, Shiue L, O'Brien JE, Meisler MH, Ares M Jr, Otis TS, Black DL. The splicing regulator Rbfox2 is required for both cerebellar development and mature motor function. *Genes Dev*. 2012 Mar 1;26(5):445-60.
34. Gehman LT, Stoilov P, Maguire J, Damianov A, Lin CH, Shiue L, Ares M Jr, Mody I, Black DL. The splicing regulator Rbfox1 (A2BP1) controls neuronal excitation in the mammalian brain. *Nat Genet*. 2011 May 29;43(7):706-11.
35. Laurent FX, Sureau A, Klein AF, Trouslard F, Gasnier E, Furling D, Marie J. New function for the RNA helicase p68/DDX5 as a modifier of MBNL1 activity on expanded CUG repeats. *Nucleic Acids Res*. 2012 Apr;40(7):3159-71.
36. Kino Y, Mori D, Oma Y, Takeshita Y, Sasagawa N, Ishiura S. Muscleblind protein, MBNL1/EXP, binds specifically to CHHG repeats. *Hum Mol Genet*. 2004 Mar 1;13(5):495-507.
37. Warf MB, Berglund JA. MBNL binds similar RNA structures in the CUG repeats of myotonic dystrophy and its pre-mRNA substrate cardiac troponin T. *RNA*. 2007 Dec;13(12):2238-51.
38. Yuan Y, Compton SA, Sobczak K, Stenberg MG, Thornton CA, Griffith JD, Swanson MS. Muscleblind-like 1 interacts with RNA hairpins in splicing target and pathogenic RNAs. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(16):5474-86.
39. Auweter SD, Fasan R, Reymond L, Underwood JG, Black DL, Pitsch S, Allain FH. Molecular basis of RNA recognition by the human alternative splicing factor Fox-1. *EMBO J*. 2006 Jan 11;25(1):163-73.
40. Ho TH, Savkur RS, Poulos MG, Mancini MA, Swanson MS, Cooper TA. Colocalization of muscleblind with RNA foci is separable from mis-regulation of alternative splicing in myotonic dystrophy. *J Cell Sci*. 2005 Jul 1;118(Pt 13):2923-33.

41. Cardani R, Baldassa S, Botta A, Rinaldi F, Novelli G, Mancinelli E, Meola G. Ribonuclear inclusions and MBNL1 nuclear sequestration do not affect myoblast differentiation but alter gene splicing in myotonic dystrophy type 2. *Neuromuscul Disord*. 2009 May;19(5):335-43.
42. Mankodi A, Urbinati CR, Yuan QP, Moxley RT, Sansone V, Krym M, Henderson D, Schalling M, Swanson MS, Thornton CA. Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2. *Hum Mol Genet*. 2001 Sep 15;10(19):2165-70.
43. Kanadia RN, Shin J, Yuan Y, Beattie SG, Wheeler TM, Thornton CA, Swanson MS. Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscleblind overexpression in a mouse poly(CUG) model for myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006 Aug 1;103(31):11748-53.
44. Chamberlain CM, Ranum LP. Mouse model of muscleblind-like 1 overexpression: skeletal muscle effects and therapeutic promise. *Hum Mol Genet*. 2012 Nov 1;21(21):4645-54.
45. Mankodi A, Teng-Umuay P, Krym M, Henderson D, Swanson M, Thornton CA. Ribonuclear inclusions in skeletal muscle in myotonic dystrophy types 1 and 2. *Ann Neurol*. 2003 Dec;54(6):760-8.
46. Margolis JM, Schoser BG, Moseley ML, Day JW, Ranum LP. DM2 intronic expansions: evidence for CCUG accumulation without flanking sequence or effects on ZNF9 mRNA processing or protein expression. *Hum Mol Genet*. 2006 Jun 1;15(11):1808-15
47. Mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase develop a late onset progressive myopathy. Reddy S, Smith DB, Rich MM, Lefterovich JM, Reilly P, Davis BM, Tran K, Rayburn H, Bronson R, Cros D, Balice-Gordon RJ, Housman D. *Nat Genet*. 1996 Jul;13(3):325-35.
48. Jansen G, Groenen PJ, Bächner D, Jap PH, Coerwinkel M, Oerlemans F, van den Broek W, Gohlsch B, Pette D, Plomp JJ, Molenaar PC, Nederhoff MG, van Echteld CJ, Dekker M, Berns A, Hameister H, Wieringa B. Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice. *Nat Genet*. 1996 Jul;13(3):316-24.
49. Teplova M, Patel DJ. Structural insights into RNA recognition by the alternative-splicing regulator muscleblind-like MBNL1. *Nat Struct Mol Biol*. 2008 Dec;15(12):1343-51.
50. Mahadevan MS, Yadava RS, Yu Q, Balijepalli S, Frenzel-McCardell CD, Bourne TD, Phillips LH. Reversible model of RNA toxicity and cardiac conduction defects in myotonic dystrophy. *Nat Genet*. 2006 Sep;38(9):1066-70.

LEGEND OF THE SUPPLEMENTAL FIGURES

Supplemental Table 1. Identification of the proteins associated to CCUG repeats.

Nuclear proteins extracted from mouse brain were bound to streptavidin-biotinylated RNA containing either 30 CUG or 30 CCUG repeats, eluted, run on SDS page gel, silver stained, isolated, digested and identified by nano-LC/MS-MS. Contaminants and non-RNA binding proteins were excluded from the table.

Supplemental Figure 1. Identification of the proteins associated to CCUG repeats.

Top candidate proteins (PSM score > 3, cf. Supplementary Table 1) found *in vitro* to associate preferentially with expanded CCUG repeats were tested for co-localization with aggregates of CCUG repeats in cells. Primary cultures of two days differentiated muscle cells from DM1 and DM2 skeletal muscle biopsies were analyzed by RNA FISH using either a CAG8x-Cy3 or a CAGG8x-Cy3 DNA probe followed by immunofluorescence against the protein of interest. Nuclei are labeled by DAPI staining. Magnifications, 630x.

Supplemental Figure 2. rbFOX1 and rbFOX2 bind to expanded CCUG repeats.

(A) UV-crosslinking binding assays of 0.3 and 1 μg of purified recombinant GST-tagged rbFOX1 Δ with 10,000 CPM of uniformly [$\alpha^{32}\text{P}$] internally labeled *in vitro* transcribed RNAs containing either 30 CUG or 30 CCUG repeats. Upper panel, phosphorImager exposition. Lower panel, coomassie staining. **(B)** Left panel, UV-crosslinking binding assays of 0.3 and 1 μg of purified recombinant GST-tagged rbFOX2 with 10,000 CPM of uniformly [$\alpha^{32}\text{P}$] internally labeled *in vitro* transcribed RNAs containing 30 CUG repeats. Right panel, UV-crosslinking binding assays of 0.3, 0.5 and 1 μg of purified recombinant GST-tagged rbFOX2 with 10,000 CPM of uniformly [$\alpha^{32}\text{P}$] internally labeled *in vitro* transcribed RNAs containing 30 CCUG repeats. **(C)** Gel-shift binding assays of 1, 3, 10, 30 and 100 nM of purified recombinant GST-tagged rbFOX2 with 100 pM (30,000 CPM) of uniformly [$\alpha^{32}\text{P}$] internally labeled *in vitro* transcribed RNAs containing 30 CUG repeats. **(D)** UV-crosslinking binding assays of 0.3 and 1 μg of purified recombinant GST-tagged MBNL1 Δ with 10,000 CPM of uniformly [$\alpha^{32}\text{P}$] internally labeled *in vitro* transcribed RNAs containing either 30 CUG or 30 CCUG repeats. Upper panel, phosphorImager exposition. Lower panel, coomassie staining. **(E)** RNA FISH against CCUG repeats, coupled to immunofluorescence against rbFOX2 on C2C12 cells transfected with a plasmid expressing either no repeats (CTL) or 400 CCUG repeats. **(F)** RNA FISH against CCUG repeats on C2C12 cells co-transfected with a plasmid

expressing 400 CCUG repeats and a plasmid encoding GFP-tagged rbFOX1 or GFP-tagged rbFOX1 deleted of its RRM domain. **(G)** RNA FISH coupled to immunofluorescence analyzes demonstrate no recruitment of rbFOX1 within CUG, CGG or AUUCU RNA aggregates. C2C12 cells were transfected with a plasmid expressing either 960 CUG repeats, 60 CGG repeats or 300 AUUCU repeats, differentiated 48 hours and analyzed by RNA FISH using a CAG8x-, a CCG8x- or a TAAGA8x-Cy3 DNA probe coupled to immunofluorescence using an antibody directed against rbFOX1. **(H)** RNA FISH coupled to immunofluorescence analyzes demonstrate no recruitment of rbFOX2 within CUG, CGG or AUUCU RNA aggregates. C2C12 cells were transfected 24 hours with a plasmid expressing either 960 CUG repeats, 60 CGG repeats or 300 AUUCU repeats and analyzed by RNA FISH using a CAG8x-, a CCG8x- or a TAAGA8x-Cy3 DNA probe coupled to immunofluorescence using an antibody directed either against rbFOX2. **(I)** Left panel, RNA FISH against CUG or CCUG repeats, coupled to immunofluorescence against rbFOX1 and MBNL1 on primary cultures of DM1 or DM2 muscle cells differentiated four days. Magnifications, 630x. Scale bars, 10 μ m. Nuclei were counterstained with DAPI. Right panel, quantification of the co-localization of rbFOX1 within ~50 CUG or CCUG RNA aggregates.

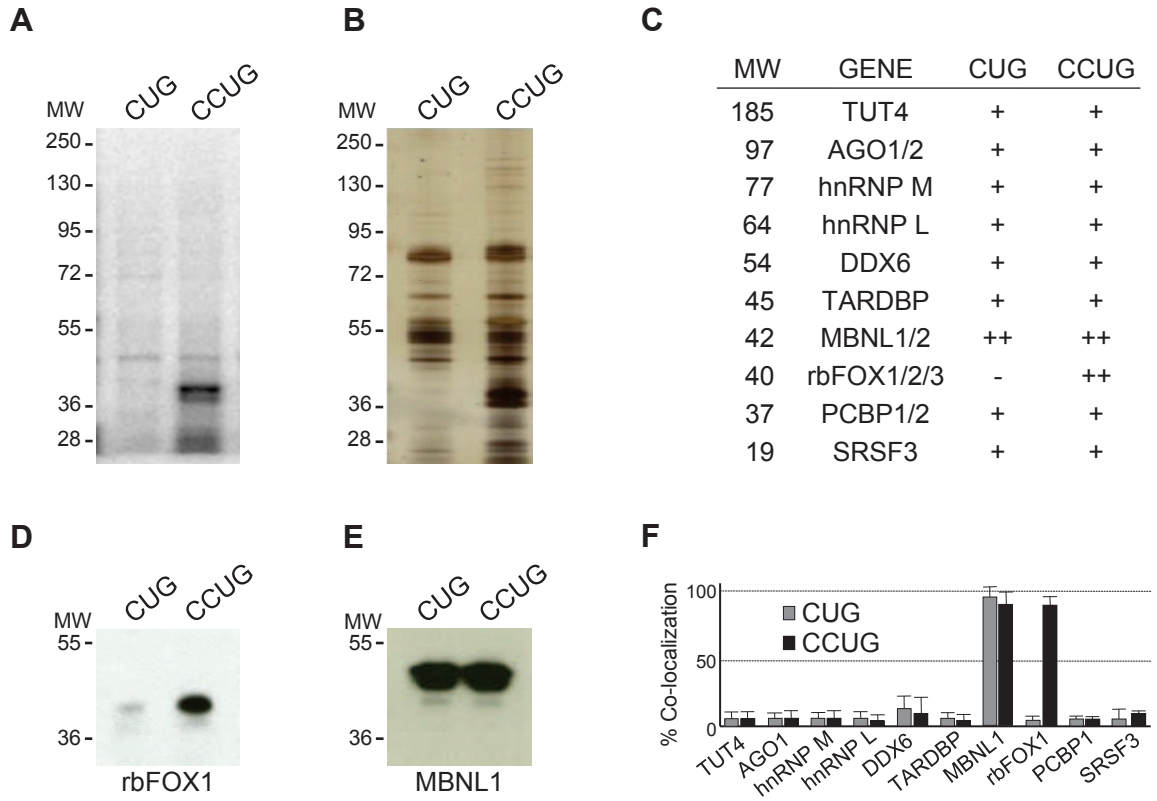
Supplemental Figure 3. rbFOX1 is not sequestered within CCUG aggregates.

(A) C2C12 cells were co-transfected with a minigene expressing the exon 11 of the insulin receptor *INSR* gene and either with a plasmid expressing rbFOX1, MBNL1, 960 CUG repeats or 400 CCUG repeats or with a siRNA directed against *rbFox1* or *Mbnl1*. C2C12 cells were differentiated two days and the ratio of *INSR* exon 11 inclusion was quantified by RNA extraction followed by RT-PCR. **(B-D)** C2C12 cells were co-transfected with a plasmid expressing the GFP and either with a plasmid expressing rbFOX1, MBNL1, 960 CUG repeats or 400 CCUG repeats or with a siRNA directed against *rbFox1* or *Mbnl1*. C2C12 cells were differentiated two days, GFP-positive FAX isolated and alternative splicing of *Tbx3*, *Enah* and *Ect2* were quantified by RNA extraction followed by RT-PCR. **(E-I)** RT-PCR analysis (left panel) and quantification (right panel) of the alternative splicing of *CACNAIS* (CAV1.1), *RYR1*, *ATP2A1* (SERCA), *LDB3* (CYPHER/ZASP) and *MBNL1* pre-mRNAs by RT-PCR performed on total RNA extracted from adult skeletal muscle of controls, DM1 or DM2 patients. Error bars indicate s.e.m.

Supplemental Figure 4. rbFOX1 competes MBNL1 binding to expanded CCUG repeats.

(A) UV-cross-linking binding of 0.5 μg of GST-MBNL1 Δ to 10,000 CPM of uniformly [$\alpha^{32}\text{P}$] internally labeled *in vitro* transcribed RNA containing 30 CCUG repeats was competed by increasing amounts (0.125, 0.25, 0.5, 1 and 2 μg) of GST-rbFOX2. (B) Upper panel, western-blotting analysis of recombinant purified GST-MBNL1 Δ and of control muscle samples using an antibody against MBNL1. Lower panel, western-blotting analysis of recombinant purified GST-rbFOX1 Δ and of control muscle samples using an antibody against rbFOX1. (C) Quantitative RT-real time PCR analysis of the expression of *MBNL1*, *MBNL2*, *rbFOX1*, *rbFOX2*, *DMPK* and *ZNF9* mRNAs relative to the expression to the *RPLP0* mRNA in human skeletal muscle samples of different ages, including fetus of 24, 26 and 31 weeks, new born of 5 days, infant of 12 years and adult of 32, 45 and 51 years old. Error bars indicate s.e.m. (D) Quantitative RT-real time PCR analysis of the expression of *Mbnl1*, *Mbnl2*, *rbFox1*, *rbFox2*, *Dmpk* and *Znf9* mRNAs relative to the expression to the *Rplp0* mRNA in skeletal muscle (tibialis anterior) samples of wild-type BL6 mouse of different ages, including embryonic day 18 (E18); post natal day 2 and 7 (PN2 and PN7) and 3 months. Error bars indicate s.e.m. (E) Left panel, RNA FISH of expanded CUG repeats coupled to immunofluorescence of MBNL1 on primary cultures of muscle cells from DM1 patients transfected with a control pCDNA3.1 vector or a plasmid expressing GFP-tagged rbFOX1. Magnification, 630x. Scale bars, 10 μm . Nuclei were counterstained with DAPI. Right panel, quantification of the signal of MBNL1 either localized diffusely within the nucleoplasm (free MBNL1) or localized within the CCUG RNA aggregates (MBNL1 foci). Error bars indicate s.e.m. (F) Left panel, RNA FISH of expanded CUG repeats coupled to immunofluorescence of MBNL1 on primary cultures of muscle cells from DM1 patients transduced with an adenovirus expressing an shRNA directed either against the luciferase (CTL) vector or against *rbFOX1*. Magnification, 630x. Scale bars, 10 μm . Nuclei were counterstained with DAPI. Right panel, quantification of the signal of MBNL1 either localized diffusely within the nucleoplasm (free MBNL1) or localized within the CCUG RNA aggregates (MBNL1 foci). Error bars indicate s.e.m.

Figure 1



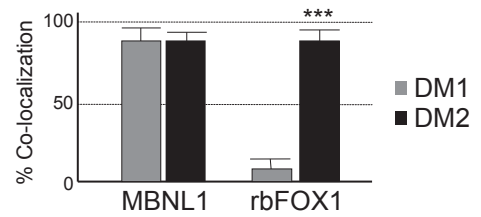
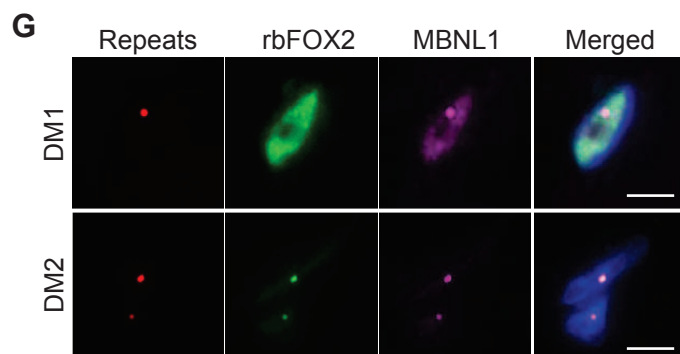
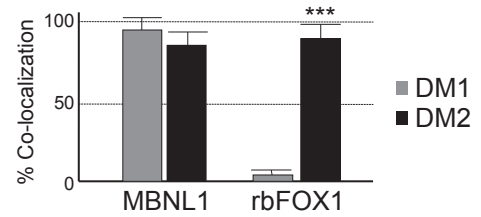
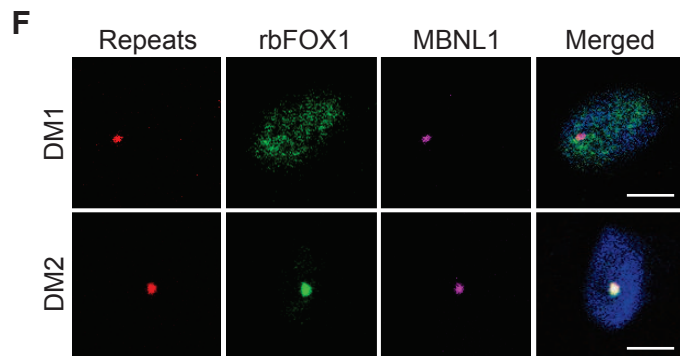
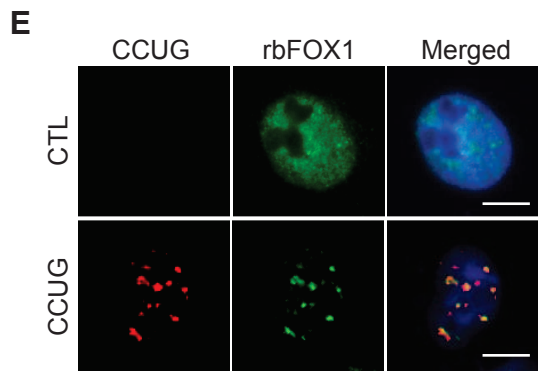
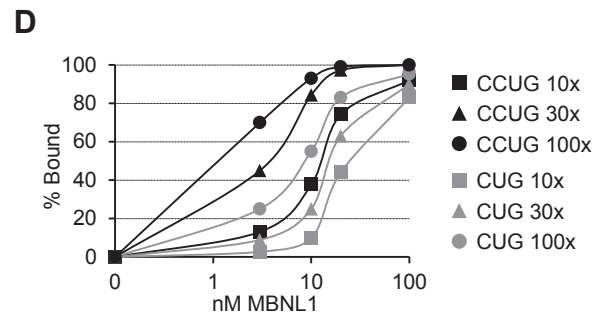
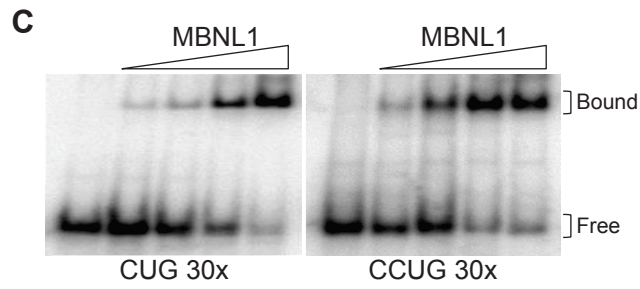
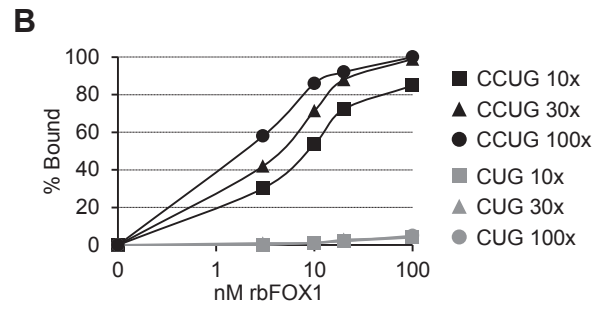
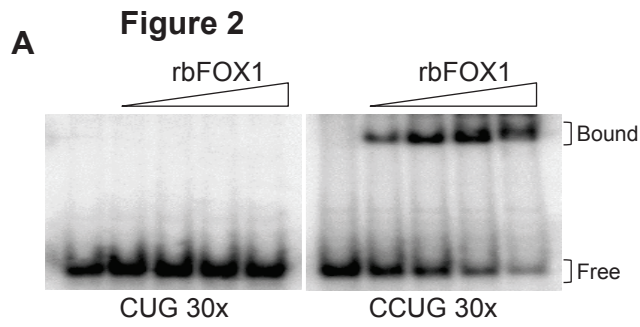


Figure 3

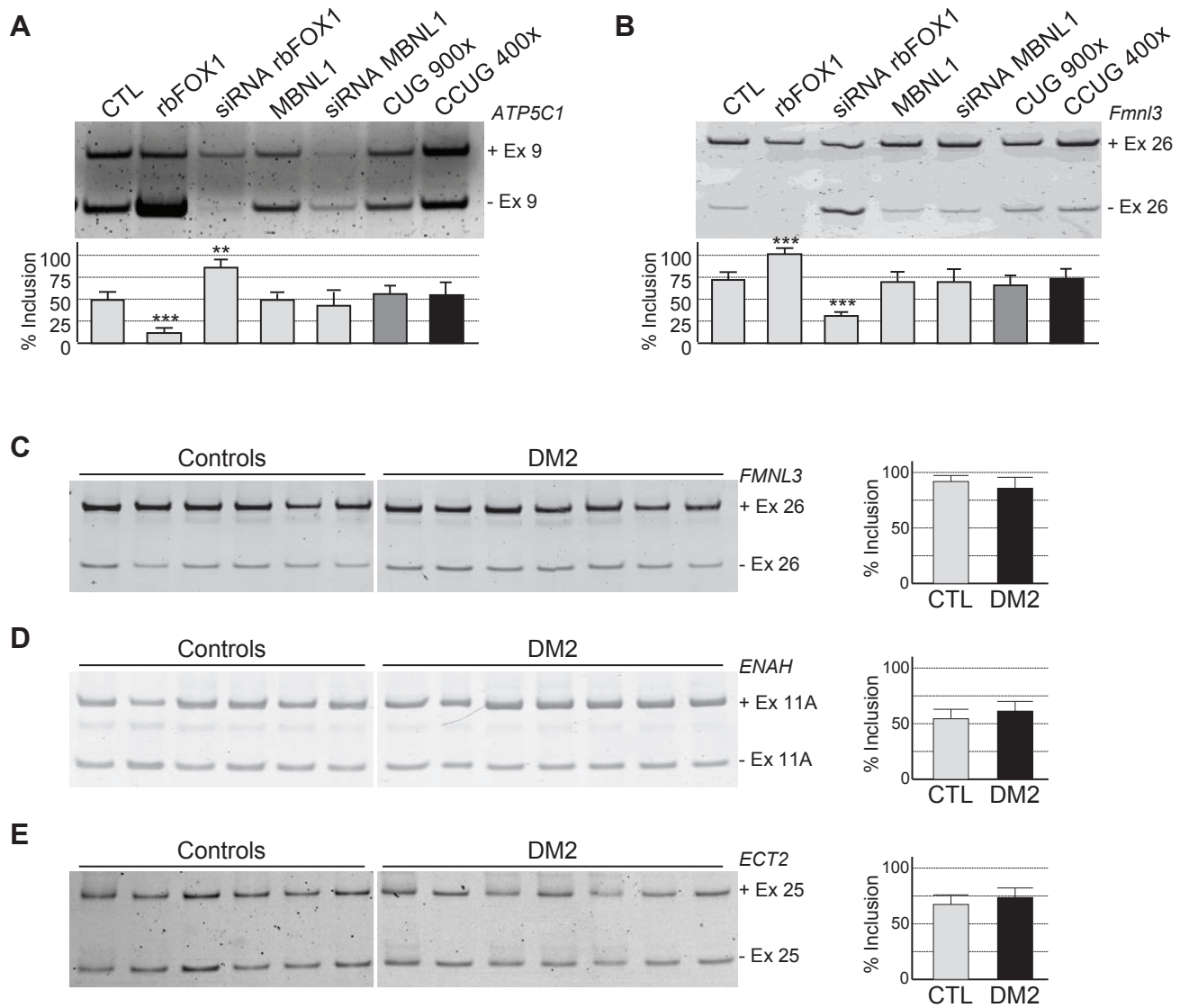
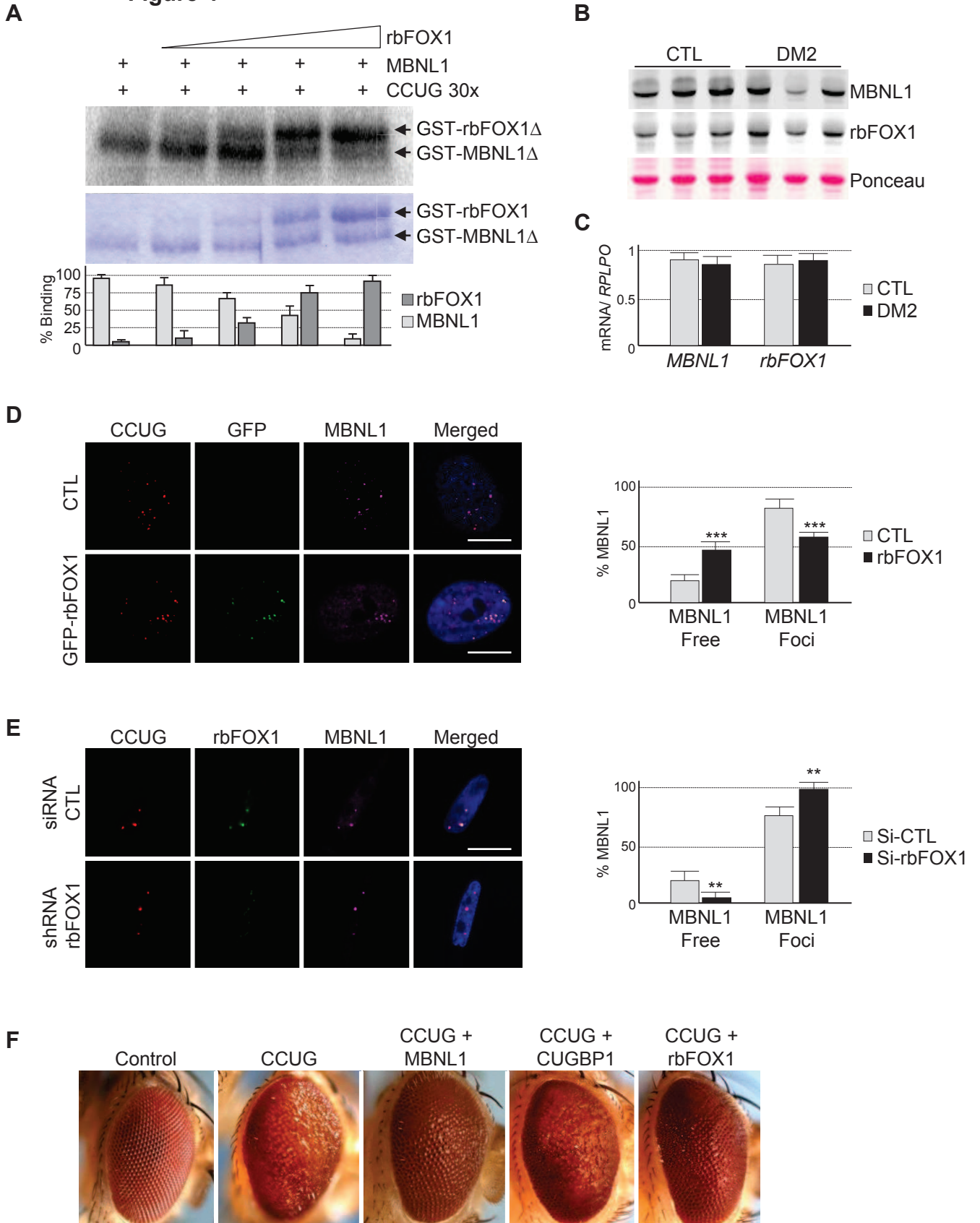


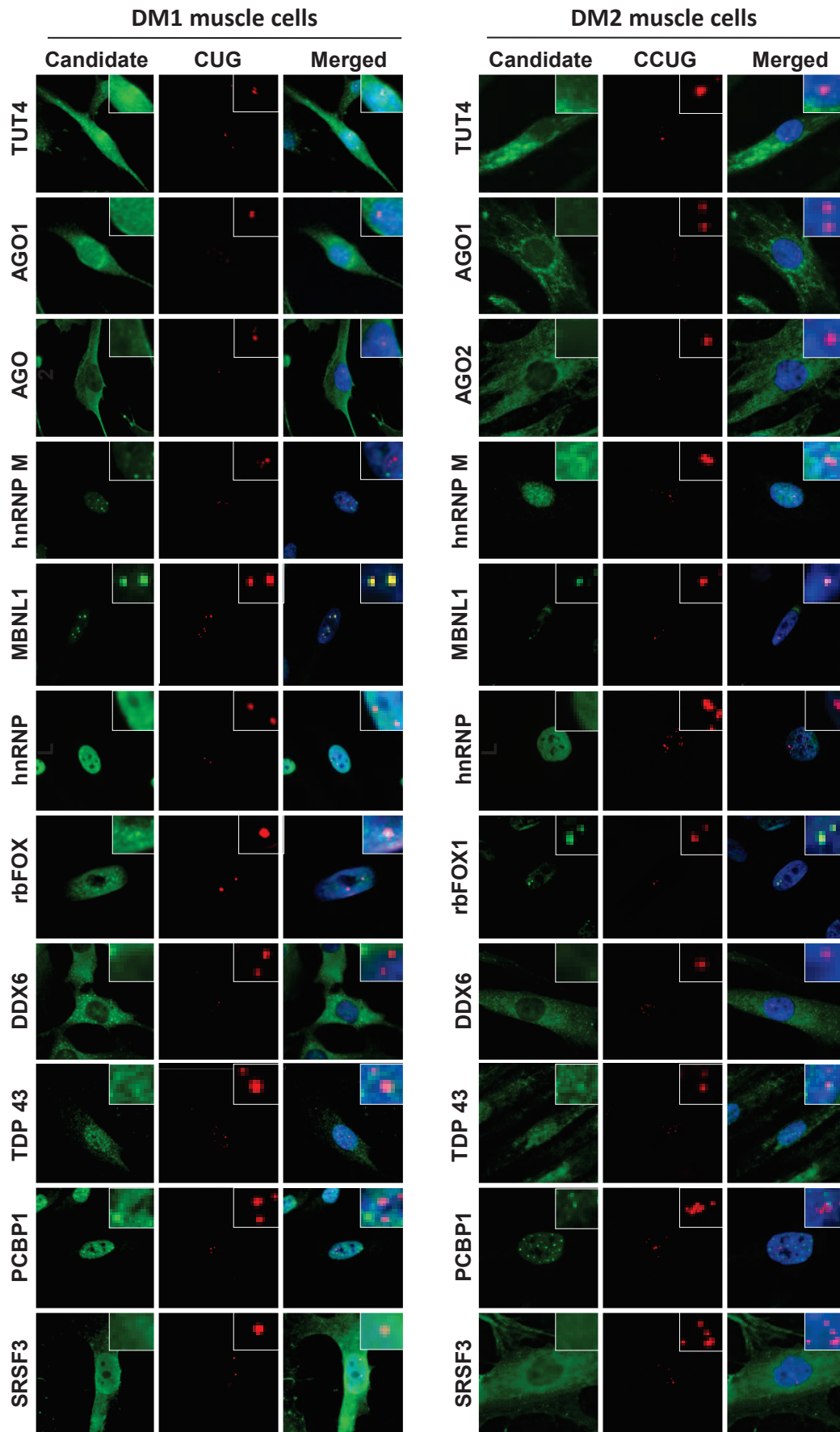
Figure 4



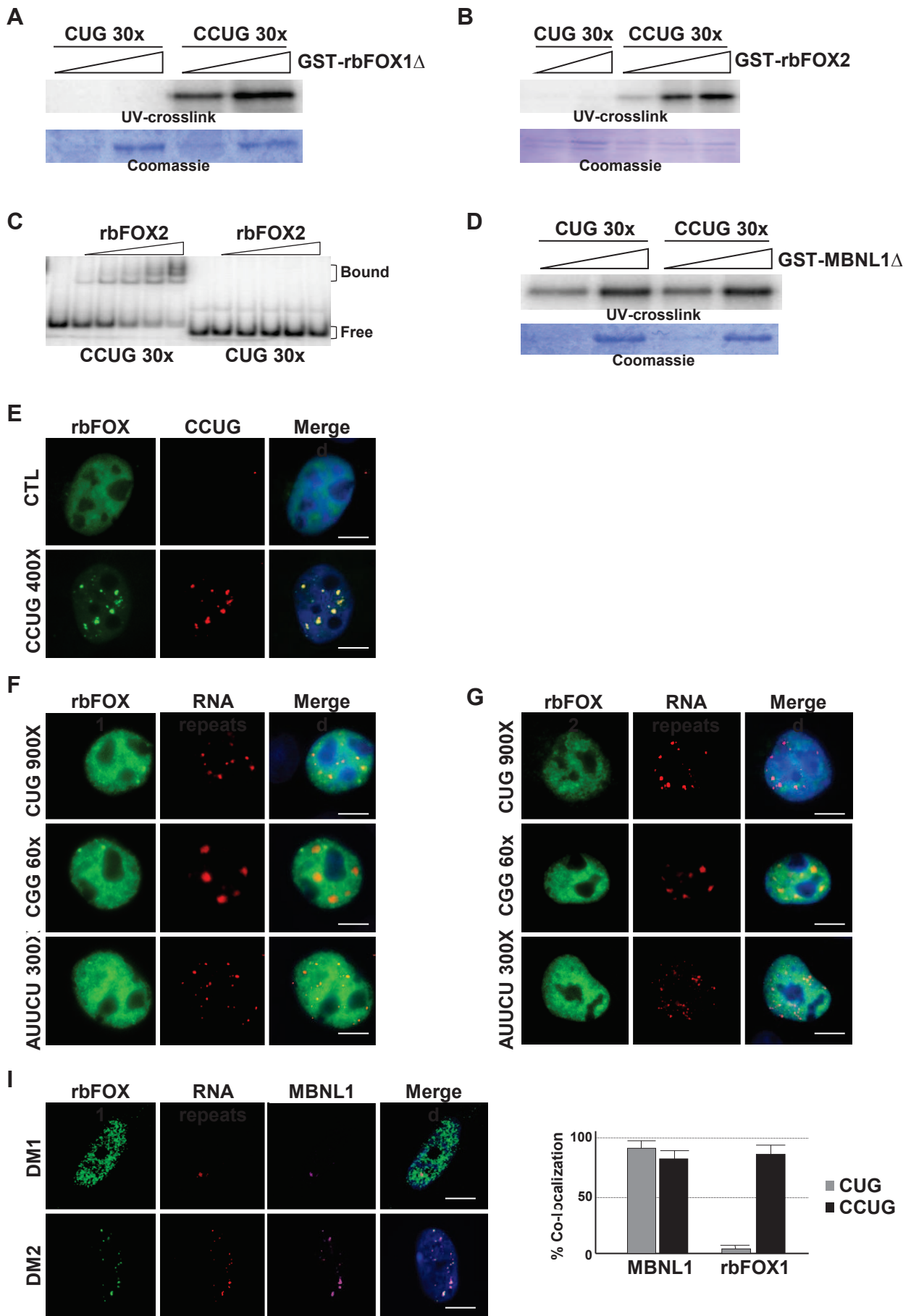
Supplementary Table 1

Gene name	CUG				CCUG			
	Score	Coverage	Peptide	PSM	Score	Coverage	Peptide	PSM
Terminal uridylyltransferase 4 =Zcchc11 [TUT4_MOUSE]	75	1	1	23	81	1	1	25
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6 OS [DDX6_MOUSE]	84	4	1	17	96	4	1	20
TAR DNA-binding protein 43 =Tardbp [TADBP_MOUSE]	21	13	4	6	76	32	9	18
Poly(rC)-binding protein 2 = Pcbp2 [PCBP2_MOUSE]					59	33	7	13
RNA binding protein fox-1 homolog 2 = Rbfox2 [RFOX2_MOUSE]					35	14	4	8
RNA binding protein fox-1 homolog 1 = Rbfox1 [RFOX1_MOUSE]					33	13	4	8
Muscleblind-like protein 1 OS = Mbn1 [MBNL1_MOUSE]	48	6	3	17	19	5	2	7
Protein argonaute-1 = Eif2c1 [AGO1_MOUSE]	2	2	1	1	27	10	6	7
Protein argonaute-2 = Eif2c2 [AGO2_MOUSE]	2	2	1	1	24	9	6	7
Serine/arginine-rich splicing factor 3 = Srsf3 [SRSF3_MOUSE]					21	18	3	7
Poly(rC)-binding protein 1 = Pcbp1 [PCBP1_MOUSE]					21	13	3	5
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L = Hnrnp1 [HNRPL_MOUSE]					18	5	2	5
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M = Hnrmpm [HNRPM_MOUSE]	19	9	5	5	10	5	3	3
RNA binding protein fox-1 homolog 3 = Rbfox3 [RFOX3_MOUSE]					12	10	3	3
Nucleolysin TIAR = Tial1 [TIAR_MOUSE]	8	6	2	2	9	8	2	2
Zinc finger CCCH domain-containing protein 10 = Zc3h10 [ZC3HA_MOUSE]	8	6	2	2	7	8	2	2
Far upstream element-binding protein = Khsp [FUBP2_MOUSE]	3	1	1	1	8	6	2	2
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 2 = [HNRL2_MOUSE]	3	1	1	1	9	4	2	2
ATP-dependent RNA helicase DDX3Y = Ddx3y [DDX3Y_MOUSE]	3	3	1	1	5	3	1	2
Serine/arginine-rich splicing factor 2 = Srsf2 [SRSF2_MOUSE]					4	8	2	2
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K = Hnrmpk [HNRPK_MOUSE]					8	6	2	2
Nucleolin = Ncl [NUCL_MOUSE]					6	5	2	2
Serine/arginine-rich splicing factor 5 = Srsf5 [SRSF5_MOUSE]					6	3	1	2
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 = [ROA2_MOUSE]					6	3	1	2
Nucleolysin TIA-1 = Tia1 [TIA1_MOUSE]	6	9	2	2	3	3	1	1
Speckle-type POZ protein-like = Spopl [SPOPL_MOUSE]	3	5	1	1	3	5	1	1
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 = Hnrmpd [HNRPD_MOUSE]	3	4	1	1	4	4	1	1
CCR4-NOT transcription complex subunit 6 = Cnot6 [CNOT6_MOUSE]	3	4	1	1	3	4	1	1
RNA-binding protein Raly = Raly [RALY_MOUSE]					3	12	1	1
Pre-mRNA-splicing factor RBM22 = Rbm22 [RBM22_MOUSE]					3	8	1	1
Pre-mRNA-splicing factor 38B = Prpf38b [PR38B_MOUSE]					3	6	1	1
U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp31 = Prpf31 [PRP31_MOUSE]					3	4	1	1
Splicing factor 3B subunit 1 = Sf3b1 [SF3B1_MOUSE]					3	3	1	1
CUGBP Elav-like family member 2 = Celf2 [CEL2_MOUSE]					3	2	1	1
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 1 = [HNRL1_MOUSE]					3	2	1	1
Splicing factor, proline- and glutamine-rich = Sfpq [SFPQ_MOUSE]					3	2	1	1
Matrin-3 OS = Matr3 [MATR3_MOUSE]					3	2	1	1
Fragile X mental retardation protein 1 homolog = Fmr1 [FMR1_MOUSE]					2	1	1	1
RNA-binding protein = Rbm10 [RBM10_MOUSE]					2	1	1	1
S1 RNA-binding domain-containing protein 1 = Srd1 [SRBD1_MOUSE]					2	1	1	1
RNA-binding protein 28 = Rbm28 [RBM28_MOUSE]	11	3	1	4				
Putative ATP-dependent RNA helicase DHX57 = Dhx57 [DHX57_MOUSE]	3	1	1	1				
Pre-mRNA-splicing factor ISY1 homolog = Isy1 [ISY1_MOUSE]	3	9	1	1				
Zinc finger RNA-binding protein = Zfr [ZFR_MOUSE]	3	3	1	1				
Terminal uridylyltransferase 7 = Zcchc6 [TUT7_MOUSE]	3	1	1	1				
40S ribosomal protein S4, X isoform = Rps4x [RS4X_MOUSE]	3	3	1	1				
Splicing factor U2AF 35 kDa subunit = U2af1 [U2AF1_MOUSE]	3	7	1	1				
Putative RNA-binding protein 15B = Rbm15b [RB15B_MOUSE]	2	2	1	1				

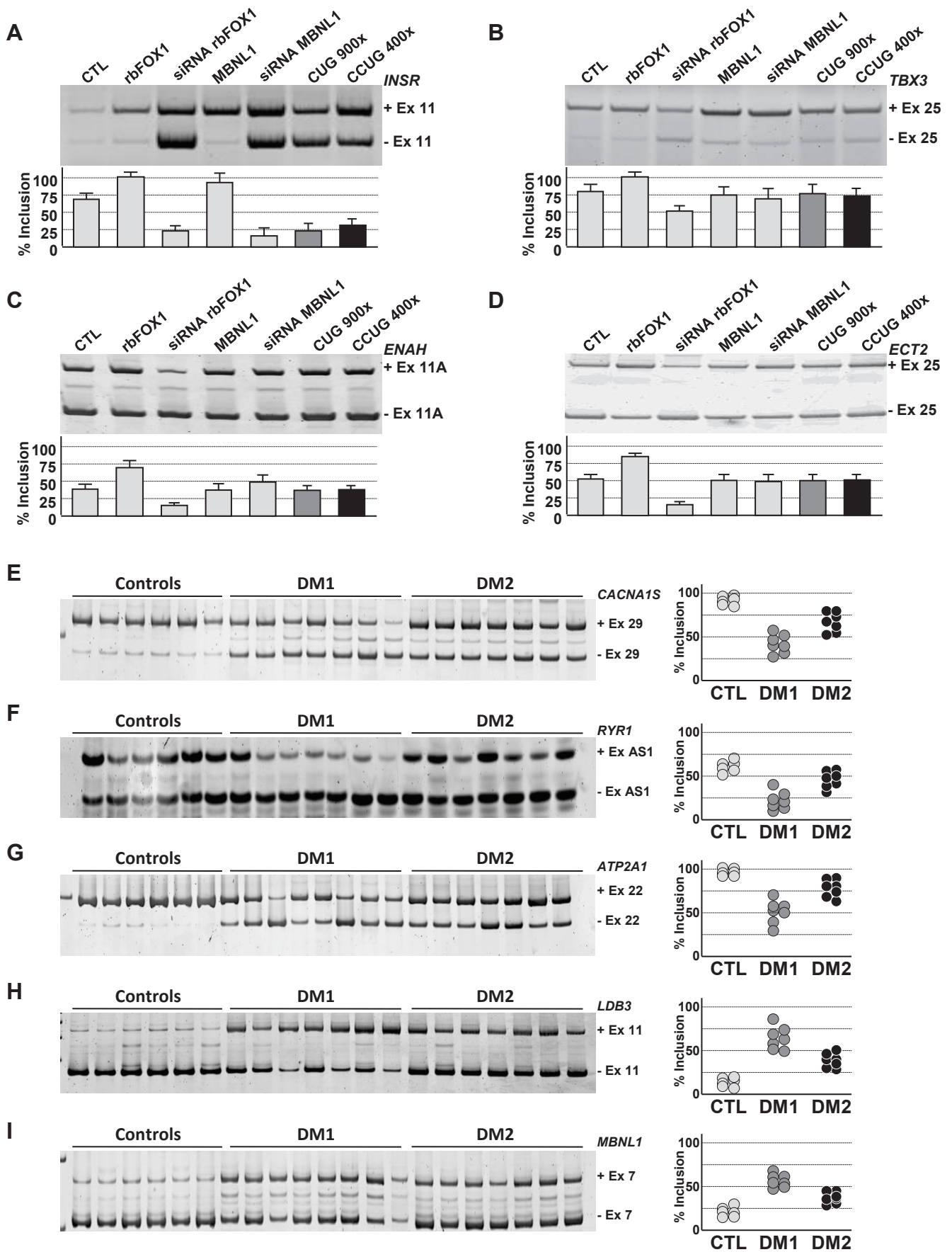
Supplementary Figure 1



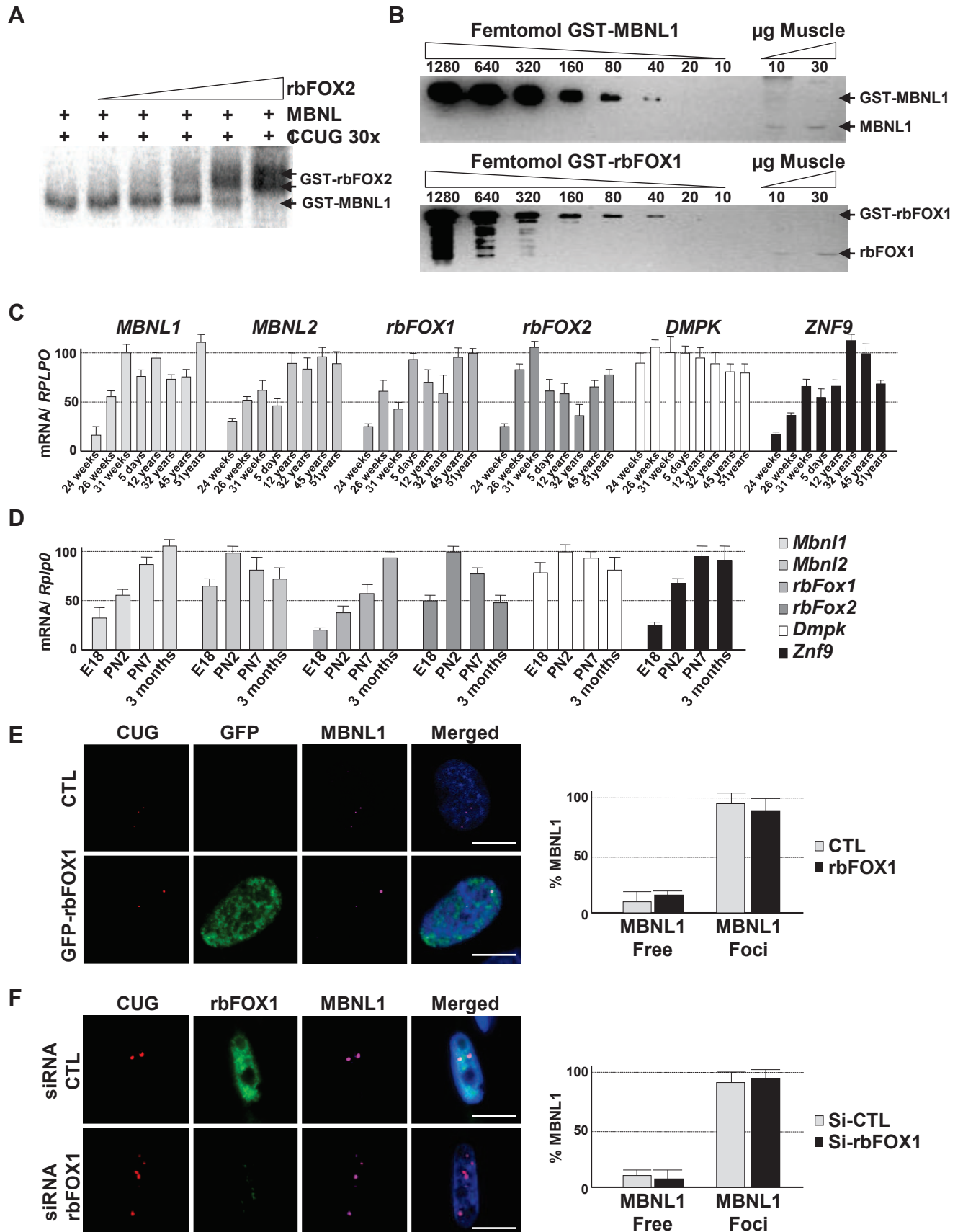
Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 4



ANNEXE 3

Implication des protéines NOVA dans les ataxies spinocérébelleuses de type 10 et 31.

Les ataxies spinocérébelleuses de type 10 et 31 sont des maladies dues à des expansions de nucléotides situées dans des régions non codantes qui conduisent à une dégénérescence des cellules de Purkinje du cervelet, ce qui entraîne une perte de la coordination fine des mouvements volontaires (Matsuura *et al.*, 2000 ; Sato *et al.*, 2009).

Ainsi, l'ataxie spinocérébelleuse de type 10 (SCA10) représente la seconde cause d'ataxie cérébelleuse au Mexique et au Brésil. Toutefois, cette ataxie s'accompagne d'épilepsie dans les populations d'origine mexicaine ; alors qu'elle est décrite comme une ataxie pure dans les familles d'origine brésilienne (Teive *et al.*, 2004 ; Teive *et al.*, 2012). Cette maladie est due à l'expansion des répétitions des nucléotides ATTCT (de 800 à 4500) dans l'intron 9 du gène *ATXN10* sur le chromosome 22 (Zu *et al.*, 1999 ; Matsuura *et al.*, 2000). Ces répétitions ATTCT sont « pures » dans les populations brésiliennes, mais présentent une insertion de plusieurs centaines de répétitions ATCCC dans les populations mexicaines (Cherng *et al.* 2011 ; McFarland *et al.*, 2013 ; Dr. Sarkar et Professeur Ashizawa, communication personnelle). L'étude de modèles murins transgéniques montre que les répétitions AUUCU recrutent et séquestrent le facteur d'épissage hnRNP K. Cette séquestration conduit à une mort neuronale par apoptose (White *et al.*, 2010). A l'exclusion de cette étude, peu de travaux ont été menés sur les mécanismes moléculaires impliqués dans cette maladie. Enfin, les répétitions AUCCC qui différencient les populations mexicaines des populations brésiliennes sont encore très peu étudiées.

L'ataxie spinocérébelleuse de type 31 (SCA31) est une maladie neurodégénérative caractérisée par une ataxie cérébelleuse progressive pure (Owada *et al.*, 2005). Il s'agit de l'ataxie spinocérébelleuse la plus commune au Japon après SCA3 et SCA6. En 2009, une étude menée par l'équipe du Professeur Ishikawa a montré que la cause génétique de SCA31 est une expansion de répétitions des nucléotides TGGAA de 2,5 à 3,8 kb située dans une région non codante localisée entre les gènes *TK2* (Thymidine Kinase 2) et *BEAN* (Brain Expressed, Associated with NEDD4) sur le chromosome 16. Ces répétitions sont transcrites et s'accumulent dans le noyau des cellules de Purkinje des patients SCA31 (Sato *et al.*, 2009). De plus, des ARNs portant des répétitions UGGAA lient les protéines SFRS1 et SFRS9 *in vitro*. Cependant, la séquestration de ces protéines chez les patients SCA31 n'a pas été démontrée, et les mécanismes moléculaires à l'origine de cette maladie sont encore mal caractérisés.

Récemment, l'existence de transcrit dit « antisens » à une expansion de nucléotides chez les patients atteints de SCA8, de dystrophie myotonique et de Huntington like 2 (Moseley *et al.*, 2006 ; Wilburn *et al.*, 2011 ; Zu *et al.*, 2011 ; Huguet *et al.*, 2012), nous a

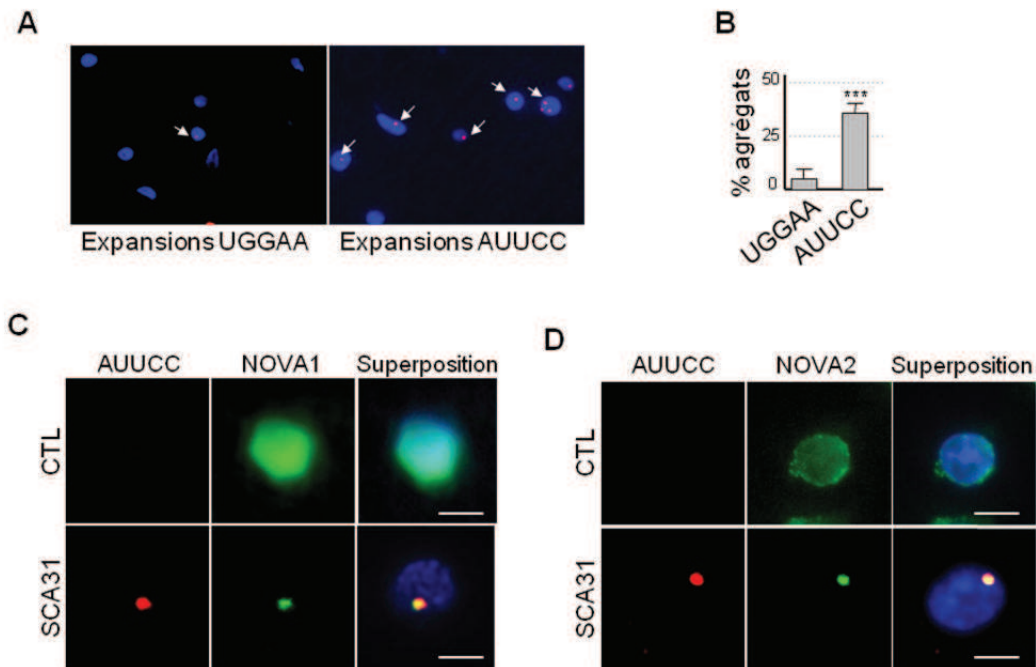


Figure 51: Existence d'un ARN « antisens » et colocalisation des protéines NOVA avec cet ARN antisens dans le cerveau de patients atteints de SCA31.

(Chantal Sellier, données non publiées)

A. Foci nucléaires détectés par hybridation *in situ* (ARN-FISH) des expansions UGGAA (ARN sens) et AUUCC (ARN antisens) utilisant respectivement des sondes nucléiques TTCCA et GGAAT dans des coupes de cerveau de patients SCA31.

B. Quantification du nombre de foci composés des expansions UGGAA (ARN sens) et AUUCC (ARN antisens) dans des coupes de cerveau de patients SCA31.

C, D. Colocalisation des protéines NOVA-1 et NOVA-2 avec les expansions AUUCC (ARN antisens) dans des coupes de cerveau de patients SCA31. Détection des protéines par immunofluorescence et des agrégats d'ARN contenant les expansions AUUCC par A-FISH.

conduit à émettre l'hypothèse que l'expansion de répétitions TGGAA responsable de SCA31 pouvait être transcrite dans les deux sens générant un ARN contenant des répétitions UGGAA dit « sens » (Sato *et al.*, 2009) et un ARN contenant des répétitions AUUCC dit « antisens ». Au laboratoire, Chantal Sellier a ainsi mis en évidence la présence d'agrégats d'ARN contenant des expansions AUUCC dans des lames de cerveau de patients SCA31, alors que les agrégats d'ARN UGGAA sont beaucoup plus rares (figure 51A et B). Il semblerait donc que les répétitions TGGAA responsables de SCA31 soient transcrites en « antisens » conduisant à des agrégats d'ARN AUUCC. Toutefois, il reste à déterminer quelles protéines se lient à ces ARNs. Il est aussi à noter que ces répétitions AUUCC sont très proches des répétitions AUCCC, responsables de SCA10 chez les populations mexicaines. Par des expériences de colonne d'affinité composée des expansions AUUCU (SCA10, Brésil), AUCCC (SCA10, Mexique) ou AUUCC (SCA31, Japon). Nous avons identifié que les protéines NOVA-1 et NOVA-2 interagissent spécifiquement avec les expansions AUCCC (SCA10, Mexique) et AUUCC (SCA31), mais non des expansions AUUCU (SCA10, Brésil). Les protéines NOVA ont été les premiers facteurs d'épissage spécifiques des neurones découverts chez les mammifères (Yang *et al.*, 1998). Ces protéines lient *via* leurs trois domaines KH (« hnRNP K Homology domain ») le motif ribonucléique YCAY (Teplova *et al.*, 2011). Il est intéressant de noter que les expansions AUUCC et AUCCC possèdent toutes deux ce motif CCAU, tandis que les expansions AUUCU (SCA10, Brésil) ne contiennent pas cette séquence. Nous avons donc émis l'hypothèse que les répétitions d'ARN AUUCC et AUCCC pouvaient lier et séquestrer les protéines NOVA. De plus, il est intéressant de noter que les protéines NOVA sont impliquées dans des syndromes neurodégénératifs de type POMA (« Paraneoplastic Opsoclonus Myoclonus Ataxia ») dues à des anticorps autoimmuns dirigés contre ces protéines (Yang *et al.*, 1998).

Afin d'étudier l'implication de NOVA dans les pathologies SCA10 et SCA31, nous avons donc testé l'interaction entre la protéine NOVA-1 et les expansions ribonucléotidiques de type AUUCU (SCA10, Brésil), AUCCC (SCA10, Mexique) ou AUUCC (SCA31). Pour cela, j'ai effectué des expériences de retard sur gel avec ces différents transcrits et une protéine recombinante GST-NOVA-1. En contrôle positif, j'ai utilisé une séquence contenant trois motifs YCAY utilisée précédemment pour déterminer la structure de NOVA-1 (Teplova *et al.*, 2011). De façon intéressante, la protéine NOVA-1 lie avec une forte affinité les répétitions AUUCC (SCA31) et AUCCC (SCA10, Mexique) avec un Kd apparent de 0,05 nM, tandis que NOVA-1 ne lie pas l'ARN AUUCU (SCA10, Brésil) (Figure 52).

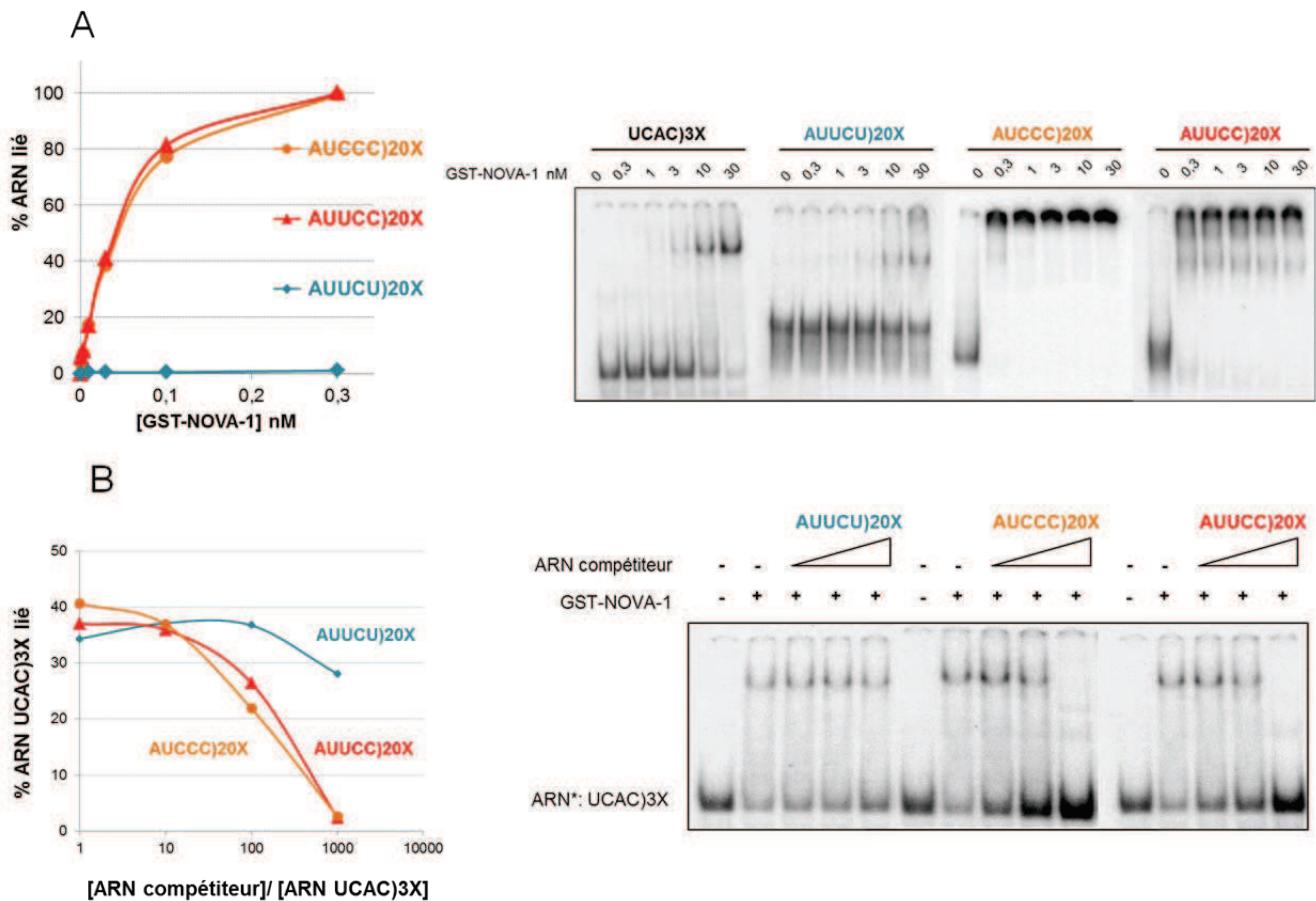


Figure 52 : NOVA-1 avec différentes expansions d'ARN à l'origine de SCA10 et SCA31.

Les expériences de retard sur gel ont été effectuées avec la protéine recombinante GST-NOVA-1 et différents transcrits marqués uniformément au ^{32}P .

A. NOVA-1 lie l'ARN UCAC)3X (contrôle positif), et lie le transcrit AUUCC)20X (SCA31), et le transcrit AUC)20X (SCA10, Brésil). NOVA-1 n'interagit pas avec l'ARN contenant les répétitions AUUCU)20X (SCA10, Mexique). Le graphique indique le pourcentage d'ARN lié à NOVA-1 en fonction de la concentration de protéine en nM.

B. Test de compétitions pour la fixation de NOVA-1 entre l'ARN contrôle UCAC)3X marqué uniformément au ^{32}P et les ARNs non marqués au ^{32}P , constitués des répétitions AUUCC)20X (SCA31), AUC)20X (SCA10, Brésil) ou AUUCU)20X (SCA10, Mexique) en présence de GST-NOVA-1 à 10 nM. Les ARNs compétiteurs correspondent aux ARNs non marqués composés des différentes répétitions. Le graphique indique le pourcentage d'ARN UCAC)3X lié à NOVA-1 en fonction du ratio des concentrations [ARN compétiteur]/[ARN UCAC)3X].

Puis, afin de tester si les ARNs mutants AUUCC (SCA31) et AUCCC (SCA10, Mexique) pouvaient empêcher l'interaction entre le facteur d'épissage NOVA-1 et son ARN pré-messager cible, des expériences de compétitions *in vitro* ont été réalisées. Ces retards sur gel indiquent que les ARNs contenant les répétitions AUUCC (SCA31) et AUCCC (SCA10 Mexique), mais pas les répétitions AUUCU (SCA10, Brésil) perturbent fortement l'interaction entre NOVA-1 et son ARN cible contenant trois motifs UCAC (figure 51B). Ces résultats suggèrent que l'interaction de NOVA avec les ARNs mutants dans les pathologies SCA10 (Mexique) et SCA31 pourraient empêcher la fixation et l'action de NOVA sur ses ARNs cibles, et ainsi conduire à des défauts d'épissages alternatifs entraînant la mort neuronale chez ces patients.

Les protéines NOVA régulent de nombreux épissages alternatifs neuronaux (Ule *et al.*, 2005a ; Ule *et al.*, 2005b). En perspectives, il serait donc intéressant d'étudier dans des échantillons d'ARN de patients SCA10 et SCA31, les épissages alternatifs des cibles de NOVA impliquées dans la signalisation cellulaire (*CAMK2 γ*), dans la libération des neurotransmetteurs (*GABRG2*, *GLRA2*, *CACNA1B*, *KCNQ2*, *ATP2B1*), dans la jonction neuro-musculaire (*AGRN*), dans la localisation des récepteurs et canaux ioniques (*ANK3*) et dans la structure des neurones (*CLASP1*). Ainsi, des défauts d'épissages alternatifs de gènes essentiels au fonctionnement des neurones pourraient conduire à la mort neuronale observée chez les patients POMA, SCA10 et SCA31.

En conclusion, ces résultats sont importants car ils permettraient de différencier les ataxies spinocérébelleuses contenant des répétitions AUUCU (SCA10, Brésil) de celles contenant des répétitions AUCCC (SCA10, Mexique), mais aussi de relier les ataxies SCA10 et SCA31 aux ataxies POMA. Enfin, ces résultats nous permettraient aussi de mieux comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine de ces maladies afin de les modéliser chez la souris.

ANNEXE 4

**Implication de Tra2- β dans la maturation
de miARNs spécifiques.**

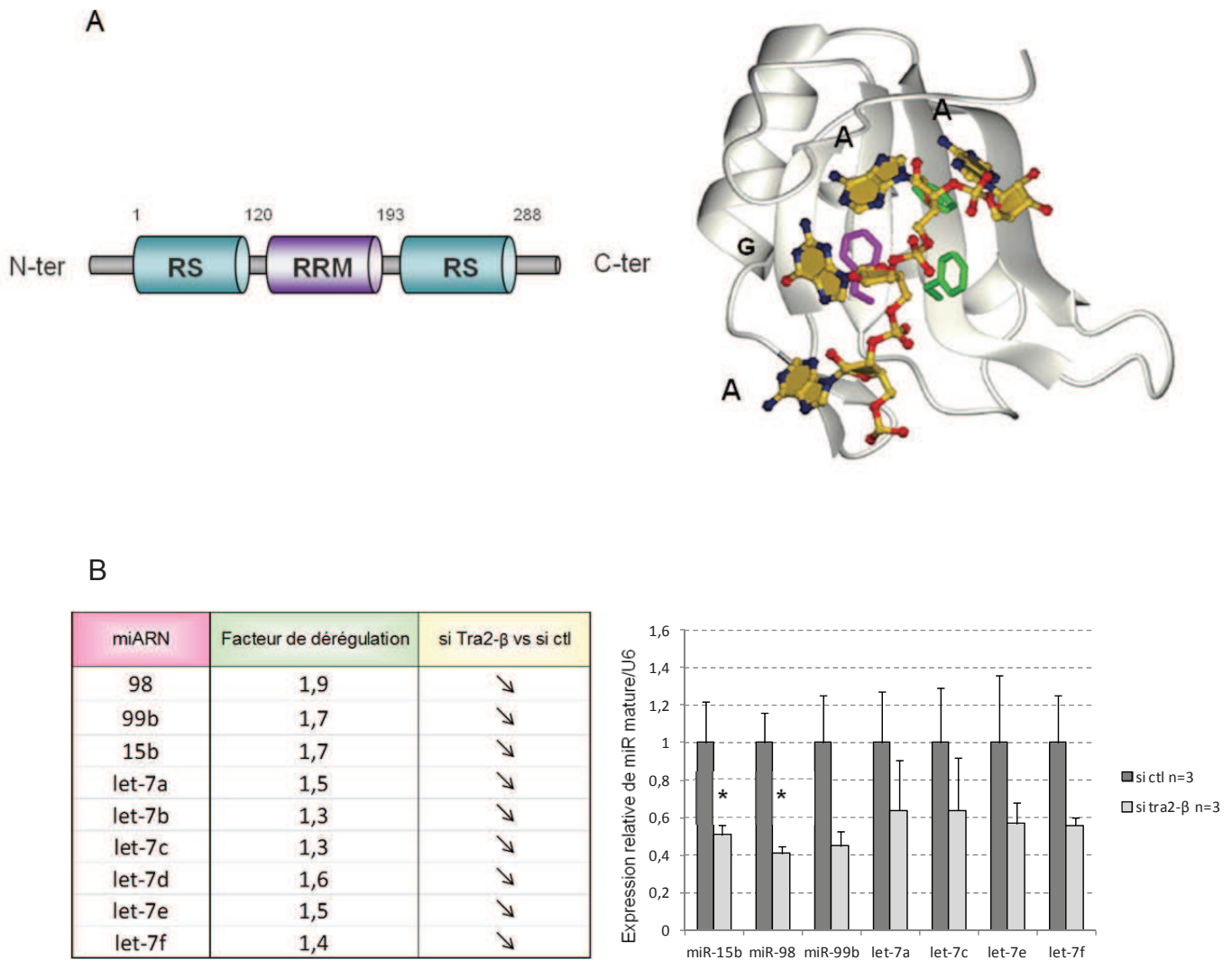


Figure 53 : Expression des miARNs suite à la déplétion de Tra2-β dans les cellules HeLa.

A. A gauche, représentation schématique des domaines de Tra2-β ; à droite, structure du RRM (« RNA Recognition Motif ») de Tra2-β obtenue par résonance magnétique nucléaire (RMN) (Tsuda *et al.*, 2010). Les lettres AGAA en noir indiquent les nucléotides en interaction avec le RRM de Tra2-β.

B. Résultats des puces à ADN (Agilent) à partir de cellules déplétées ou non en Tra2-β (si ctl n=3 ; si Tra2-β n=3). Seuls sont représentés les miARNs possédant une p value corrigée est inférieure à 0,5. La flèche pointant vers le bas dans la dernière colonne signifie que la quantité du miARN est diminuée dans les échantillons déplétés en Tra2-β. A droite, validation des résultats de puces à ADN spécifiques des miARNs par qRT-PCR. * : p<0,05.

Transformer 2-beta (TRA2- β ; SFRS10), est une protéine appartenant à la famille des protéines SR-Like qui se lie spécifiquement au motif ribonucléotidique AGAA (figure 53A) (Tsuda *et al.*, 2010 ; Cléry *et al.*, 2011). Cette protéine est caractérisée comme un régulateur de l'épissage alternatif de nombreux ARNs pré-messagers, notamment de l'exon 7 de *SMN2* et de l'exon 10 de *MAPT*. Comme de nombreuses protéines qui régulent l'épissage alternatif se sont révélées être également des régulateurs de la maturation des miARNs, j'ai étudié le rôle potentiel de TRA2- β dans la maturation des miARNs. Grâce à des puces à ADN spécifiques des miARNs matures, j'ai comparé le niveau d'expression des miARNs dans des cellules HeLa exprimant ou non TRA2- β . L'analyse de ces résultats met en évidence une diminution de la quantité de neuf miARNs classés suivant leur niveau de dérégulation (figure 53B). La validation de ces résultats par RT-PCR quantitative (qRT-PCR) à partir des mêmes échantillons, montre que parmi ces miARNs, l'expression de miR-98 et miR-15b est la plus altérée par l'absence de TRA2- β ($p < 0,05$).

Afin de savoir si la diminution de l'expression de miR-15b est due à une diminution de la transcription ou de la maturation de miR-15b, j'ai alors quantifié par qRT-PCR l'expression du précurseur de miR-15b, pré-miR-15b, ainsi que l'ARNm de son gène hôte, *DLEU2*. En l'absence de Tra2- β , les quantités d'ARNm *DLEU2* et du pré-miR-15b sont réduites, signifiant donc que la diminution de miR-15b serait transcriptionnelle.

De même, pour déterminer si la diminution de miR-98 est due à une altération de sa transcription ou de sa maturation, j'ai quantifié l'expression de son précurseur et de son gène hôte. MiR-98, ainsi que le miARN let-7f2, sont situés dans l'intron 59 du gène *HUWE1* sur le chromosome X (figure 54A). De plus, il est à noter que miR-98 est l'un des 13 membres de la famille let-7. Cette famille de miARNs inhibe l'expression de nombreux oncogènes tels que MYC, RAS et HMGA2. Enfin, la biogenèse des miARN de type let-7 est régulée négativement par les protéines LIN28 et TUT-4, qui inhibent le clivage des pré-let-7 par DICER (Heo *et al.*, 2008 ; Heo *et al.*, 2009). La quantification par qRT-PCR de l'expression de pré-miR-98, de son co-transcrit pré-let-7f2 ainsi que de l'ARNm de leur gène hôte, *HUWE1*, montre que la quantité de ces précurseurs ou d'ARNm *HUWE1* est inchangée en l'absence de TRA2- β (figure 54B). Ces résultats montrent que la diminution de miR-98 n'est pas due à une altération de la transcription, et suggèrent que TRA2- β régulerait positivement la maturation de pré-miR-98 en miARN mature.

Afin de tester l'effet de TRA2- β sur la maturation de miR-98, nous avons cloné le pré-miR-98 dans un vecteur (pCDNA3.1) permettant l'expression de celui-ci sous un promoteur fort viral (CMV) dans des cellules eucaryotes. Ainsi, la surexpression de GFP-TRA2- β dans

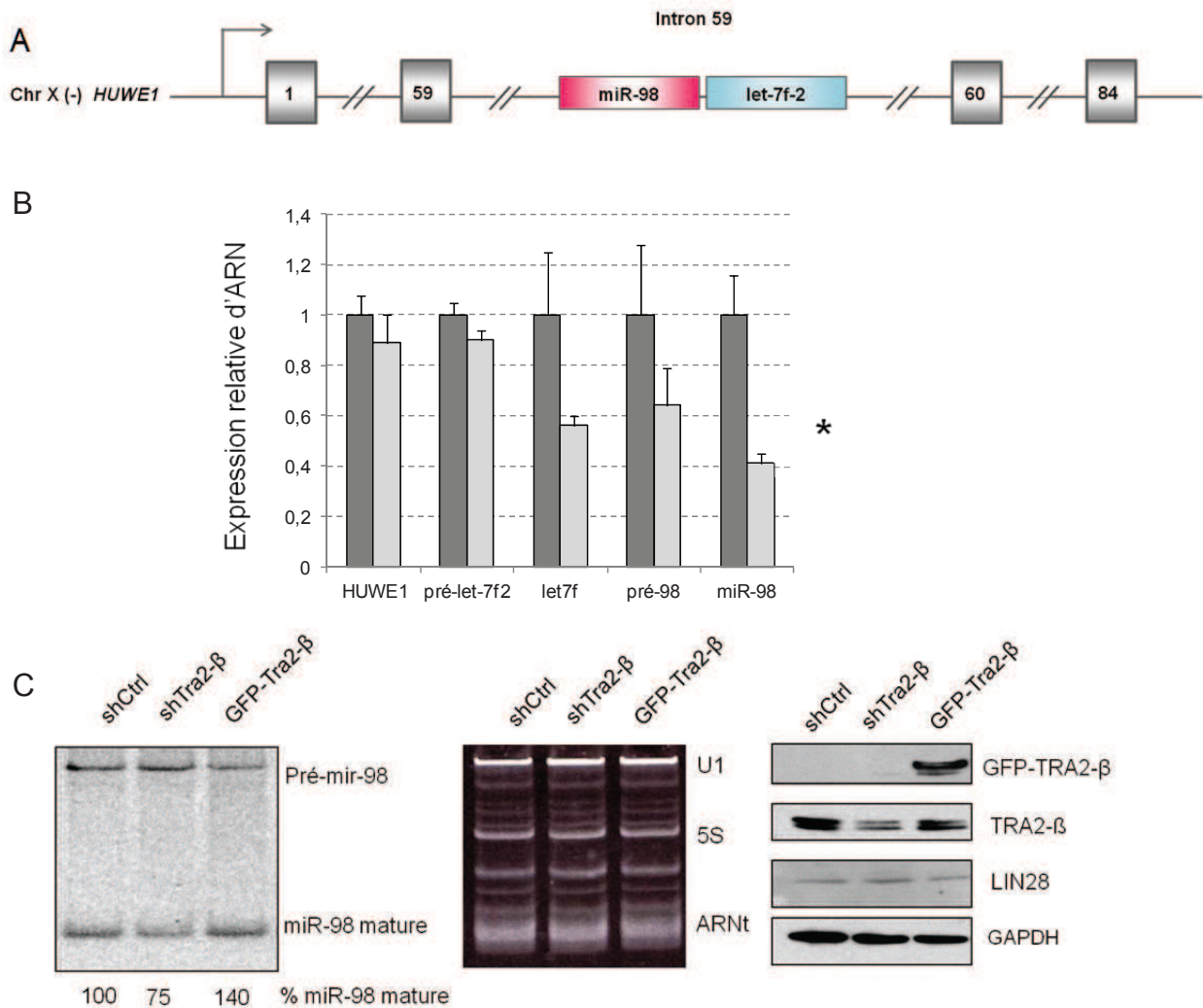


Figure 54 : Effet de Tra2-β sur la maturation de miR-98.

A. Mir-98 est co-transcrit avec let-7f2 sous le promoteur du gène *HUWE1*. Les rectangles gris, rose et bleu représentent respectivement, les exons du gène *HUWE1*, les pri-miR-98 et le pri-let-7f2.

B. Analyse de l'expression du gène hôte et du pré-miR-98. Les quantités des miARNs et des ARNm (*HUWE1*) sont normalisées respectivement par rapport à l'ARN snARN U6 et à l'ARNm *RPLP0*. * : $p < 0,05$.

C. Maturation *in cellulo* : cellules HeLa co-transfectées par un plasmide exprimant le pri-miR-98 et un plasmide exprimant soit un shARN contre la luciférase (shctl), ou contre Tra2-β (shTra2-β), ou exprimant Tra2-β-GFP. Après 24h de transfection, les intermédiaires de la maturation de miR-98 sont analysés par Northern blot. Les pourcentages de miR-98 indiqués sont le résultat de rapport de miARN mature sur la somme des intermédiaires normalisé par rapport au pourcentage dans la piste contre shCtl. La qualité des ARNs et la surexpression de Tra2-β sont vérifiées respectivement par coloration au bromure d'éthidium (les ARNs snARN U1, ARNr 5S et ARNt sont indiqués) et par Western blot.

des cellules HeLa exprimant ce pri-miR-98 exogène, montre que TRA2-beta stimule la maturation de miR-98 mature (figure 54C).

TRA2- β lie le motif ARN simple brin de séquence AGAA. Parmi les membres de la famille de miARN let-7, seuls miR-98 et let-7a2 présentent un motif AGAA au niveau de la boucle de leurs précurseurs (figure 55A). Nous avons donc cloné le domaine RRM de TRA2- β fusionné à une étiquette « 6 Histidines », exprimé cette protéine dans des bactéries *Escherichia coli* BL21 (DE3) codon plus et purifié cette protéine recombinante par colonne d'affinité nickel. Toutefois, cette protéine est co-purifiée avec une RNase endogène de la bactérie, ce qui prévient tout test d'interaction ARN-protéine. J'ai alors utilisé une protéine recombinante TRA2- β entière, fusionnée à une étiquette « FLAG », exprimée à partir de cellules eucaryotes 293FT, et purifiée par colonne d'affinité anticorps anti-FLAG. Mes analyses d'interaction ARN/protéine par retard sur gel montrent que TRA2- β lie spécifiquement le pré-miR-98, mais ne lie pas à son co-transcrit, le pré-let-7f2 (figure 55B, 3C). La délétion de la séquence AGAA au niveau de la boucle de pré-miR-98 abolit la fixation de TRA2- β (figures 55B et C), démontrant ainsi que cette protéine pourrait réguler, *via* une interaction directe à la séquence AGAA, la maturation de pré-miR-98 en miR-98 mature.

Cette séquence AGAA, reconnue par TRA2- β , pouvant être présente dans d'autres pré-miARNs, nous avons alors effectué une analyse bioinformatique (collaboration avec Dr Auboeuf, INSERM, Lyon), et identifié trois miARNs, miR-19a, miR-204 et miR-425, présentant une séquence AGAA dans la boucle terminale de leur précurseur (figure 56A). L'analyse par qRT-PCR de l'expression de ces miARNs montre une diminution significative de la quantité de miR-204 et de miR-425 en absence de TRA2- β , suggérant ainsi que ces miARNs pourraient être régulés par TRA2- β (figure 56B). Des analyses de l'expression de leurs précurseurs devraient nous renseigner quant à la possible régulation de leur maturation par TRA2- β .

LIN28B est un régulateur négatif de la maturation de plusieurs membres de la famille let-7 (let-7a, -7d, -7f, -7g), qui lie le motif GGAG situé dans la boucle des pré-let-7 et inhibe ainsi le clivage de DICER (Nam *et al.*, 2011). MiR-98, étant un membre de la famille let-7, nous avons aussi testé l'interaction entre miR-98 et la protéine. Nous avons produit et purifié la protéine recombinante His-LIN28B et montré par des expériences *in vitro* que cette protéine lie le motif GAAG situé dans la boucle de pré-miR-98 (figure 55C). Il est intéressant de noter que ce motif chevauche la séquence AGAA reconnue par TRA2- β . Cependant, la délétion du site AGAAG de pré-miR-98 n'affecte que légèrement la liaison de LIN28B,

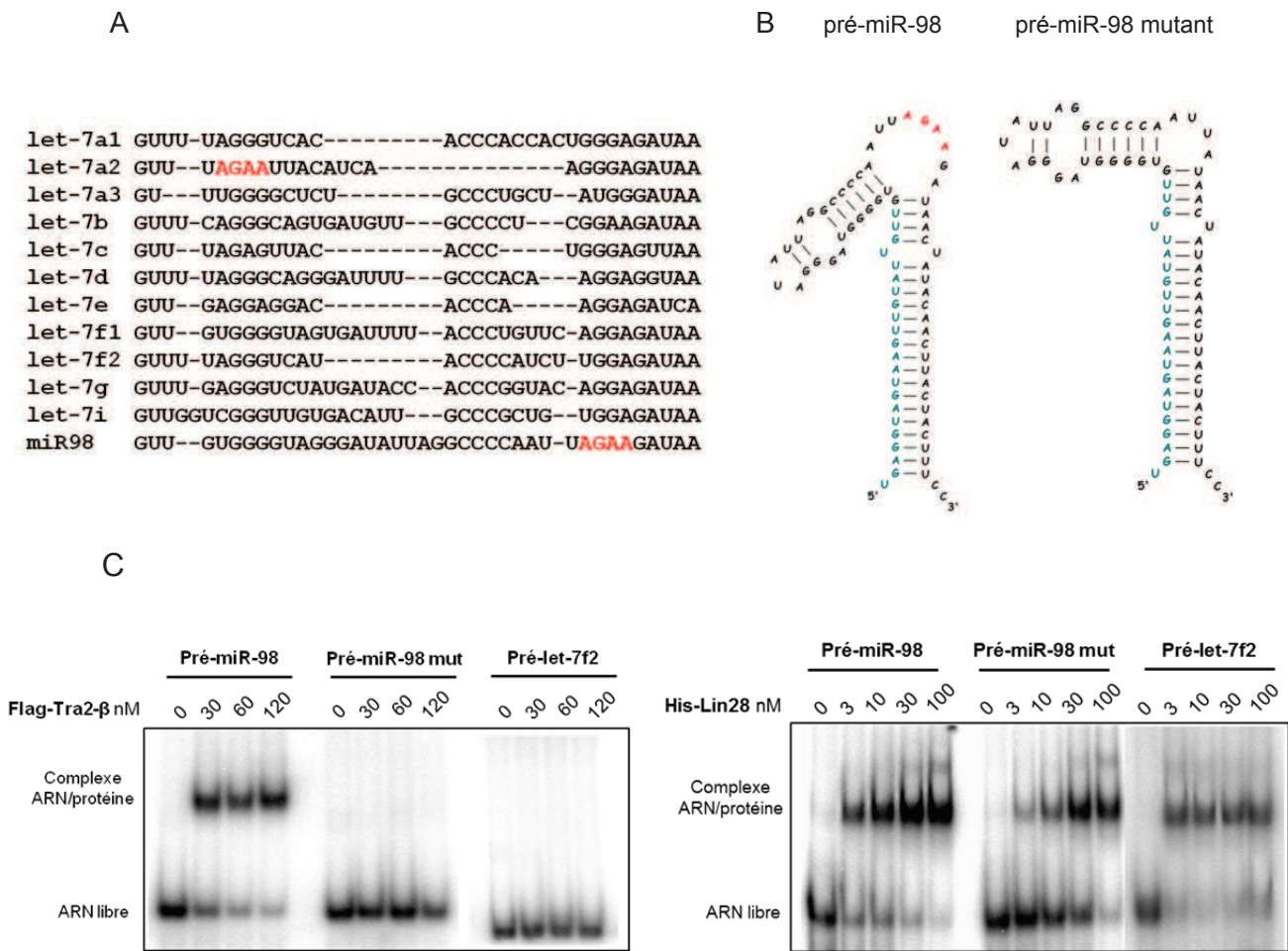


Figure 55 : Interaction spécifique entre les protéines Tra2-β ou Lin28 et le pré-miR-98.

A. Alignement des séquences flanquant la boucle terminale des pri-miARNs de la famille let-7. La séquence AGAA, étant le motif reconnu par Tra2-β, est indiquée en rouge.

B. Structures secondaires obtenue par M-fold du pré-miR-98 et de son mutant généré par mutagenèse dirigée dans lequel les nucléotides AGAAG sont délétés. Le site potentiel de liaison à Tra2-β est en rouge (AGAA).

C. Expériences de retard sur gel effectués avec la protéine recombinante Flag-Tra2-β (à gauche) ou la protéine recombinante His-Lin28 (à droite) et les pré-miR-98, pré-miR-98 mutant et pré-let-7f2 marqués uniformément au ^{32}P .

tandis qu'elle abolit celle de TRA2- β . Ces expériences suggèrent que LIN28 lierait le pré-miR-98 au niveau de deux sites : le site AGAAG, aussi reconnu par TRA2- β , et un second site inconnu au moment des expériences mais qui a été décrit depuis comme étant la boucle terminale des pré-let-7 (Nam *et al.*, 2011 ; Loughlin *et al.*, 2011 ; Mayr *et al.*, 2012 ; Desjardins *et al.*, 2012). Nous avons alors effectué des expériences *in vitro* de compétitions de liaison à l'ARN entre TRA2- β et LIN28, ces expériences montrent que l'augmentation graduelle de la quantité de HIS-LIN28B inhibe la liaison de FLAG-TRA2- β au pré-miR-98 (figure 57). Ce résultat confirme que l'un des deux sites de liaison de LIN28 chevauche celui de TRA2- β et indique que ces deux protéines sont en compétition pour lier le pré-miR-98.

En conclusions, mes résultats suggèrent que TRA2- β favoriserait la maturation de miR-98 en empêchant la fixation de LIN28, et en protégeant ainsi le pré-miR-98 de l'action inhibitrice des protéines LIN28-TUT4 sur le clivage de DICER.

En perspective, la quantification des cibles de miR-98, telles que MYC, RAS ou HMGA2, et l'étude de la prolifération cellulaire dans des cellules déplétées en TRA2- β , nous permettrait d'étudier les conséquences physiologiques de la diminution de la maturation de miR-98. Toutefois, il est à noter que TRA2- β ne régule pas la maturation des autres membres de la famille let-7, et donc que l'effet physiologique de la diminution de miR-98 risque d'être compensé par la présence des autres let-7.

A

pré-miR-19a AGUUUUGCAUAGUUGCACUACA AGAAGAA UGUAGUUGUGCAAUCUAUGCAAACUGA

pré-miR-204 UUCCCUUUGUCAUCCUAUGCCUG AGAA UUAUAUGAAGGAGGCUGGGAAGGCAAAGGGACGU

pré-miR-425 AAUGACACGAUCACUCCCGUUGAGUGGGCACCCG AGAA GCCAUCGGGAUGUCGUGUCCUGGG

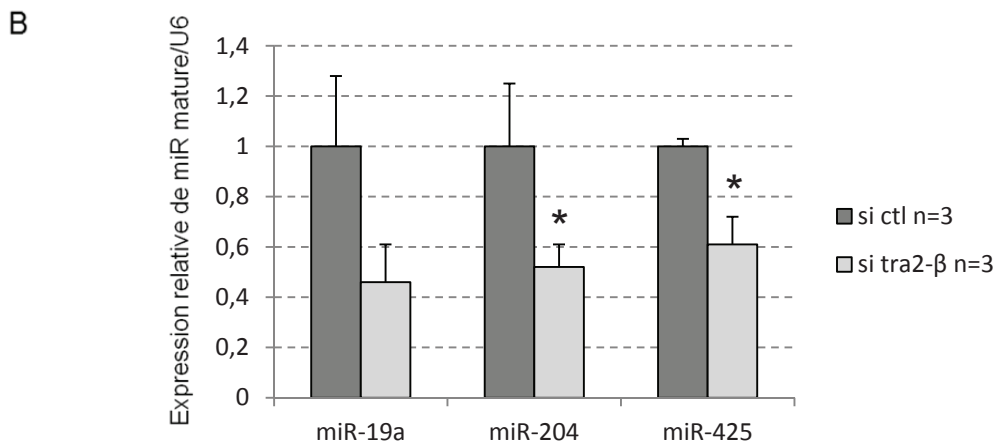


Figure 56 : Analyse de l'expression des miARNs dont la boucle terminale contient le motif AGAA.

A. Séquence ribonucléotidique des pré-miR-19a, pré-miR-204 et pré-miR-425. Les nucléotides de la boucle terminale sont soulignés. Le motif reconnu par Tra-2β est en rouge.

B. Quantification de la forme mature des miARNs miR-19a, miR-204 et miR-425.

L'expression des miARNs matures est normalisée par rapport à l'expression de snARN U6.

* : $p < 0,05$.

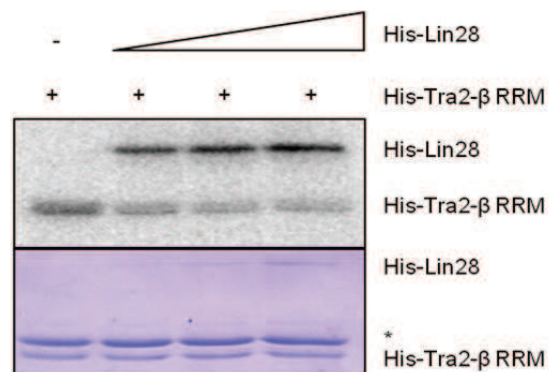


Figure 57 : Compétitions entre Tra2-β et Lin28 pour la fixation du pré-miR-98.

Tests de compétition effectués par pontage aux UV. La protéine recombinante His -Tra2-β RRM (16μM) et le pré-miR-98 marqué uniformément au ^{32}P sont incubés avec des concentrations croissantes de protéine recombinante His-Lin28 (0;1;2;4 μM).

La quantité des protéines déposées ainsi que le chargement des échantillons dans le gel ont été contrôlés par coloration au bleu de Coomassie. L'astérisque indique la RNase A présente dans les expériences de pontage aux UV.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

~ A ~

Abbruzzese C., Krahe R., Liguori M., Tessarolo D., Siciliano M. J., Ashizawa T., Giacanelli M. (1996). Myotonic dystrophy phenotype without expansion of (CTG)_n repeat: an entity distinct from proximal myotonic myopathy (PROMM)? *J Neurol* 243, 10, pp. 715-721.

Abe T., Sato M., Kuboki J., Kano T., Tamai M. (1999). Lens epithelial changes and mutated gene expression in patients with myotonic dystrophy. *Br J Ophthalmol* 83, 4, pp. 452-457.

Abriel H. (2010). Cardiac sodium channel Na(v)1.5 and interacting proteins: Physiology and pathophysiology. *J Mol Cell Cardiol* 48, 1, pp. 2-11.

Abriel H., Kamynina E., Horisberger J. D., Staub O. (2000). Regulation of the cardiac voltage-gated Na⁺ channel (H1) by the ubiquitin-protein ligase Nedd4. *FEBS Lett* 466, 2-3, pp. 377-380.

Adereth Y., Dammai V., Kose N., Li R., Hsu T. (2005). RNA-dependent integrin alpha3 protein localization regulated by the Muscleblind-like protein MLP1. *Nat Cell Biol* 7, 12, pp. 1240-1247.

Allen S. E., Darnell R. B., Lipscombe D. (2010). The neuronal splicing factor Nova controls alternative splicing in N-type and P-type CaV2 calcium channels. *Channels* 4, 6, pp. 483-489.

Alwazzan M., Newman E., Hamshere M. G., 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, 8, pp. 1491-1497.

Amack J. D., Paguio A. P., Mahadevan M. S. (1999). Cis and trans effects of the myotonic dystrophy (DM) mutation in a cell culture model. *Hum Mol Genet* 8, 11, pp. 1975-1984.

Aman T. K., Grieco-Calub T. M., Chen C., Rusconi R., Slat E. A., Isom L. L., Raman I. M. (2009). Regulation of persistent Na current by interactions between beta subunits of voltage-gated Na channels. *J Neurosci* 29, 7, pp. 2027-2042.

Amin A. S., Tan H. L., Wilde A. A. (2010). Cardiac ion channels in health and disease. *Heart Rhythm* 7, 1, pp. 117-126.

Anderson C., Catoe H., Werner R. (2006). MIR-206 regulates connexin43 expression during skeletal muscle development. *Nucleic Acids Res* 34, 20, pp. 5863-5871.

Anger T., Madge D. J., Mulla M., Riddall D. (2001). Medicinal chemistry of neuronal voltage-gated sodium channel blockers. *J Med Chem* 44, 2, pp. 115-137.

Arrasate M., Finkbeiner S. (2012). Protein aggregates in Huntington's disease. *Exp Neurol* 238, 1, pp. 1-11.

Artero R., Prokop A., Paricio N., Begemann G., Pueyo I., Mlodzik M., Perez-Alonso M., Baylies M. K. (1998). The muscleblind gene participates in the organization of Z-bands and epidermal attachments of *Drosophila* muscles and is regulated by Dmef2. *Dev Biol* 195, 2, pp. 131-143.

Aruga J., Mikoshiba K. (2003). Identification and characterization of Slitrk, a novel neuronal transmembrane protein family controlling neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci* 24, 1, pp. 117-129.

Aukerman M. J., Sakai H. (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes. *Plant Cell* 15, 11, pp. 2730-2741.

Auweter S. D., Fasan R., Reymond L., Underwood J. G., Black D. L., Pitsch S., Allain F. H. (2006). Molecular basis of RNA recognition by the human alternative splicing factor Fox-1. *EMBO J* 25, 1, pp. 163-173.

Azuma-Mukai A., Oguri H., Mituyama T., Qian Z. R., Asai K., Siomi H., Siomi M. C. (2008). Characterization of endogenous human Argonautes and their miRNA partners in RNA silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 23, pp. 7964-7969.

~B~

Babuty D., Fauchier L., Tena-Carbi D., Poret P., Leche J., Raynaud M., Fauchier J. P., Cosnay P. (1999). Significance of late ventricular potentials in myotonic dystrophy. *Am J Cardiol* 84, 9, pp. 1099-1101, A1010.

Bagni C., Greenough W. T. (2005). From mRNP trafficking to spine dysmorphogenesis: the roots of fragile X syndrome. *Nat Rev Neurosci* 6, 5, pp. 376-387.

Banks A. S., Li J., McKeag L., Hribal M. L., Kashiwada M., Accili D., Rothman P. B. (2005). Deletion of SOCS7 leads to enhanced insulin action and enlarged islets of Langerhans. *J Clin Invest* 115, 9, pp. 2462-2471.

Baraniak A. P., Chen J. R., Garcia-Blanco M. A. (2006). Fox-2 mediates epithelial cell-specific fibroblast growth factor receptor 2 exon choice. *Mol Cell Biol* 26, 4, pp. 1209-1222.

Baroudi G., Acharfi S., Larouche C., Chahine M. (2002). Expression and intracellular localization of an SCN5A double mutant R1232W/T1620M implicated in Brugada syndrome. *Circ Res* 90, 1, pp. E11-16.

Baroudi G., Pouliot V., Denjoy I., Guicheney P., Shrier A., Chahine M. (2001). Novel mechanism for Brugada syndrome: defective surface localization of an SCN5A mutant (R1432G). *Circ Res* 88, 12, pp. E78-83.

Barreau C., Watrin T., Beverley Osborne H., Paillard L. (2006). Protein expression is increased by a class III AU-rich element and tethered CUG-BP1. *Biochem Biophys Res Commun* 347, 3, pp. 723-730.

Barroso-delJesus A., Romero-Lopez C., Lucena-Aguilar G., Melen G. J., Sanchez L., Ligerio G., Berzal-Herranz A., Menendez P. (2008). Embryonic stem cell-specific miR302-367 cluster: human gene structure and functional characterization of its core promoter. *Mol Cell Biol* 28, 21, pp. 6609-6619.

Bartel D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 2, pp. 281-297.

Bartel D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 2, pp. 215-233.

Baskerville S., Bartel D. P. (2005). Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA* 11, 3, pp. 241-247.

Bear M. F., Huber K. M., Warren S. T. (2004). The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends Neurosci* 27, 7, pp. 370-377.

Begemann G., Paricio N., Artero R., Kiss I., Perez-Alonso M., Mlodzik M. (1997). *muscleblind*, a gene required for photoreceptor differentiation in *Drosophila*, encodes novel nuclear Cys3His-type zinc-finger-containing proteins. *Development* 124, 21, pp. 4321-4331.

Behm-Ansmant I., Rehwinkel J., Doerks T., Stark A., Bork P., Izaurralde E. (2006). mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev* 20, 14, pp. 1885-1898.

Beil B., Screaton G., Stamm S. (1997). Molecular cloning of *htra2-beta-1* and *htra2-beta-2*, two human homologs of *tra-2* generated by alternative splicing. *DNA Cell Biol* 16, 6, pp. 679-690.

Benders A. A., Groenen P. J., Oerlemans F. T., Veerkamp J. H., Wieringa B. (1997). Myotonic dystrophy protein kinase is involved in the modulation of the Ca²⁺ homeostasis in skeletal muscle cells. *J Clin Invest* 100,

6, pp. 1440-1447.

Bennasser Y., Chable-Bessia C., Triboulet R., Gibbings D., Gwizdek C., Dargemont C., Kremer E. J., Voinnet O., Benkirane M. (2011). Competition for XPO5 binding between Dicer mRNA, pre-miRNA and viral RNA regulates human Dicer levels. *Nat Struct Mol Biol* 18, 3, pp. 323-327.

Bentwich I., Avniel A., Karov Y., Aharonov R., Gilad S., Barad O., Barzilai A., Einat P., Einav U., Meiri E., Sharon E., Spector Y., Bentwich Z. (2005). Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet* 37, 7, pp. 766-770.

Berezikov E., Chung W. J., Willis J., Cuppen E., Lai E. C. (2007). Mammalian mirtron genes. *Mol Cell* 28, 2, pp. 328-336.

Berget S. M. (1995). Exon recognition in vertebrate splicing. *J Biol Chem* 270, 6, pp. 2411-2414.

Berget S. M., Moore C., Sharp P. A. (1977). Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 8, pp. 3171-3175.

Bernstein E., Caudy A. A., Hammond S. M., Hannon G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 6818, pp. 363-366.

Bernstein E., Kim S. Y., Carmell M. A., Murchison E. P., Alcorn H., Li M. Z., Mills A. A., Elledge S. J., Anderson K. V., Hannon G. J. (2003). Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* 35, 3, pp. 215-217.

Berul C. I., Maguire C. T., Aronovitz M. J., Greenwood J., Miller C., Gehrman J., Housman D., Mendelsohn M. E., Reddy S. (1999). DMPK dosage alterations result in atrioventricular conduction abnormalities in a mouse myotonic dystrophy model. *J Clin Invest* 103, 4, pp. R1-7.

Berul C. I., Maguire C. T., Gehrman J., Reddy S. (2000). Progressive atrioventricular conduction block in a mouse myotonic dystrophy model. *J Interv Card Electrophysiol* 4, 2, pp. 351-358.

Bezzina C. R., Rook M. B., Groenewegen W. A., Herfst L. J., van der Wal A. C., Lam J., Jongsma H. J., Wilde A. A., Mannens M. M. (2003). Compound heterozygosity for mutations (W156X and R225W) in SCN5A associated with severe cardiac conduction disturbances and degenerative changes in the conduction system. *Circ Res* 92, 2, pp. 159-168.

Bhakta D., Lowe M. R., Groh W. J. (2004). Prevalence of structural cardiac abnormalities in patients with myotonic dystrophy type I. *Am Heart J* 147, 2, pp. 224-227.

Bhattacharyya S., Kumar P., Tsuchiya M., Bhattacharyya A., Biswas R. (2013). Regulation of miR-155 biogenesis in cystic fibrosis lung epithelial cells: antagonistic role of two mRNA-destabilizing proteins, KSRP and TTP. *Biochem Biophys Res Commun* 433, 4, pp. 484-488.

Bhattacharyya S. N., Habermacher R., Martine U., Closs E. I., Filipowicz W. (2006). Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* 125, 6, pp. 1111-1124.

Bianchi G., Ferrari P., Staessen J. A. (2005). Adducin polymorphism: detection and impact on hypertension and related disorders. *Hypertension* 45, 3, pp. 331-340.

Black D. L. (2003). Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 72, pp. 291-336.

Blechs Schmidt S., Haufe V., Benndorf K., Zimmer T. (2008). Voltage-gated Na⁺ channel transcript patterns in the mammalian heart are species-dependent. *Prog Biophys Mol Biol* 98, 2-3, pp. 309-318.

Blencowe B. J., Bowman J. A., McCracken S., Rosonina E. (1999). SR-related proteins and the processing of messenger RNA precursors. *Biochem Cell Biol* 77, 4, pp. 277-291.

Bodi I., Mikala G., Koch S. E., Akhter S. A., Schwartz A. (2005). The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. *J Clin Invest* 115, 12, pp. 3306-3317.

- Bohm J., Vasli N., Maurer M., Cowling B., Shelton G. D., Kress W., Toussaint A., Prokic I., Schara U., Anderson T. J., Weis J., Tiret L., Laporte J. (2013). Altered Splicing of the BIN1 Muscle-Specific Exon in Humans and Dogs with Highly Progressive Centronuclear Myopathy. *PLoS Genet* 9, 6, pp. e1003430.
- Bohnsack M. T., Czaplinski K., Gorlich D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 10, 2, pp. 185-191.
- Borchert G. M., Lanier W., Davidson B. L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 13, 12, pp. 1097-1101.
- Bortolin-Cavaille M. L., Dance M., Weber M., Cavaille J. (2009). C19MC microRNAs are processed from introns of large Pol-II, non-protein-coding transcripts. *Nucleic Acids Res* 37, 10, pp. 3464-3473.
- Botta A., Vallo L., Rinaldi F., Bonifazi E., Amati F., Biancolella M., Gambardella S., Mancinelli E., Angelini C., Meola G., Novelli G. (2007). Gene expression analysis in myotonic dystrophy: indications for a common molecular pathogenic pathway in DM1 and DM2. *Gene Expr* 13, 6, pp. 339-351.
- Boucher L., Ouzounis C. A., Enright A. J., Blencowe B. J. (2001). A genome-wide survey of RS domain proteins. *RNA* 7, 12, pp. 1693-1701.
- Boukis L. A., Liu N., Furuyama S., Bruzik J. P. (2004). Ser/Arg-rich protein-mediated communication between U1 and U2 small nuclear ribonucleoprotein particles. *J Biol Chem* 279, 28, pp. 29647-29653.
- Bourgeois C. F., Lejeune F., Stevenin J. (2004). Broad specificity of SR (serine/arginine) proteins in the regulation of alternative splicing of pre-messenger RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 78, pp. 37-88.
- Bourgeois C. F., Popielarz M., Hildwein G., Stevenin J. (1999). Identification of a bidirectional splicing enhancer: differential involvement of SR proteins in 5' or 3' splice site activation. *Mol Cell Biol* 19, 11, pp. 7347-7356.
- Branlant C., Krol A., Ebel J. P., Lazar E., Haendler B., Jacob M. (1982). U2 RNA shares a structural domain with U1, U4, and U5 RNAs. *EMBO J* 1, 10, pp. 1259-1265.
- Braun J. E., Huntzinger E., Fauser M., Izaurralde E. (2011). GW182 proteins directly recruit cytoplasmic deadenylase complexes to miRNA targets. *Mol Cell* 44, 1, pp. 120-133.
- Breathnach R., Mandel J. L., Chambon P. (1977). Ovalbumin gene is split in chicken DNA. *Nature* 270, 5635, pp. 314-319.
- Brook J. D., McCurrach M. E., Harley H. G., Buckler A. J., Church D., Aburatani H., Hunter K., Stanton V. P., Thirion J. P., Hudson T., et al. (1992). Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 68, 4, pp. 799-808.
- Brooke M. H., Engel W. K. (1969). The histographic analysis of human muscle biopsies with regard to fiber types. 3. Myotonias, myasthenia gravis, and hypokalemic periodic paralysis. *Neurology* 19, 5, pp. 469-477.
- Brudno Y., Liu D. R. (2009). Recent progress toward the templated synthesis and directed evolution of sequence-defined synthetic polymers. *Chem Biol* 16, 3, pp. 265-276.
- Brundel B. J., Van Gelder I. C., Henning R. H., Tieleman R. G., Tuinenburg A. E., Wietes M., Grandjean J. G., Van Gilst W. H., Crijns H. J. (2001). Ion channel remodeling is related to intraoperative atrial effective refractory periods in patients with paroxysmal and persistent atrial fibrillation. *Circulation* 103, 5, pp. 684-690.
- Buckanovich R. J., Darnell R. B. (1997). The neuronal RNA binding protein Nova-1 recognizes specific RNA targets in vitro and in vivo. *Mol Cell Biol* 17, 6, pp. 3194-3201.
- Buckanovich R. J., Posner J. B., Darnell R. B. (1993). Nova, the paraneoplastic Ri antigen, is homologous to an RNA-binding protein and is specifically expressed in the developing motor system. *Neuron* 11, 4, pp. 657-672.
- Buckanovich R. J., Yang Y. Y., Darnell R. B. (1996). The onconeural antigen Nova-1 is a neuron-specific

RNA-binding protein, the activity of which is inhibited by paraneoplastic antibodies. *J Neurosci* 16, 3, pp. 1114-1122.

Buckingham M. (2007). Skeletal muscle progenitor cells and the role of Pax genes. *C R Biol* 330, 6-7, pp. 530-533.

Burns D. M., D'Ambrogio A., Nottrott S., Richter J. D. (2011). CPEB and two poly(A) polymerases control miR-122 stability and p53 mRNA translation. *Nature* 473, 7345, pp. 105-108.

~ C ~

Callis T. E., Pandya K., Seok H. Y., Tang R. H., Tatsuguchi M., Huang Z. P., Chen J. F., Deng Z., Gunn B., Shumate J., Willis M. S., Selzman C. H., Wang D. Z. (2009). MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J Clin Invest* 119, 9, pp. 2772-2786.

Camacho J. A., Hensellek S., Rougier J. S., Blechschmidt S., Abriel H., Benndorf K., Zimmer T. (2006). Modulation of Nav1.5 channel function by an alternatively spliced sequence in the DII/DIII linker region. *J Biol Chem* 281, 14, pp. 9498-9506.

Campuzano V., Montermini L., Molto M. D., Pianese L., Cossee M., Cavalcanti F., Monros E., Rodius F., Duclos F., Monticelli A., Zara F., Canizares J., Koutnikova H., Bidichandani S. I., Gellera C., Brice A., Trouillas P., De Michele G., Filla A., De Frutos R., Palau F., Patel P. I., Di Donato S., Mandel J. L., Coccozza S., Koenig M., Pandolfo M. (1996). Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 271, 5254, pp. 1423-1427.

Capuano M. M., Sorkin J. D., Chang Y. P., Ling H., JR O. C., Rothman P. B., Mitchell B. D., Silver K. D. (2013). Polymorphisms in the SOCS7 gene and glucose homeostasis traits. *BMC Res Notes* 6, 1, pp. 235.

Carango P., Noble J. E., Marks H. G., Funanage V. L. (1993). Absence of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) mRNA as a result of a triplet repeat expansion in myotonic dystrophy. *Genomics* 18, 2, pp. 340-348.

Cardani R., Mancinelli E., Rotondo G., Sansone V., Meola G. (2006). Muscleblind-like protein 1 nuclear sequestration is a molecular pathology marker of DM1 and DM2. *Eur J Histochem* 50, 3, pp. 177-182.

Care A., Catalucci D., Felicetti F., Bonci D., Addario A., Gallo P., Bang M. L., Segnalini P., Gu Y., Dalton N. D., Elia L., Latronico M. V., Hoydal M., Autore C., Russo M. A., Dorn G. W., 2nd, Ellingsen O., Ruiz-Lozano P., Peterson K. L., Croce C. M., Peschle C., Condorelli G. (2007). MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med* 13, 5, pp. 613-618.

Catterall W. A. (1986). Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. *Annu Rev Biochem* 55, pp. 953-985.

Catterall W. A. (2000). From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26, 1, pp. 13-25.

Catterall W. A. (2010). Signaling complexes of voltage-gated sodium and calcium channels. *Neurosci Lett* 486, 2, pp. 107-116.

Ceci M., Gaviraghi C., Gorrini C., Sala L. A., Offenhauser N., Marchisio P. C., Biffo S. (2003). Release of eIF6 (p27BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly. *Nature* 426, 6966, pp. 579-584.

Chagot B., Chazin W. J. (2011). Solution NMR structure of Apo-calmodulin in complex with the IQ motif of human cardiac sodium channel NaV1.5. *J Mol Biol* 406, 1, pp. 106-119.

Chang T. C., Zeitels L. R., Hwang H. W., Chivukula R. R., Wentzel E. A., Dews M., Jung J., Gao P., Dang C. V., Beer M. A., Thomas-Tikhonenko A., Mendell J. T. (2009). Lin-28B transactivation is necessary for Myc-mediated let-7 repression and proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 9, pp. 3384-3389.

Charizanis K., Lee K. Y., Batra R., Goodwin M., Zhang C., Yuan Y., Shiue L., Cline M., Scotti M. M., Xia G., Kumar A., Ashizawa T., Clark H. B., Kimura T., Takahashi M. P., Fujimura H., Jinnai K., Yoshikawa H., Gomes-Pereira M., Gourdon G., Sakai N., Nishino S., Foster T. C., Ares M., Jr., Darnell R. B., Swanson M. S. (2012). Muscleblind-like 2-mediated alternative splicing in the developing brain and dysregulation in myotonic dystrophy. *Neuron* 75, 3, pp. 437-450.

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

Chatterjee S., Grosshans H. (2009). Active turnover modulates mature microRNA activity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 461, 7263, pp. 546-549.

Chekulaeva M., Filipowicz W., Parker R. (2009). Multiple independent domains of dGW182 function in miRNA-mediated repression in *Drosophila*. *RNA* 15, 5, pp. 794-803.

Chen C. Y., Chi Y. H., Mutalif R. A., Starost M. F., Myers T. G., Anderson S. A., Stewart C. L., Jeang K. T. (2012). Accumulation of the inner nuclear envelope protein Sun1 is pathogenic in progeric and dystrophic laminopathies. *Cell* 149, 3, pp. 565-577.

Chen C. Y., Zheng D., Xia Z., Shyu A. B. (2009). Ago-TNRC6 triggers microRNA-mediated decay by promoting two deadenylation steps. *Nat Struct Mol Biol* 16, 11, pp. 1160-1166.

Chen H. Y., Kathirvel P., Yee W. C., Lai P. S. (2009). Correction of dystrophin myotonia type 1 pre-mRNA transcripts by artificial trans-splicing. *Gene Ther* 16, 2, pp. 211-217.

Chen J. F., Mandel E. M., Thomson J. M., Wu Q., Callis T. E., Hammond S. M., Conlon F. L., Wang D. Z. (2006). The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* 38, 2, pp. 228-233.

Chen M., Manley J. L. (2009). Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 11, pp. 741-754.

Chendrimada T. P., Finn K. J., Ji X., Baillat D., Gregory R. I., Liebhaber S. A., Pasquinelli A. E., Shiekhattar R. (2007). MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature* 447, 7146, pp. 823-828.

Chendrimada T. P., Gregory R. I., Kumaraswamy E., Norman J., Cooch N., Nishikura K., Shiekhattar R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436, 7051, pp. 740-744.

Cherng N., Shishkin A. A., Schlager L. I., Tuck R. H., Sloan L., Matera R., Sarkar P. S., Ashizawa T., Freudenreich C. H., Mirkin S. M. (2011). Expansions, contractions, and fragility of the spinocerebellar ataxia type 10 pentanucleotide repeat in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 7, pp. 2843-2848.

Childs-Disney J. L., Hoskins J., Rzuczek S. G., Thornton C. A., Disney M. D. (2012). Rationally designed small molecules targeting the RNA that causes myotonic dystrophy type 1 are potently bioactive. *ACS Chem Biol* 7, 5, pp. 856-862.

Childs-Disney J. L., Parkesh R., Nakamori M., Thornton C. A., Disney M. D. (2012). Rational design of bioactive, modularly assembled aminoglycosides targeting the RNA that causes myotonic dystrophy type 1. *ACS Chem Biol* 7, 12, pp. 1984-1993.

Childs-Disney J. L., Stepniak-Konieczna E., Tran T., Yildirim I., Park H., Chen C. Z., Hoskins J., Southall N., Marugan J. J., Patnaik S., Zheng W., Austin C. P., Schatz G. C., Sobczak K., Thornton C. A., Disney M. D. (2013). Induction and reversal of myotonic dystrophy type 1 pre-mRNA splicing defects by small molecules. *Nat Commun* 4, pp. 2044.

Cho D. H., Thienes C. P., Mahoney S. E., Analau E., Filippova G. N., Tapscott S. J. (2005). Antisense transcription and heterochromatin at the DM1 CTG repeats are constrained by CTCF. *Mol Cell* 20, 3, pp. 483-489.

- Cho S., Hoang A., Sinha R., Zhong X. Y., Fu X. D., Krainer A. R., Ghosh G. (2011). Interaction between the RNA binding domains of Ser-Arg splicing factor 1 and U1-70K snRNP protein determines early spliceosome assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 20, pp. 8233-8238.
- Chou M. Y., Rooke N., Turck C. W., Black D. L. (1999). hnRNP H is a component of a splicing enhancer complex that activates a c-src alternative exon in neuronal cells. *Mol Cell Biol* 19, 1, pp. 69-77.
- Chow L. T., Roberts J. M., Lewis J. B., Broker T. R. (1977). A map of cytoplasmic RNA transcripts from lytic adenovirus type 2, determined by electron microscopy of RNA:DNA hybrids. *Cell* 11, 4, pp. 819-836.
- Clarke N. R., Kelion A. D., Nixon J., Hilton-Jones D., Forfar J. C. (2001). Does cytosine-thymine-guanine (CTG) expansion size predict cardiac events and electrocardiographic progression in myotonic dystrophy? *Heart* 86, 4, pp. 411-416.
- Cleary J. D., Tome S., Lopez Castel A., Panigrahi G. B., Foiry L., Hagerman K. A., Sroka H., Chitayat D., Gourdon G., Pearson C. E. (2010). Tissue- and age-specific DNA replication patterns at the CTG/CAG-expanded human myotonic dystrophy type 1 locus. *Nat Struct Mol Biol* 17, 9, pp. 1079-1087.
- Cleary A., Blatter M., Allain F. H. (2008). RNA recognition motifs: boring? Not quite. *Curr Opin Struct Biol* 18, 3, pp. 290-298.
- Cleary A., Jayne S., Benderska N., Dominguez C., Stamm S., Allain F. H. (2011). Molecular basis of purine-rich RNA recognition by the human SR-like protein Tra2-beta1. *Nat Struct Mol Biol* 18, 4, pp. 443-450.
- Cleary A., Sinha R., Anczukow O., Corriero A., Moursy A., Daubner G. M., Valcarcel J., Krainer A. R., Allain F. H. (2013). Isolated pseudo-RNA-recognition motifs of SR proteins can regulate splicing using a noncanonical mode of RNA recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 30, pp. E2802-2811.
- Colatsky J. J., Tsien R. W. (1979). Sodium channels in rabbit cardiac Purkinje fibres. *Nature* 278, 5701, pp. 265-268.
- Coller J., Parker R. (2004). Eukaryotic mRNA decapping. *Annu Rev Biochem* 73, pp. 861-890.
- Comery T. A., Harris J. B., Willems P. J., Oostra B. A., Irwin S. A., Weiler I. J., Greenough W. T. (1997). Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10, pp. 5401-5404.
- Coolidge C. J., Seely R. J., Patton J. G. (1997). Functional analysis of the polypyrimidine tract in pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Res* 25, 4, pp. 888-896.
- Copley M. R., Babovic S., Benz C., Knapp D. J., Beer P. A., Kent D. G., Wohrer S., Treloar D. Q., Day C., Rowe K., Mader H., Kuchenbauer F., Humphries R. K., Eaves C. J. (2013). The Lin28b-let-7-Hmga2 axis determines the higher self-renewal potential of fetal haematopoietic stem cells. *Nat Cell Biol*, pp.
- Costantini D. L., Arruda E. P., Agarwal P., Kim K. H., Zhu Y., Zhu W., Lebel M., Cheng C. W., Park C. Y., Pierce S. A., Guerchicoff A., Pollevick G. D., Chan T. Y., Kabir M. G., Cheng S. H., Husain M., Antzelevitch C., Srivastava D., Gross G. J., Hui C. C., Backx P. H., Bruneau B. G. (2005). The homeodomain transcription factor *Irx5* establishes the mouse cardiac ventricular repolarization gradient. *Cell* 123, 2, pp. 347-358.
- Crabtree G. R., Olson E. N. (2002). NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* 109 Suppl, pp. S67-79.
- Cramer P., Pesce C. G., Baralle F. E., Kornblihtt A. R. (1997). Functional association between promoter structure and transcript alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 21, pp. 11456-11460.
- Crawford D. C., Acuna J. M., Sherman S. L. (2001). FMR1 and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review. *Genet Med* 3, 5, pp. 359-371.
- Crotti L., Johnson C. N., Graf E., De Ferrari G. M., Cuneo B. F., Ovadia M., Papagiannis J., Feldkamp M. D., Rathi S. G., Kunic J. D., Pedrazzini M., Wieland T., Lichtner P., Beckmann B. M., Clark T., Shaffer C., Benson

D. W., Kaab S., Meitinger T., Strom T. M., Chazin W. J., Schwartz P. J., George A. L., Jr. (2013). Calmodulin mutations associated with recurrent cardiac arrest in infants. *Circulation* 127, 9, pp. 1009-1017.

Cruz L. J., Gray W. R., Olivera B. M., Zeikus R. D., Kerr L., Yoshikami D., Moczydlowski E. (1985). Conus geographus toxins that discriminate between neuronal and muscle sodium channels. *J Biol Chem* 260, 16, pp. 9280-9288.

Cui X., Ji D., Fisher D. A., Wu Y., Briner D. M., Weinstein E. J. (2011). Targeted integration in rat and mouse embryos with zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 29, 1, pp. 64-67.

Curschmann H. (1936). Myotonische Dystrophie (atrophische Myotonie). In Bumke and Foerster, *Handbuch der Neurologie*, pp465-485, Berlin.

~D~

D'Adamo P., Wolfer D. P., Kopp C., Tobler I., Toniolo D., Lipp H. P. (2004). Mice deficient for the synaptic vesicle protein Rab3a show impaired spatial reversal learning and increased explorative activity but none of the behavioral changes shown by mice deficient for the Rab3a regulator Gdi1. *Eur J Neurosci* 19, 7, pp. 1895-1905.

D'Ambrogio A., Gu W., Udagawa T., Mello C. C., Richter J. D. (2012). Specific miRNA stabilization by Gld2-catalyzed monoadenylation. *Cell Rep* 2, 6, pp. 1537-1545.

Damianov A., Black D. L. (2010). Autoregulation of Fox protein expression to produce dominant negative splicing factors. *RNA* 16, 2, pp. 405-416.

Dansithong W., Jog S. P., Paul S., Mohammadzadeh R., Tring S., Kwok Y., Fry R. C., Marjoram P., Comai L., Reddy S. (2011). RNA steady-state defects in myotonic dystrophy are linked to nuclear exclusion of SHARP. *EMBO Rep* 12, 7, pp. 735-742.

Dansithong W., Paul S., Comai L., Reddy S. (2005). MBNL1 is the primary determinant of focus formation and aberrant insulin receptor splicing in DM1. *J Biol Chem* 280, 7, pp. 5773-5780.

Dansithong W., Wolf C. M., Sarkar P., Paul S., Chiang A., Holt I., Morris G. E., Branco D., Sherwood M. C., Comai L., Berul C. I., Reddy S. (2008). Cytoplasmic CUG RNA foci are insufficient to elicit key DM1 features. *PLoS One* 3, 12, pp. e3968.

Dark A. J., Streeten B. W. (1977). Ultrastructural study of cataract in myotonia dystrophica. *Am J Ophthalmol* 84, 5, pp. 666-674.

Darnell R. B. (1996). Onconeural antigens and the paraneoplastic neurologic disorders: at the intersection of cancer, immunity, and the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10, pp. 4529-4536.

Darnell J. C., Jensen K. B., Jin P., Brown V., Warren S. T., Darnell R. B. (2001). Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. *Cell* 107, 4, pp. 489-499.

Darnell J. C., Fraser C. E., Mostovetsky O., Stefani G., Jones T. A., Eddy S. R., Darnell R. B. (2005). Kissing complex RNAs mediate interaction between the Fragile-X mental retardation protein KH2 domain and brain polyribosomes. *Genes Dev* 19, 8, pp. 903-918.

Dasgupta T., Stillwagon S. J., Ladd A. N. (2013). Gene expression analyses implicate an alternative splicing program in regulating contractile gene expression and serum response factor activity in mice. *PLoS One* 8, 2, pp. 20.

Dauwalder B., Amaya-Manzanares F., Mattox W. (1996). A human homologue of the *Drosophila* sex determination factor transformer-2 has conserved splicing regulatory functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 17, pp. 9004-9009.

- David C. J., Boyne A. R., Millhouse S. R., Manley J. L. (2011). The RNA polymerase II C-terminal domain promotes splicing activation through recruitment of a U2AF65-Prp19 complex. *Genes Dev* 25, 9, pp. 972-983.
- Davies S. W., Scherzinger E. (1997). Nuclear inclusions in Huntington's disease. *Trends Cell Biol* 7, 11, pp. 422.
- Davis B. M., McCurrach M. E., Taneja K. L., Singer R. H., 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, 14, pp. 7388-7393.
- Davis B. N., Hilyard A. C., Nguyen P. H., Lagna G., Hata A. (2010). Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA maturation by Droscha. *Mol Cell* 39, 3, pp. 373-384.
- Day J. W., Ranum L. P. (2005). Genetics and molecular pathogenesis of the myotonic dystrophies. *Curr Neurol Neurosci Rep* 5, 1, pp. 55-59.
- Day J. W., Ranum L. P. (2005). RNA pathogenesis of the myotonic dystrophies. *Neuromuscul Disord* 15, 1, pp. 5-16.
- Day J. W., Ricker K., Jacobsen J. F., Rasmussen L. J., Dick K. A., Kress W., Schneider C., Koch M. C., Beilman G. J., Harrison A. R., Dalton J. C., Ranum L. P. (2003). Myotonic dystrophy type 2: molecular, diagnostic and clinical spectrum. *Neurology* 60, 4, pp. 657-664.
- De Boule K., Verkerk A. J., Reyniers E., Vits L., Hendrickx J., Van Roy B., Van den Bos F., de Graaff E., Oostra B. A., Willems P. J. (1993). A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nat Genet* 3, 1, pp. 31-35.
- de la Mata M., Lafaille C., Kornblihtt A. R. (2010). First come, first served revisited: factors affecting the same alternative splicing event have different effects on the relative rates of intron removal. *RNA* 16, 5, pp. 904-912.
- Denis J. A., Gauthier M., Rachdi L., Aubert S., Giraud-Triboulet K., Poydenot P., Benchoua A., Champon B., Maury Y., Baldeschi C., Scharfmann R., Pietu G., Peschanski M., Martinat C. (2013). mTOR-dependent proliferation defect in human ES-derived neural stem cells affected by myotonic dystrophy type 1. *J Cell Sci* 126, Pt 8, pp. 1763-1772.
- Desjardins A., Yang A., Bouvette J., Omichinski J. G., Legault P. (2012). Importance of the NCp7-like domain in the recognition of pre-let-7g by the pluripotency factor Lin28. *Nucleic Acids Res* 40, 4, pp. 1767-1777.
- Dhaenens C. M., Schraen-Maschke S., Tran H., Vingtdoux V., Ghanem D., Leroy O., Delplanque J., Vanbrussel E., Delacourte A., Vermersch P., Maurage C. A., Gruffat H., Sergeant A., Mahadevan M. S., Ishiura S., Buee L., Cooper T. A., Caillet-Boudin M. L., Charlet-Berguerand N., Sablonniere B., Sergeant N. (2008). Overexpression of MBNL1 fetal isoforms and modified splicing of Tau in the DM1 brain: two individual consequences of CUG trinucleotide repeats. *Exp Neurol* 210, 2, pp. 467-478.
- Dhaenens C. M., Tran H., Frandemichie M. L., Carpentier C., Schraen-Maschke S., Sistiaga A., Goicoechea M., Eddarkaoui S., Van Brussels E., Obriot H., Labudeck A., Gevaert M. H., Fernandez-Gomez F., Charlet-Berguerand N., Deramecourt V., Maurage C. A., Buee L., de Munain A. L., Sablonniere B., Caillet-Boudin M. L., Sergeant N. (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, 7, pp. 732-742.
- Diederichs S., Haber D. A. (2007). Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell* 131, 6, pp. 1097-1108.
- DiFiglia M., Sapp E., Chase K. O., Davies S. W., Bates G. P., Vonsattel J. P., Aronin N. (1997). Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 277, 5334, pp. 1990-1993.
- Ding X. C., Weiler J., Grosshans H. (2009). Regulating the regulators: mechanisms controlling the maturation of microRNAs. *Trends Biotechnol* 27, 1, pp. 27-36.

Dominguez J. N., Navarro F., Franco D., Thompson R. P., Aranega A. E. (2005). Temporal and spatial expression pattern of beta1 sodium channel subunit during heart development. *Cardiovasc Res* 65, 4, pp. 842-850.

Dredge B. K., Darnell R. B. (2003). Nova regulates GABA(A) receptor gamma2 alternative splicing via a distal downstream UCAU-rich intronic splicing enhancer. *Mol Cell Biol* 23, 13, pp. 4687-4700.

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., Ares M., Jr. (2010). Aberrant alternative splicing and extracellular matrix gene expression in mouse models of myotonic dystrophy. *Nat Struct Mol Biol* 17, 2, pp. 187-193.

Duff H. J., Offord J., West J., Catterall W. A. (1992). Class I and IV antiarrhythmic drugs and cytosolic calcium regulate mRNA encoding the sodium channel alpha subunit in rat cardiac muscle. *Mol Pharmacol* 42, 4, pp. 570-574.

~ E ~

Easow G., Teleanu A. A., Cohen S. M. (2007). Isolation of microRNA targets by miRNP immunopurification. *RNA* 13, 8, pp. 1198-1204.

Eberhart D. E., Malter H. E., Feng Y., Warren S. T. (1996). The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals. *Hum Mol Genet* 5, 8, pp. 1083-1091.

Ebralidze A., Wang Y., Petkova V., Ebralidze K., Junghans R. P. (2004). RNA leaching of transcription factors disrupts transcription in myotonic dystrophy. *Science* 303, 5656, pp. 383-387.

Edwards J., Malaurie E., Kondrashov A., Long J., de Moor C. H., Searle M. S., Emsley J. (2011). Sequence determinants for the tandem recognition of UGU and CUG rich RNA elements by the two N-terminal RRMs of CELF1. *Nucleic Acids Res* 39, 19, pp. 8638-8650.

Eijkelkamp N., Linley J. E., Baker M. D., Minett M. S., Cregg R., Werdehausen R., Rugiero F., Wood J. N. (2012). Neurological perspectives on voltage-gated sodium channels. *Brain* 135, Pt 9, pp. 2585-2612.

Ekdahl Y., Farahani H. S., Behm M., Lagergren J., Ohman M. (2012). A-to-I editing of microRNAs in the mammalian brain increases during development. *Genome Res* 22, 8, pp. 1477-1487.

Elinder F., Nilsson J., Arhem P. (2007). On the opening of voltage-gated ion channels. *Physiol Behav* 92, 1-2, pp. 1-7.

El-Khairi R., Parnaik R., Duncan A. J., Lin L., Gerrelli D., Dattani M. T., Conway G. S., Achermann J. C. (2012). Analysis of LIN28A in early human ovary development and as a candidate gene for primary ovarian insufficiency. *Mol Cell Endocrinol* 351, 2, pp. 264-268.

Elvan A., Huang X. D., Pressler M. L., Zipes D. P. (1997). Radiofrequency catheter ablation of the atria eliminates pacing-induced sustained atrial fibrillation and reduces connexin 43 in dogs. *Circulation* 96, 5, pp. 1675-1685.

Eom T., Zhang C., Wang H., Lay K., Fak J., Noebels J. L., Darnell R. B. (2013). NOVA-dependent regulation of cryptic NMD exons controls synaptic protein levels after seizure. *Elife* 2, pp. e00178.

Eulalio A., Helms S., Fritsch C., Fauser M., Izaurralde E. (2009). A C-terminal silencing domain in GW182 is essential for miRNA function. *RNA* 15, 6, pp. 1067-1077.

Eulalio A., Huntzinger E., Izaurralde E. (2008). Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* 132, 1, pp. 9-14.

Eulalio A., Huntzinger E., Izaurralde E. (2008). GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-

mediated translational repression and mRNA decay. *Nat Struct Mol Biol* 15, 4, pp. 346-353.

Ewart J. L., Cohen M. F., Meyer R. A., Huang G. Y., Wessels A., Gourdie R. G., Chin A. J., Park S. M., Lazatin B. O., Villabon S., Lo C. W. (1997). Heart and neural tube defects in transgenic mice overexpressing the Cx43 gap junction gene. *Development* 124, 7, pp. 1281-1292.

~ F ~

Fabian M. R., Mathonnet G., Sundermeier T., Mathys H., Zipprich J. T., Svitkin Y. V., Rivas F., Jinek M., Wohlschlegel J., Doudna J. A., Chen C. Y., Shyu A. B., Yates J. R., 3rd, Hannon G. J., Filipowicz W., Duchaine T. F., Sonenberg N. (2009). Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation. *Mol Cell* 35, 6, pp. 868-880.

Fardaei M., Larkin K., Brook J. D., Hamshere M. G. (2001). In vivo co-localisation of MBNL protein with DMPK expanded-repeat transcripts. *Nucleic Acids Res* 29, 13, pp. 2766-2771.

Fardaei M., Rogers M. T., Thorpe H. M., Larkin K., Hamshere M. G., Harper P. S., 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, 7, pp. 805-814.

Farkas-Bargeton E., Barbet J. P., Dancea S., Wehrle R., Checouri A., Dulac O. (1988). Immaturity of muscle fibers in the congenital form of myotonic dystrophy: its consequences and its origin. *J Neurol Sci* 83, 2-3, pp. 145-159.

Faustino N. A., 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, 3, pp. 879-887.

Feng H. Z., Jin J. P. (2010). Coexistence of cardiac troponin T variants reduces heart efficiency. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299, 1, pp. H97-H105.

Fernandez-Costa J. M., Artero R. (2010). A conserved motif controls nuclear localization of Drosophila Muscleblind. *Mol Cells* 30, 1, pp. 65-70.

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., Perez-Alonso M., Vilchez J. J., Lopez de Munain A., Artero R. D. (2013). Expanded CTG repeats trigger miRNA alterations in Drosophila that are conserved in myotonic dystrophy type 1 patients. *Hum Mol Genet* 22, 4, pp. 704-716.

Filipowicz W., Bhattacharyya S. N., Sonenberg N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 9, 2, pp. 102-114.

Filippova G. N., Thienes C. P., Penn B. H., Cho D. H., Hu Y. J., Moore J. M., Klesert T. R., Lobanenkov V. V., Tapscott S. J. (2001). CTCF-binding sites flank CTG/CAG repeats and form a methylation-sensitive insulator at the DM1 locus. *Nat Genet* 28, 4, pp. 335-343.

Fischbeck K. H., Souders D., La Spada A. (1991). A candidate gene for X-linked spinal muscular atrophy. *Adv Neurol* 56, pp. 209-213.

Flanigan K., Gardner K., Alderson K., Galster B., Otterud B., Leppert M. F., Kaplan C., Ptacek L. J. (1996). Autosomal dominant spinocerebellar ataxia with sensory axonal neuropathy (SCA4): clinical description and genetic localization to chromosome 16q22.1. *Am J Hum Genet* 59, 2, pp. 392-399.

Fleming V. A., Geng C., Ladd A. N., Lou H. (2012). Alternative splicing of the neurofibromatosis type 1 pre-mRNA is regulated by the muscleblind-like proteins and the CUG-BP and ELAV-like factors. *BMC Mol Biol* 13, 35, pp. 1471-2199.

Fontes M. S., van Veen T. A., de Bakker J. M., van Rijen H. V. (2012). Functional consequences of abnormal

Cx43 expression in the heart. *Biochim Biophys Acta* 1818, 8, pp. 2020-2029.

Fox-Walsh K. L., Dou Y., Lam B. J., Hung S. P., Baldi P. F., Hertel K. J. (2005). The architecture of pre-mRNAs affects mechanisms of splice-site pairing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 45, pp. 16176-16181.

Francois V., Klein A. F., Beley C., Jollet A., Lemercier C., Garcia L., Furling D. (2011). Selective silencing of mutated mRNAs in DM1 by using modified hU7-snRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 18, 1, pp. 85-87.

Franke C., Iaizzo P. A., Hatt H., Spittelmeister W., Ricker K., Lehmann-Horn F. (1991). Altered Na⁺ channel activity and reduced Cl⁻ conductance cause hyperexcitability in recessive generalized myotonia (Becker). *Muscle Nerve* 14, 8, pp. 762-770.

Fraser S. P., Diss J. K., Chioni A. M., Mycielska M. E., Pan H., Yamaci R. F., Pani F., Siwy Z., Krasowska M., Grzywna Z., Brackenbury W. J., Theodorou D., Koyuturk M., Kaya H., Battaloglu E., De Bella M. T., Slade M. J., Tolhurst R., Palmieri C., Jiang J., Latchman D. S., Coombes R. C., Djamgoz M. B. (2005). Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res* 11, 15, pp. 5381-5389.

Friedman R. C., Farh K. K., Burge C. B., Bartel D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19, 1, pp. 92-105.

Frisch R., Singleton K. R., Moses P. A., Gonzalez I. L., Carango P., Marks H. G., 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, 1-2, pp. 281-291.

Fu Y. H., Kuhl D. P., Pizzuti A., Pieretti M., Sutcliffe J. S., Richards S., Verkerk A. J., Holden J. J., Fenwick R. G., Jr., Warren S. T., et al. (1991). Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* 67, 6, pp. 1047-1058.

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, 5049, pp. 1256-1258.

Fugier C., Klein A. F., Hammer C., Vassilopoulos S., Ivarsson Y., Toussaint A., Tosch V., Vignaud A., Ferry A., Messaddeq N., Kokunai Y., Tsuburaya R., de la Grange P., Dembele D., Francois V., Precigout G., Boulade-Ladame C., Hummel M. C., Lopez de Munain A., Sergeant N., Laquerriere A., Thibault C., Deryckere F., Auboeuf D., Garcia L., Zimmermann P., Udd B., Schoser B., Takahashi M. P., Nishino I., Bassez G., Laporte J., Furling D., Charlet-Berguerand N. (2011). Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy. *Nat Med* 17, 6, pp. 720-725.

Fukuda T., Yamagata K., Fujiyama S., Matsumoto T., Koshida I., Yoshimura K., Mihara M., Naitou M., Endoh H., Nakamura T., Akimoto C., Yamamoto Y., Katagiri T., Foulds C., Takezawa S., Kitagawa H., Takeyama K., O'Malley B. W., Kato S. (2007). DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs. *Nat Cell Biol* 9, 5, pp. 604-611.

Furling D., Coiffier L., Mouly V., Barbet J. P., St Guily J. L., Taneja K., Gourdon G., Junien C., Butler-Browne G. S. (2001). Defective satellite cells in congenital myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 10, 19, pp. 2079-2087.

Furling D., Doucet G., Langlois M. A., Timchenko L., Belanger E., Cossette L., Puymirat J. (2003). Viral vector producing antisense RNA restores myotonic dystrophy myoblast functions. *Gene Ther* 10, 9, pp. 795-802.

Furling D., Lemieux D., Taneja K., Puymirat J. (2001). Decreased levels of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) and delayed differentiation in human myotonic dystrophy myoblasts. *Neuromuscul Disord* 11, 8, pp. 728-735.

- Gambardella S., Rinaldi F., Lepore S. M., Viola A., Loro E., Angelini C., Vergani L., Novelli G., Botta A. (2010). Overexpression of microRNA-206 in the skeletal muscle from myotonic dystrophy type 1 patients. *J Transl Med* 8, pp. 48.
- Garcia-Lopez A., Llamusi B., Orzaez M., Perez-Paya E., 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, 29, pp. 11866-11871.
- Gareiss P. C., Sobczak K., McNaughton B. R., Palde P. B., Thornton C. A., Miller B. L. (2008). Dynamic combinatorial selection of molecules capable of inhibiting the (CUG) repeat RNA-MBNL1 interaction in vitro: discovery of lead compounds targeting myotonic dystrophy (DM1). *J Am Chem Soc* 130, 48, pp. 16254-16261.
- Garg K., Green P. (2007). Differing patterns of selection in alternative and constitutive splice sites. *Genome Res* 17, 7, pp. 1015-1022.
- Ge H., Manley J. L. (1990). A protein factor, ASF, controls cell-specific alternative splicing of SV40 early pre-mRNA in vitro. *Cell* 62, 1, pp. 25-34.
- Gehman L. T., Meera P., Stoilov P., Shiue L., O'Brien J. E., Meisler M. H., Ares M., Jr., Otis T. S., Black D. L. (2012). The splicing regulator Rbfox2 is required for both cerebellar development and mature motor function. *Genes Dev* 26, 5, pp. 445-460.
- Gehman L. T., Stoilov P., Maguire J., Damianov A., Lin C. H., Shiue L., Ares M., Jr., Mody I., Black D. L. (2011). The splicing regulator Rbfox1 (A2BP1) controls neuronal excitation in the mammalian brain. *Nat Genet* 43, 7, pp. 706-711.
- Gellens M. E., George A. L., Jr., Chen L. Q., Chahine M., Horn R., Barchi R. L., Kallen R. G. (1992). Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 2, pp. 554-558.
- Gennarelli M., Pavoni M., Amicucci P., Angelini C., Menegazzo E., Zelano G., Novelli G., Dallapiccola B. (1999). Reduction of the DM-associated homeo domain protein (DMAHP) mRNA in different brain areas of myotonic dystrophy patients. *Neuromuscul Disord* 9, 4, pp. 215-219.
- Goers E. S., Purcell J., Voelker R. B., Gates D. P., Berglund J. A. (2010). MBNL1 binds GC motifs embedded in pyrimidines to regulate alternative splicing. *Nucleic Acids Res* 38, 7, pp. 2467-2484.
- Goldin A. L. (2001). Resurgence of sodium channel research. *Annu Rev Physiol* 63, pp. 871-894.
- Goldin A. L. (2003). Mechanisms of sodium channel inactivation. *Curr Opin Neurobiol* 13, 3, pp. 284-290.
- Gomes A. V., Venkatraman G., Davis J. P., Tikunova S. B., Engel P., Solaro R. J., Potter J. D. (2004). Cardiac troponin T isoforms affect the Ca²⁺ sensitivity of force development in the presence of slow skeletal troponin I: insights into the role of troponin T isoforms in the fetal heart. *J Biol Chem* 279, 48, pp. 49579-49587.
- Gomes-Pereira M., Foiry L., Nicole A., Huguet A., Junien C., Munnich A., Gourdon G. (2007). CTG trinucleotide repeat "big jumps": large expansions, small mice. *PLoS Genet* 3, 4, pp. 22.
- Gonzalez-Barriga A., Mulders S. A., van de Giessen J., Hooijer J. D., Bijl S., van Kessel I. D., van Beers J., van Deutekom J. C., Franssen J. A., Wieringa B., Wansink D. G. (2013). Design and analysis of effects of triplet repeat oligonucleotides in cell models for myotonic dystrophy. *Mol Ther Nucleic Acids* 2, pp. e81.
- Goo Y. H., Cooper T. A. (2009). CUGBP2 directly interacts with U2 17S snRNP components and promotes U2 snRNA binding to cardiac troponin T pre-mRNA. *Nucleic Acids Res* 37, 13, pp. 4275-4286.
- Good P. J., Chen Q., Warner S. J., Herring D. C. (2000). A family of human RNA-binding proteins related to the Drosophila Bruno translational regulator. *J Biol Chem* 275, 37, pp. 28583-28592.
- Gooding C., Edge C., Lorenz M., Coelho M. B., Winters M., Kaminski C. F., Cherny D., Eperon I. C., Smith C. W. (2013). MBNL1 and PTB cooperate to repress splicing of Tpm1 exon 3. *Nucleic Acids Res* 41, 9, pp. 4765-

4782.

Grant A. O. (2009). Cardiac ion channels. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2, 2, pp. 185-194.

Graveley B. R. (2001). Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet* 17, 2, pp. 100-107.

Greco C. M., Hagerman R. J., Tassone F., Chudley A. E., Del Bigio M. R., Jacquemont S., Leehey M., Hagerman P. J. (2002). Neuronal intranuclear inclusions in a new cerebellar tremor/ataxia syndrome among fragile X carriers. *Brain* 125, Pt 8, pp. 1760-1771.

Grob M., Drolet G., Mougnot D. (2004). Specific Na⁺ sensors are functionally expressed in a neuronal population of the median preoptic nucleus of the rat. *J Neurosci* 24, 16, pp. 3974-3984.

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., Marshdeh M. M., Zipes D. P., Pascuzzi R. M. (2008). Electrocardiographic abnormalities and sudden death in myotonic dystrophy type 1. *N Engl J Med* 358, 25, pp. 2688-2697.

Gu S., Jin L., Zhang F., Sarnow P., Kay M. A. (2009). Biological basis for restriction of microRNA targets to the 3' untranslated region in mammalian mRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 16, 2, pp. 144-150.

Gu S., Jin L., Zhang Y., Huang Y., Zhang F., Valdmanis P. N., Kay M. A. (2012). The loop position of shRNAs and pre-miRNAs is critical for the accuracy of dicer processing in vivo. *Cell* 151, 4, pp. 900-911.

Guang S., Felthaus A. M., Mertz J. E. (2005). Binding of hnRNP L to the pre-mRNA processing enhancer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene enhances both polyadenylation and nucleocytoplasmic export of intronless mRNAs. *Mol Cell Biol* 25, 15, pp. 6303-6313.

Guil S., Caceres J. F. (2007). The multifunctional RNA-binding protein hnRNP A1 is required for processing of miR-18a. *Nat Struct Mol Biol* 14, 7, pp. 591-596.

Guo Y., Chen Y., Ito H., Watanabe A., Ge X., Kodama T., Aburatani H. (2006). Identification and characterization of lin-28 homolog B (LIN28B) in human hepatocellular carcinoma. *Gene* 384, pp. 51-61.

Gustafson T. A., Clevinger E. C., O'Neill T. J., Yarowsky P. J., Krueger B. K. (1993). Mutually exclusive exon splicing of type III brain sodium channel alpha subunit RNA generates developmentally regulated isoforms in rat brain. *J Biol Chem* 268, 25, pp. 18648-18653.

Gwizdek C., Ossareh-Nazari B., Brownawell A. M., Evers S., Macara I. G., Dargemont C. (2004). Minihelix-containing RNAs mediate exportin-5-dependent nuclear export of the double-stranded RNA-binding protein ILF3. *J Biol Chem* 279, 2, pp. 884-891.

~ H ~

Ha A. H., Tarnopolsky M. A., Bergstra T. G., Nair G. M., Al-Qubbany A., Healey J. S. (2012). Predictors of atrio-ventricular conduction disease, long-term outcomes in patients with myotonic dystrophy types I and II. *Pacing Clin Electrophysiol* 35, 10, pp. 1262-1269.

Hagerman R. J., Hagerman P. J. (2001). [Fragile X syndrome: a model of gene-brain-behaviour relationships]. *Rev Neurol* 33, 1, pp. S51-57.

Haghighat Jahromi A., Honda M., Zimmerman S. C., Spies M. (2013). Single-molecule study of the CUG repeat-MBNL1 interaction and its inhibition by small molecules. *Nucleic Acids Res* 41, 13, pp. 6687-6697.

Hammond S. M., Boettcher S., Caudy A. A., Kobayashi R., Hannon G. J. (2001). Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 293, 5532, pp. 1146-1150.

Han H., Irimia M., Ross P. J., Sung H. K., Alipanahi B., David L., Golipour A., Gabut M., Michael I. P.,

- Nachman E. N., Wang E., Trcka D., Thompson T., O'Hanlon D., Slobodeniuc V., Barbosa-Morais N. L., Burge C. B., Moffat J., Frey B. J., Nagy A., Ellis J., Wrana J. L., Blencowe B. J. (2013). MBNL proteins repress ES-cell-specific alternative splicing and reprogramming. *Nature* 498, 7453, pp. 241-245.
- Han J., Lee Y., Yeom K. H., Kim Y. K., Jin H., Kim V. N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 18, 24, pp. 3016-3027.
- Han J., Lee Y., Yeom K. H., Nam J. W., Heo I., Rhee J. K., Sohn S. Y., Cho Y., Zhang B. T., Kim V. N. (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 125, 5, pp. 887-901.
- Han S. P., Tang Y. H., Smith R. (2010). Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. *Biochem J* 430, 3, pp. 379-392.
- Harley H. G., Brook J. D., Rundle S. A., Crow S., Reardon W., Buckler A. J., Harper P. S., Housman D. E., Shaw D. J. (1992). Expansion of an unstable DNA region and phenotypic variation in myotonic dystrophy. *Nature* 355, 6360, pp. 545-546.
- Harmon E. B., Harmon M. L., Larsen T. D., Paulson A. F., Perryman M. B. (2008). Myotonic dystrophy protein kinase is expressed in embryonic myocytes and is required for myotube formation. *Dev Dyn* 237, 9, pp. 2353-2366.
- Harmon E. B., Harmon M. L., Larsen T. D., Yang J., Glasford J. W., Perryman M. B. (2011). Myotonic dystrophy protein kinase is critical for nuclear envelope integrity. *J Biol Chem* 286, 46, pp. 40296-40306.
- Harper P. S. (1973). Pre-symptomatic detection and genetic counselling in myotonic dystrophy. *Clin Genet* 4, 2, pp. 134-140.
- Harper P. S. (1989). Postoperative complications in myotonic dystrophy. *Lancet*, Nov 25;2(8674):1269.p.
- Harper P. S. (2001). Myotonic dystrophy., major problems in neurology, third edition.
- Hashem V., Galloway J. N., Mori M., Willemsen R., Oostra B. A., Paylor R., Nelson D. L. (2009). Ectopic expression of CGG containing mRNA is neurotoxic in mammals. *Hum Mol Genet* 18, 13, pp. 2443-2451.
- Hayakawa M., Sakashita E., Ueno E., Tominaga S., Hamamoto T., Kagawa Y., Endo H. (2002). Muscle-specific exonic splicing silencer for exon exclusion in human ATP synthase gamma-subunit pre-mRNA. *J Biol Chem* 277, 9, pp. 6974-6984.
- Heale B. S., Keegan L. P., McGurk L., Michlewski G., Brindle J., Stanton C. M., Caceres J. F., O'Connell M. A. (2009). Editing independent effects of ADARs on the miRNA/siRNA pathways. *EMBO J* 28, 20, pp. 3145-3156.
- Hellenbroich Y., Gierga K., Reusche E., Schwinger E., Deller T., de Vos R. A., Zuhlke C., Rub U. (2006). Spinocerebellar ataxia type 4 (SCA4): Initial pathoanatomical study reveals widespread cerebellar and brainstem degeneration. *J Neural Transm* 113, 7, pp. 829-843.
- Henke J. I., Goergen D., Zheng J., Song Y., Schuttler C. G., Fehr C., Junemann C., Niepmann M. (2008). microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J* 27, 24, pp. 3300-3310.
- Heo I., Joo C., Cho J., Ha M., Han J., Kim V. N. (2008). Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA. *Mol Cell* 32, 2, pp. 276-284.
- Heo I., Joo C., Kim Y. K., Ha M., Yoon M. J., Cho J., Yeom K. H., Han J., Kim V. N. (2009). TUT4 in concert with Lin28 suppresses microRNA biogenesis through pre-microRNA uridylation. *Cell* 138, 4, pp. 696-708.
- Herfst L. J., Potet F., Bezzina C. R., Groenewegen W. A., Le Marec H., Hoorntje T. M., Demolombe S., Baro I., Escande D., Jongsma H. J., Wilde A. A., Rook M. B. (2003). Na⁺ channel mutation leading to loss of function and non-progressive cardiac conduction defects. *J Mol Cell Cardiol* 35, 5, pp. 549-557.
- Herfst L. J., Rook M. B., Jongsma H. J. (2004). Trafficking and functional expression of cardiac Na⁺ channels. *J Mol Cell Cardiol* 36, 2, pp. 185-193.

- Hernandez-Hernandez O., Guiraud-Dogan C., Sicot G., Huguet A., Luillier S., Steidl E., Saenger S., Marciniak E., Obriot H., Chevarin C., Nicole A., Revillod L., Charizanis K., Lee K. Y., Suzuki Y., Kimura T., Matsuura T., Cisneros B., Swanson M. S., Trovero F., Buisson B., Bizot J. C., Hamon M., Humez S., Bassez G., Metzger F., Buee L., Munnich A., Sergeant N., Gourdon G., Gomes-Pereira M. (2013). Myotonic dystrophy CTG expansion affects synaptic vesicle proteins, neurotransmission and mouse behaviour. *Brain* 136, Pt 3, pp. 957-970.
- Hino S., Kondo S., Sekiya H., Saito A., Kanemoto S., Murakami T., Chihara K., Aoki Y., Nakamori M., Takahashi M. P., Imaizumi K. (2007). Molecular mechanisms responsible for aberrant splicing of SERCA1 in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 16, 23, pp. 2834-2843.
- Hirai H., Verma M., Watanabe S., Tastad C., Asakura Y., Asakura A. (2010). MyoD regulates apoptosis of myoblasts through microRNA-mediated down-regulation of Pax3. *J Cell Biol* 191, 2, pp. 347-365.
- Hirst M., Grewal P., Flannery A., Slatter R., Maher E., Barton D., Fryns J. P., Davies K. (1995). Two new cases of FMR1 deletion associated with mental impairment. *Am J Hum Genet* 56, 1, pp. 67-74.
- Ho T. H., Bundman D., Armstrong D. L., Cooper T. A. (2005). Transgenic mice expressing CUG-BP1 reproduce splicing mis-regulation observed in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 14, 11, pp. 1539-1547.
- Ho T. H., Charlet B. N., Poulos M. G., Singh G., Swanson M. S., Cooper T. A. (2004). Muscleblind proteins regulate alternative splicing. *EMBO J* 23, 15, pp. 3103-3112.
- Ho T. H., Savkur R. S., Poulos M. G., Mancini M. A., Swanson M. S., 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, Pt 13, pp. 2923-2933.
- Hodgkin J., Zellan J. D., Albertson D. G. (1994). Identification of a candidate primary sex determination locus, fox-1, on the X chromosome of *Caenorhabditis elegans*. *Development* 120, 12, pp. 3681-3689.
- Hoffman E. P., Lehmann-Horn F., Rudel R. (1995). Overexcited or inactive: ion channels in muscle disease. *Cell* 80, 5, pp. 681-686.
- Hofmann Y., Wirth B. (2002). hnRNP-G promotes exon 7 inclusion of survival motor neuron (SMN) via direct interaction with Htra2-beta1. *Hum Mol Genet* 11, 17, pp. 2037-2049.
- Holmes S. E., O'Hearn E. E., McInnis M. G., Gorelick-Feldman D. A., Kleiderlein J. J., Callahan C., Kwak N. G., Ingersoll-Ashworth R. G., Sherr M., Sumner A. J., Sharp A. H., Ananth U., Seltzer W. K., Boss M. A., Viera-Saecker A. M., Epplen J. T., Riess O., Ross C. A., Margolis R. L. (1999). Expansion of a novel CAG trinucleotide repeat in the 5' region of PPP2R2B is associated with SCA12. *Nat Genet* 23, 4, pp. 391-392.
- Holt I., Jacquemin V., Fardaei M., Sewry C. A., Butler-Browne G. S., Furling D., Brook J. D., Morris G. E. (2009). Muscleblind-like proteins: similarities and differences in normal and myotonic dystrophy muscle. *Am J Pathol* 174, 1, pp. 216-227.
- Horb L. D., Horb M. E. (2010). BrunoL1 regulates endoderm proliferation through translational enhancement of cyclin A2 mRNA. *Dev Biol* 345, 2, pp. 156-169.
- Horie T., Ono K., Nishi H., Iwanaga Y., Nagao K., Kinoshita M., Kuwabara Y., Takanebe R., Hasegawa K., Kita T., Kimura T. (2009). MicroRNA-133 regulates the expression of GLUT4 by targeting KLF15 and is involved in metabolic control in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 389, 2, pp. 315-320.
- Hudson A. J., Ebers G. C., Bulman D. E. (1995). The skeletal muscle sodium and chloride channel diseases. *Brain* 118 (Pt 2), pp. 547-563.
- Huguet A., Medja F., Nicole A., Vignaud A., Guiraud-Dogan C., Ferry A., Decostre V., Hogrel J. Y., Metzger F., Hoeflich A., Baraibar M., Gomes-Pereira M., Puymirat J., Bassez G., Furling D., Munnich A., Gourdon G. (2012). Molecular, physiological, and motor performance defects in DMSXL mice carrying >1,000 CTG repeats from the human DM1 locus. *PLoS Genet* 8, 11, pp. 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., Timchenko L. (2010). Expansion of CUG RNA repeats causes stress and inhibition of translation in myotonic dystrophy 1 (DM1) cells. *FASEB J* 24, 10, pp. 3706-3719.

Huichalaf C., Schoser B., Schneider-Gold C., Jin B., Sarkar P., Timchenko L. (2009). Reduction of the rate of protein translation in patients with myotonic dystrophy 2. *J Neurosci* 29, 28, pp. 9042-9049.

Humphreys D. T., Westman B. J., Martin D. I., Preiss T. (2005). MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 47, pp. 16961-16966.

Huntzinger E., Kuzuoglu-Ozturk D., Braun J. E., Eulalio A., Wohlbald L., Izaurralde E. (2013). The interactions of GW182 proteins with PABP and deadenylases are required for both translational repression and degradation of miRNA targets. *Nucleic Acids Res* 41, 2, pp. 978-994.

~ | ~

Iaizzo P. A., Franke C., Hatt H., Spittelmeister W., Ricker K., Rudel R., Lehmann-Horn F. (1991). Altered sodium channel behaviour causes myotonia in dominantly inherited myotonia congenita. *Neuromuscul Disord* 1, 1, pp. 47-53.

Iakova P., Wang G. L., Timchenko L., Michalak M., Pereira-Smith O. M., Smith J. R., Timchenko N. A. (2004). Competition of CUGBP1 and calreticulin for the regulation of p21 translation determines cell fate. *EMBO J* 23, 2, pp. 406-417.

Ikeda S., He A., Kong S. W., Lu J., Bejar R., Bodyak N., Lee K. H., Ma Q., Kang P. M., Golub T. R., Pu W. T. (2009). MicroRNA-1 negatively regulates expression of the hypertrophy-associated calmodulin and Mef2a genes. *Mol Cell Biol* 29, 8, pp. 2193-2204.

Ikeda Y., Ohta Y., Kobayashi H., Okamoto M., Takamatsu K., Ota T., Manabe Y., Okamoto K., Koizumi A., Abe K. (2012). Clinical features of SCA36: a novel spinocerebellar ataxia with motor neuron involvement (Asidan). *Neurology* 79, 4, pp. 333-341.

Iliopoulos D., Hirsch H. A., Struhl K. (2009). An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell* 139, 4, pp. 693-706.

Inukai A., Doyu M., Kato T., Liang Y., Kuru S., Yamamoto M., Kobayashi Y., Sobue G. (2000). Reduced expression of DMAHP/SIX5 gene in myotonic dystrophy muscle. *Muscle Nerve* 23, 9, pp. 1421-1426.

Ishikawa K., Toru S., Tsunemi T., Li M., Kobayashi K., Yokota T., Amino T., Owada K., Fujigasaki H., Sakamoto M., Tomimitsu H., Takashima M., Kumagai J., Noguchi Y., Kawashima Y., Ohkoshi N., Ishida G., Gomyoda M., Yoshida M., Hashizume Y., Saito Y., Murayama S., Yamanouchi H., Mizutani T., Kondo I., Toda T., Mizusawa H. (2005). An autosomal dominant cerebellar ataxia linked to chromosome 16q22.1 is associated with a single-nucleotide substitution in the 5' untranslated region of the gene encoding a protein with spectrin repeat and Rho guanine-nucleotide exchange-factor domains. *Am J Hum Genet* 77, 2, pp. 280-296.

Isom L. L. (2001). Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. *Neuroscientist* 7, 1, pp. 42-54.

Isom L. L., De Jongh K. S., Patton D. E., Reber B. F., Offord J., Charbonneau H., Walsh K., Goldin A. L., Catterall W. A. (1992). Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science* 256, 5058, pp. 839-842.

Iwahashi C. K., Yasui D. H., An H. J., Greco C. M., Tassone F., Nannen K., Babineau B., Lebrilla C. B., Hagerman R. J., Hagerman P. J. (2006). Protein composition of the intranuclear inclusions of FXTAS. *Brain* 129, Pt 1, pp. 256-271.



- Jacquemont S., Hagerman R. J., Leehey M., Grigsby J., Zhang L., Brunberg J. A., Greco C., Des Portes V., Jardini T., Levine R., Berry-Kravis E., Brown W. T., Schaeffer S., Kissel J., Tassone F., Hagerman P. J. (2003). Fragile X premutation tremor/ataxia syndrome: molecular, clinical, and neuroimaging correlates. *Am J Hum Genet* 72, 4, pp. 869-878.
- Jakymiw A., Pauley K. M., Li S., Ikeda K., Lian S., Eystathioy T., Satoh M., Fritzier M. J., Chan E. K. (2007). The role of GW/P-bodies in RNA processing and silencing. *J Cell Sci* 120, Pt 8, pp. 1317-1323.
- Jeevaratnam K., Zhang Y., Guzhadur L., Duehmke R. M., Lei M., Grace A. A., Huang C. L. (2010). Differences in sino-atrial and atrio-ventricular function with age and sex attributable to the Scn5a^{+/-} mutation in a murine cardiac model. *Acta Physiol (Oxf)* 200, 1, pp. 23-33.
- Jeevaratnam K., Poh Tee S., Zhang Y., Rewbury R., Guzhadur L., Duehmke R., Grace A. A., Lei M., Huang C. L. (2011). Delayed conduction and its implications in murine Scn5a^{+/-} hearts: independent and interacting effects of genotype, age, and sex. *Pflugers Arch* 461, 1, pp. 29-44.
- Jeevaratnam K., Rewbury R., Zhang Y., Guzhadur L., Grace A. A., Lei M., Huang C. L. (2012). Frequency distribution analysis of activation times and regional fibrosis in murine Scn5a^{+/-} hearts: the effects of ageing and sex. *Mech Ageing Dev* 133, 9-10, pp. 591-599.
- Jensen K. B., Dredge B. K., Stefani G., Zhong R., Buckanovich R. J., Okano H. J., Yang Y. Y., Darnell R. B. (2000). Nova-1 regulates neuron-specific alternative splicing and is essential for neuronal viability. *Neuron* 25, 2, pp. 359-371.
- Jiang Z., Tang H., Havlioglu N., Zhang X., Stamm S., Yan R., Wu J. Y. (2003). Mutations in tau gene exon 10 associated with FTDP-17 alter the activity of an exonic splicing enhancer to interact with Tra2 beta. *J Biol Chem* 278, 21, pp. 18997-19007.
- Jiang H., Mankodi A., Swanson M. S., Moxley R. T., 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, 24, pp. 3079-3088.
- Jin P., Duan R., Qurashi A., Qin Y., Tian D., Rosser T. C., Liu H., Feng Y., Warren S. T. (2007). Pur alpha binds to rCGG repeats and modulates repeat-mediated neurodegeneration in a Drosophila model of fragile X tremor/ataxia syndrome. *Neuron* 55, 4, pp. 556-564.
- Jin Y., Suzuki H., Maegawa S., Endo H., Sugano S., Hashimoto K., Yasuda K., Inoue K. (2003). A vertebrate RNA-binding protein Fox-1 regulates tissue-specific splicing via the pentanucleotide GCAUG. *EMBO J* 22, 4, pp. 905-912.
- Jinek M., Doudna J. A. (2009). A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature* 457, 7228, pp. 405-412.
- Jones M. R., Blahna M. T., Kozlowski E., Matsuura K. Y., Ferrari J. D., Morris S. A., Powers J. T., Daley G. Q., Quinton L. J., Mizgerd J. P. (2012). Zcchc11 uridylates mature miRNAs to enhance neonatal IGF-1 expression, growth, and survival. *PLoS Genet* 8, 11, pp. e1003105.
- Jones M. R., Quinton L. J., Blahna M. T., Neilson J. R., Fu S., Ivanov A. R., Wolf D. A., Mizgerd J. P. (2009). Zcchc11-dependent uridylation of microRNA directs cytokine expression. *Nat Cell Biol* 11, 9, pp. 1157-1163.
- Jopling C. L., Schutz S., Sarnow P. (2008). Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. *Cell Host Microbe* 4, 1, pp. 77-85.
- Jungbluth H., Wallgren-Pettersson C., Laporte J. (2008). Centronuclear (myotubular) myopathy. *Orphanet J Rare Dis* 3, pp. 26.

~K~

- Kalsotra A., Xiao X., Ward A. J., Castle J. C., Johnson J. M., Burge C. B., 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, 51, pp. 20333-20338.
- Kanadia R. N., Johnstone K. A., Mankodi A., Lungu C., Thornton C. A., Esson D., Timmers A. M., Hauswirth W. W., Swanson M. S. (2003). A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science* 302, 5652, pp. 1978-1980.
- Kanadia R. N., Urbinati C. R., Crusselle V. J., Luo D., Lee Y. J., Harrison J. K., Oh S. P., Swanson M. S. (2003). Developmental expression of mouse muscleblind genes Mbnl1, Mbnl2 and Mbnl3. *Gene Expr Patterns* 3, 4, pp. 459-462.
- Kanadia R. N., Shin J., Yuan Y., Beattie S. G., Wheeler T. M., Thornton C. A., 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, 31, pp. 11748-11753.
- Kang J. X., Li Y., Leaf A. (1997). Regulation of sodium channel gene expression by class I antiarrhythmic drugs and n - 3 polyunsaturated fatty acids in cultured neonatal rat cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6, pp. 2724-2728.
- Katoh T., Sakaguchi Y., Miyauchi K., Suzuki T., Kashiwabara S., Baba T. (2009). Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3' adenylation mediated by the cytoplasmic poly(A) polymerase GLD-2. *Genes Dev* 23, 4, pp. 433-438.
- Katoh T., Sakaguchi Y., Miyauchi K., Suzuki T., Kashiwabara S., Baba T. (2009). Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3' adenylation mediated by the cytoplasmic poly(A) polymerase GLD-2. *Genes Dev* 23, 4, pp. 433-438.
- Kaufmann W. E., Moser H. W. (2000). Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cereb Cortex* 10, 10, pp. 981-991.
- Kawahara Y., Zinshteyn B., Chendrimada T. P., Shiekhhattar R., Nishikura K. (2007). RNA editing of the microRNA-151 precursor blocks cleavage by the Dicer-TRBP complex. *EMBO Rep* 8, 8, pp. 763-769.
- Kawahara Y., Zinshteyn B., Sethupathy P., Iizasa H., Hatzigeorgiou A. G., Nishikura K. (2007). Redirection of silencing targets by adenosine-to-inosine editing of miRNAs. *Science* 315, 5815, pp. 1137-1140.
- Kawahara Y., Megraw M., Kreider E., Iizasa H., Valente L., Hatzigeorgiou A. G., Nishikura K. (2008). Frequency and fate of microRNA editing in human brain. *Nucleic Acids Res* 36, 16, pp. 5270-5280.
- Kawahara Y., Mieda-Sato A. (2012). TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 9, pp. 3347-3352.
- Kenneson A., Zhang F., Hagedorn C. H., Warren S. T. (2001). Reduced FMRP and increased FMR1 transcription is proportionally associated with CGG repeat number in intermediate-length and premutation carriers. *Hum Mol Genet* 10, 14, pp. 1449-1454.
- Ketting R. F., Fischer S. E., Bernstein E., Sijen T., Hannon G. J., Plasterk R. H. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 15, 20, pp. 2654-2659.
- Khvorova A., Reynolds A., Jayasena S. D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115, 2, pp. 209-216.
- Kim H. H., Kuwano Y., Srikantan S., Lee E. K., Martindale J. L., Gorospe M. (2009). HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression. *Genes Dev* 23, 15, pp. 1743-1748.

- Kim J., Krichevsky A., Grad Y., Hayes G. D., Kosik K. S., Church G. M., Ruvkun G. (2004). Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 1, pp. 360-365.
- Kim M., Bellini M., Ceman S. (2009). Fragile X mental retardation protein FMRP binds mRNAs in the nucleus. *Mol Cell Biol* *29*, 1, pp. 214-228.
- Kimura T., Nakamori M., Lueck J. D., Pouliquin P., Aoike F., Fujimura H., Dirksen R. T., Takahashi M. P., Dulhunty A. F., 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*, 15, pp. 2189-2200.
- Kinch L. N., Grishin N. V. (2009). The human Ago2 MC region does not contain an eIF4E-like mRNA cap binding motif. *Biol Direct* *4*, pp. 2.
- Kino Y., Mori D., Oma Y., Takeshita Y., Sasagawa N., Ishiura S. (2004). Muscleblind protein, MBNL1/EXP, binds specifically to CHHG repeats. *Hum Mol Genet* *13*, 5, pp. 495-507.
- Kino Y., Washizu C., Oma Y., Onishi H., Nezu Y., Sasagawa N., Nukina N., Ishiura S. (2009). MBNL and CELF proteins regulate alternative splicing of the skeletal muscle chloride channel CLCN1. *Nucleic Acids Res* *37*, 19, pp. 6477-6490.
- Kiriakidou M., Tan G. S., Lamprinaki S., De Planell-Saguer M., Nelson P. T., Mourelatos Z. (2007). An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell* *129*, 6, pp. 1141-1151.
- Klein G., Schroder F., Vogler D., Schaefer A., Haverich A., Schieffer B., Korte T., Drexler H. (2003). Increased open probability of single cardiac L-type calcium channels in patients with chronic atrial fibrillation. role of phosphatase 2A. *Cardiovasc Res* *59*, 1, pp. 37-45.
- Klesert T. R., Otten A. D., Bird T. D., Tapscott S. J. (1997). Trinucleotide repeat expansion at the myotonic dystrophy locus reduces expression of DMAHP. *Nat Genet* *16*, 4, pp. 402-406.
- Klesert T. R., Cho D. H., Clark J. I., Maylie J., Adelman J., Snider L., Yuen E. C., Soriano P., Tapscott S. J. (2000). Mice deficient in Six5 develop cataracts: implications for myotonic dystrophy. *Nat Genet* *25*, 1, pp. 105-109.
- Kloosterman W. P., Wienholds E., Ketting R. F., Plasterk R. H. (2004). Substrate requirements for let-7 function in the developing zebrafish embryo. *Nucleic Acids Res* *32*, 21, pp. 6284-6291.
- Knight S. J., Flannery A. V., Hirst M. C., Campbell L., Christodoulou Z., Phelps S. R., Pointon J., Middleton-Price H. R., Barnicoat A., Pembrey M. E., et al. (1993). Trinucleotide repeat amplification and hypermethylation of a CpG island in FRAXE mental retardation. *Cell* *74*, 1, pp. 127-134.
- Kobayashi H., Abe K., Matsuura T., Ikeda Y., Hitomi T., Akechi Y., Habu T., Liu W., Okuda H., Koizumi A. (2011). Expansion of intronic GGCCTG hexanucleotide repeat in NOP56 causes SCA36, a type of spinocerebellar ataxia accompanied by motor neuron involvement. *Am J Hum Genet* *89*, 1, pp. 121-130.
- Koch M. C., Steinmeyer K., Lorenz C., Ricker K., Wolf F., Otto M., Zoll B., Lehmann-Horn F., Grzeschik K. H., Jentsch T. J. (1992). The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science* *257*, 5071, pp. 797-800.
- Koebis M., Ohsawa N., Kino Y., Sasagawa N., Nishino I., Ishiura S. (2011). Alternative splicing of myomesin 1 gene is aberrantly regulated in myotonic dystrophy type 1. *Genes Cells* *16*, 9, pp. 961-972.
- Kok K. H., Ng M. H., Ching Y. P., Jin D. Y. (2007). Human TRBP and PACT directly interact with each other and associate with dicer to facilitate the production of small interfering RNA. *J Biol Chem* *282*, 24, pp. 17649-17657.
- Koob M. D., Moseley M. L., Schut L. J., Benzow K. A., Bird T. D., Day J. W., Ranum L. P. (1999). An untranslated CTG expansion causes a novel form of spinocerebellar ataxia (SCA8). *Nat Genet* *21*, 4, pp. 379-

384.

Korade-Mirnic Z., Tarleton J., Servidei S., Casey R. R., Gennarelli M., Pegoraro E., Angelini C., Hoffman E. P. (1999). Myotonic dystrophy: tissue-specific effect of somatic CTG expansions on allele-specific DMAHP/SIX5 expression. *Hum Mol Genet* 8, 6, pp. 1017-1023.

Koshelev M., Sarma S., Price R. E., Wehrens X. H., Cooper T. A. (2010). Heart-specific overexpression of CUGBP1 reproduces functional and molecular abnormalities of myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 19, 6, pp. 1066-1075.

Koval O. M., Snyder J. S., Wolf R. M., Pavlovicz R. E., Glynn P., Curran J., Leymaster N. D., Dun W., Wright P. J., Cardona N., Qian L., Mitchell C. C., Boyden P. A., Binkley P. F., Li C., Anderson M. E., Mohler P. J., Hund T. J. (2012). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II-based regulation of voltage-gated Na⁺ channel in cardiac disease. *Circulation* 126, 17, pp. 2084-2094.

Krainer A. R., Conway G. C., Kozak D. (1990). Purification and characterization of pre-mRNA splicing factor SF2 from HeLa cells. *Genes Dev* 4, 7, pp. 1158-1171.

Kress C., Gautier-Courteille C., Osborne H. B., Babinet C., Paillard L. (2007). Inactivation of CUGBP1/CELF1 causes growth, viability, and spermatogenesis defects in mice. *Mol Cell Biol* 27, 3, pp. 1146-1157.

Krol J., Fiszer A., Mykowska A., Sobczak K., de Mezer M., Krzyzosiak W. J. (2007). Ribonuclease dicer cleaves triplet repeat hairpins into shorter repeats that silence specific targets. *Mol Cell* 25, 4, pp. 575-586.

Krol J., Loedige I., Filipowicz W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 11, 9, pp. 597-610.

Krol J., Sobczak K., Wilczynska U., Drath M., Jasinska A., Kaczynska D., Krzyzosiak W. J. (2004). Structural features of microRNA (miRNA) precursors and their relevance to miRNA biogenesis and small interfering RNA/short hairpin RNA design. *J Biol Chem* 279, 40, pp. 42230-42239.

Kuang S., Charge S. B., Seale P., Huh M., Rudnicki M. A. (2006). Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis. *J Cell Biol* 172, 1, pp. 103-113.

Kuyumcu-Martinez N. M., Wang G. S., Cooper T. A. (2007). Increased steady-state levels of CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation. *Mol Cell* 28, 1, pp. 68-78.

Kuznetsova T., Staessen J. A., Brand E., Cwynar M., Stolarz K., Thijs L., Tikhonoff V., Wojciechowska W., Babeanu S., Brand-Herrmann S. M., Casiglia E., Filipovsky J., Grodzicki T., Nikitin Y., Peleska J., Struijker-Boudier H., Bianchi G., Kawecka-Jaszcz K. (2006). Sodium excretion as a modulator of genetic associations with cardiovascular phenotypes in the European Project on Genes in Hypertension. *J Hypertens* 24, 2, pp. 235-242.

Kuzuoglu-Ozturk D., Huntzinger E., Schmidt S., Izaurralde E. (2012). The *Caenorhabditis elegans* GW182 protein AIN-1 interacts with PAB-1 and subunits of the PAN2-PAN3 and CCR4-NOT deadenylase complexes. *Nucleic Acids Res* 40, 12, pp. 5651-5665.

Kwon C., Han Z., Olson E. N., Srivastava D. (2005). MicroRNA1 influences cardiac differentiation in *Drosophila* and regulates Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 52, pp. 18986-18991.

Kyndt F., Probst V., Potet F., Demolombe S., Chevallier J. C., Baro I., Moisan J. P., Boisseau P., Schott J. J., Escande D., Le Marec H. (2001). Novel SCN5A mutation leading either to isolated cardiac conduction defect or Brugada syndrome in a large French family. *Circulation* 104, 25, pp. 3081-3086.



- La Spada A. R., Taylor J. P. (2010). Repeat expansion disease: progress and puzzles in disease pathogenesis. *Nat Rev Genet* 11, 4, pp. 247-258.
- LaBranche H., Dupuis S., Ben-David Y., Bani M. R., Wellinger R. J., Chabot B. (1998). Telomere elongation by hnRNP A1 and a derivative that interacts with telomeric repeats and telomerase. *Nat Genet* 19, 2, pp. 199-202.
- Ladd A. N., Charlet N., Cooper T. A. (2001). The CELF family of RNA binding proteins is implicated in cell-specific and developmentally regulated alternative splicing. *Mol Cell Biol* 21, 4, pp. 1285-1296.
- Ladd A. N., Nguyen N. H., Malhotra K., 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, 17, pp. 17756-17764.
- Laggerbauer B., Ostareck D., Keidel E. M., Ostareck-Lederer A., Fischer U. (2001). Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. *Hum Mol Genet* 10, 4, pp. 329-338.
- Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., Tuschl T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294, 5543, pp. 853-858.
- Landthaler M., Gaidatzis D., Rothballer A., Chen P. Y., Soll S. J., Dinic L., Ojo T., Hafner M., Zavolan M., Tuschl T. (2008). Molecular characterization of human Argonaute-containing ribonucleoprotein complexes and their bound target mRNAs. *RNA* 14, 12, pp. 2580-2596.
- Langlois M. A., Lee N. S., Rossi J. J., Puymirat J. (2003). Hammerhead ribozyme-mediated destruction of nuclear foci in myotonic dystrophy myoblasts. *Mol Ther* 7, 5 Pt 1, pp. 670-680.
- Lau N. C., Lim L. P., Weinstein E. G., Bartel D. P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 5543, pp. 858-862.
- Laurent F. X., Sureau A., Klein A. F., Trouslard F., Gasnier E., Furling D., 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, 7, pp. 3159-3171.
- Lee R. C., Feinbaum R. L., Ambros V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 5, pp. 843-854.
- Lee R. C., Ambros V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 5543, pp. 862-864.
- Lee S., Park M. S. (2002). Human FEN-1 can process the 5'-flap DNA of CTG/CAG triplet repeat derived from human genetic diseases by length and sequence dependent manner. *Exp Mol Med* 34, 4, pp. 313-317.
- Lee Y., Jeon K., Lee J. T., Kim S., Kim V. N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 21, 17, pp. 4663-4670.
- Lee Y., Ahn C., Han J., Choi H., Kim J., Yim J., Lee J., Provost P., Radmark O., Kim S., Kim V. N. (2003). The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 6956, pp. 415-419.
- Lee Y., Kim M., Han J., Yeom K. H., Lee S., Baek S. H., Kim V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23, 20, pp. 4051-4060.
- Lee Y., Hur I., Park S. Y., Kim Y. K., Suh M. R., Kim V. N. (2006). The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J* 25, 3, pp. 522-532.
- Lee J. E., Cooper T. A. (2009). Pathogenic mechanisms of myotonic dystrophy. *Biochem Soc Trans* 37, Pt 6,

pp. 1281-1286.

Lee M. M., Childs-Disney J. L., Pushechnikov A., French J. M., Sobczak K., Thornton C. A., Disney M. D. (2009). Controlling the specificity of modularly assembled small molecules for RNA via ligand module spacing: targeting the RNAs that cause myotonic muscular dystrophy. *J Am Chem Soc* *131*, 47, pp. 17464-17472.

Lee M. M., Pushechnikov A., Disney M. D. (2009). Rational and modular design of potent ligands targeting the RNA that causes myotonic dystrophy 2. *ACS Chem Biol* *4*, 5, pp. 345-355.

Lee K. S., Cao Y., Witwicka H. E., Tom S., Tapscott S. J., Wang E. H. (2010). RNA-binding protein Muscleblind-like 3 (MBNL3) disrupts myocyte enhancer factor 2 (Mef2) {beta}-exon splicing. *J Biol Chem* *285*, 44, pp. 33779-33787.

Lee J. E., Bennett C. F., Cooper T. A. (2012). RNase H-mediated degradation of toxic RNA in myotonic dystrophy type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 11, pp. 4221-4226.

Lehmann-Horn F., Jurkat-Rott K. (1999). Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiol Rev* *79*, 4, pp. 1317-1372.

Lehrbach N. J., Armisen J., Lightfoot H. L., Murfitt K. J., Bugaut A., Balasubramanian S., Miska E. A. (2009). LIN-28 and the poly(U) polymerase PUP-2 regulate let-7 microRNA processing in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Struct Mol Biol* *16*, 10, pp. 1016-1020.

Lei K., Zhang X., Ding X., Guo X., Chen M., Zhu B., Xu T., Zhuang Y., Xu R., Han M. (2009). SUN1 and SUN2 play critical but partially redundant roles in anchoring nuclei in skeletal muscle cells in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 25, pp. 10207-10212.

Leroy O., Dhaenens C. M., Schraen-Maschke S., Belarbi K., Delacourte A., Andreadis A., Sablonniere B., Buee L., Sergeant N., Caillet-Boudin M. L. (2006). ETR-3 represses Tau exons 2/3 inclusion, a splicing event abnormally enhanced in myotonic dystrophy type I. *J Neurosci Res* *84*, 4, pp. 852-859.

Leroy O., Wang J., Maurage C. A., Parent M., Cooper T., Buee L., Sergeant N., Andreadis A., Caillet-Boudin M. L. (2006). Brain-specific change in alternative splicing of Tau exon 6 in myotonic dystrophy type 1. *Biochim Biophys Acta* *1762*, 4, pp. 460-467.

Levers T. E., Tait S., Birling M. C., Brophy P. J., Price D. J. (2002). Etr-r3/mNapor, encoding an ELAV-type RNA binding protein, is expressed in differentiating cells in the developing rodent forebrain. *Mech Dev* *112*, 1-2, pp. 191-193.

Lewis H. A., Chen H., Edo C., Buckanovich R. J., Yang Y. Y., Musunuru K., Zhong R., Darnell R. B., Burley S. K. (1999). Crystal structures of Nova-1 and Nova-2 K-homology RNA-binding domains. *Structure* *7*, 2, pp. 191-203.

Li N., Zhong X., Lin X., Guo J., Zou L., Tanyi J. L., Shao Z., Liang S., Wang L. P., Hwang W. T., Katsaros D., Montone K., Zhao X., Zhang L. (2012). Lin-28 homologue A (LIN28A) promotes cell cycle progression via regulation of cyclin-dependent kinase 2 (CDK2), cyclin D1 (CCND1), and cell division cycle 25 homolog A (CDC25A) expression in cancer. *J Biol Chem* *287*, 21, pp. 17386-17397.

Li Y., Yang C. M., Xi Y., Wu G., Shelat H., Gao S., Cheng J., Geng Y. J. (2012). MicroRNA-1/133 targeted dysfunction of potassium channels KCNE1 and KCNQ1 in human cardiac progenitor cells with simulated hyperglycemia. *Int J Cardiol*, pp.

Licatalosi D. D., Mele A., Fak J. J., Ule J., Kayikci M., Chi S. W., Clark T. A., Schweitzer A. C., Blume J. E., Wang X., Darnell J. C., Darnell R. B. (2008). HITS-CLIP yields genome-wide insights into brain alternative RNA processing. *Nature* *456*, 7221, pp. 464-469.

Lim L. P., Glasner M. E., Yekta S., Burge C. B., Bartel D. P. (2003). Vertebrate microRNA genes. *Science* *299*, 5612, pp. 1540.

Lin S., Xiao R., Sun P., Xu X., Fu X. D. (2005). Dephosphorylation-dependent sorting of SR splicing factors

- during mRNP maturation. *Mol Cell* 20, 3, pp. 413-425.
- Lin X., Miller J. W., Mankodi A., Kanadia R. N., Yuan Y., Moxley R. T., Swanson M. S., Thornton C. A. (2006). Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 15, 13, pp. 2087-2097.
- Lin Y., Dent S. Y., Wilson J. H., Wells R. D., Napierala M. (2010). R loops stimulate genetic instability of CTG.CAG repeats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 2, pp. 692-697.
- Lingel A., Simon B., Izaurralde E., Sattler M. (2003). Structure and nucleic-acid binding of the Drosophila Argonaute 2 PAZ domain. *Nature* 426, 6965, pp. 465-469.
- Lipkind G. M., Fozzard H. A. (2000). KcsA crystal structure as framework for a molecular model of the Na(+) channel pore. *Biochemistry* 39, 28, pp. 8161-8170.
- Lippi G., Montagnana M., Meschi T., Comelli I., Cervellin G. (2012). Genetic and clinical aspects of Brugada syndrome: an update. *Adv Clin Chem* 56, pp. 197-208.
- Liquori C. L., Ricker K., Moseley M. L., Jacobsen J. F., Kress W., Naylor S. L., Day J. W., Ranum L. P. (2001). Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science* 293, 5531, pp. 864-867.
- Liu J., Carmell M. A., Rivas F. V., Marsden C. G., Thomson J. M., Song J. J., Hammond S. M., Joshua-Tor L., Hannon G. J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305, 5689, pp. 1437-1441.
- Liu J., Rivas F. V., Wohlschlegel J., Yates J. R., 3rd, Parker R., Hannon G. J. (2005). A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol* 7, 12, pp. 1261-1266.
- Liu N., Bezprozvannaya S., Williams A. H., Qi X., Richardson J. A., Bassel-Duby R., Olson E. N. (2008). microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes Dev* 22, 23, pp. 3242-3254.
- Liu N., Williams A. H., Kim Y., McAnally J., Bezprozvannaya S., Sutherland L. B., Richardson J. A., Bassel-Duby R., Olson E. N. (2007). An intragenic MEF2-dependent enhancer directs muscle-specific expression of microRNAs 1 and 133. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 52, pp. 20844-20849.
- Liu N., Olson E. N. (2010). MicroRNA regulatory networks in cardiovascular development. *Dev Cell* 18, 4, pp. 510-525.
- Liu N., Williams A. H., Maxeiner J. M., Bezprozvannaya S., Shelton J. M., Richardson J. A., Bassel-Duby R., Olson E. N. (2012). microRNA-206 promotes skeletal muscle regeneration and delays progression of Duchenne muscular dystrophy in mice. *J Clin Invest* 122, 6, pp. 2054-2065.
- Liu Y., Ye X., Jiang F., Liang C., Chen D., Peng J., Kinch L. N., Grishin N. V., Liu Q. (2009). C3PO, an endoribonuclease that promotes RNAi by facilitating RISC activation. *Science* 325, 5941, pp. 750-753.
- Llagostera E., Catalucci D., Marti L., Liesa M., Camps M., Ciaraldi T. P., Kondo R., Reddy S., Dillmann W. H., Palacin M., Zorzano A., Ruiz-Lozano P., Gomis R., Kaliman P. (2007). Role of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) in glucose homeostasis and muscle insulin action. *PLoS One* 2, 11, pp. e1134.
- Llorian M., Schwartz S., Clark T. A., Hollander D., Tan L. Y., Spellman R., Gordon A., Schweitzer A. C., de la Grange P., Ast G., Smith C. W. (2010). Position-dependent alternative splicing activity revealed by global profiling of alternative splicing events regulated by PTB. *Nat Struct Mol Biol* 17, 9, pp. 1114-1123.
- Logigian E. L., Martens W. B., Moxley R. T. t., McDermott M. P., Dilek N., Wiegner A. W., Pearson A. T., Barbieri C. A., Annis C. L., Thornton C. A., Moxley R. T., 3rd (2010). Mexiletine is an effective antimyotonia treatment in myotonic dystrophy type 1. *Neurology* 74, 18, pp. 1441-1448.
- Long J. C., Caceres J. F. (2009). The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *Biochem J* 417, 1, pp. 15-27.

Lopez Castel A., Nakamori M., Tome S., Chitayat D., Gourdon G., Thornton C. A., Pearson C. E. (2011). Expanded CTG repeat demarcates a boundary for abnormal CpG methylation in myotonic dystrophy patient tissues. *Hum Mol Genet* 20, 1, pp. 1-15.

Loughlin F. E., Gebert L. F., Towbin H., Brunschweiler A., Hall J., Allain F. H. (2011). Structural basis of pre-let-7 miRNA recognition by the zinc knuckles of pluripotency factor Lin28. *Nat Struct Mol Biol* 19, 1, pp. 84-89.

Lowe J. S., Palygin O., Bhasin N., Hund T. J., Boyden P. A., Shibata E., Anderson M. E., Mohler P. J. (2008). Voltage-gated Nav channel targeting in the heart requires an ankyrin-G dependent cellular pathway. *J Cell Biol* 180, 1, pp. 173-186.

Lu X., Timchenko N. A., Timchenko L. T. (1999). Cardiac elav-type RNA-binding protein (ETR-3) binds to RNA CUG repeats expanded in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 8, 1, pp. 53-60.

Lugenbeel K. A., Peier A. M., Carson N. L., Chudley A. E., Nelson D. L. (1995). Intragenic loss of function mutations demonstrate the primary role of FMR1 in fragile X syndrome. *Nat Genet* 10, 4, pp. 483-485.

Lujambio A., Calin G. A., Villanueva A., Ropero S., Sanchez-Cespedes M., Blanco D., Montuenga L. M., Rossi S., Nicoloso M. S., Faller W. J., Gallagher W. M., Eccles S. A., Croce C. M., Esteller M. (2008). A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 36, pp. 13556-13561.

Luo W., Nie Q., Zhang X. (2013). MicroRNAs involved in skeletal muscle differentiation. *J Genet Genomics* 40, 3, pp. 107-116.

Luo X., Lin H., Pan Z., Xiao J., Zhang Y., Lu Y., Yang B., Wang Z. (2008). Down-regulation of miR-1/miR-133 contributes to re-expression of pacemaker channel genes HCN2 and HCN4 in hypertrophic heart. *J Biol Chem* 283, 29, pp. 20045-20052.

~ M ~

Machuca-Tzili L., Brook D., Hilton-Jones D. (2005). Clinical and molecular aspects of the myotonic dystrophies: a review. *Muscle Nerve* 32, 1, pp. 1-18.

Machuca-Tzili L. E., Buxton S., Thorpe A., Timson C. M., Wigmore P., Luther P. K., Brook J. D. (2011). Zebrafish deficient for Muscleblind-like 2 exhibit features of myotonic dystrophy. *Dis Model Mech* 4, 3, pp. 381-392.

Maeda M., Taft C. S., Bush E. W., Holder E., Bailey W. M., Neville H., Perryman M. B., Bies R. D. (1995). Identification, tissue-specific expression, and subcellular localization of the 80- and 71-kDa forms of myotonic dystrophy kinase protein. *J Biol Chem* 270, 35, pp. 20246-20249.

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, 5049, pp. 1253-1255.

Mahadevan M. S., Yadava R. S., Yu Q., Balijepalli S., Frenzel-McCardell C. D., Bourne T. D., Phillips L. H. (2006). Reversible model of RNA toxicity and cardiac conduction defects in myotonic dystrophy. *Nat Genet* 38, 9, pp. 1066-1070.

Mangiarini L., Sathasivam K., Seller M., Cozens B., Harper A., Hetherington C., Lawton M., Trotter Y., Lehrach H., Davies S. W., Bates G. P. (1996). Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 87, 3, pp. 493-506.

Mankodi A., Logigian E., Callahan L., McClain C., White R., Henderson D., Krym M., Thornton C. A. (2000). Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science* 289, 5485, pp. 1769-1773.

- Mankodi A., Urbinati C. R., Yuan Q. P., Moxley R. T., Sansone V., Krym M., Henderson D., Schalling M., Swanson M. S., Thornton C. A. (2001). Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2. *Hum Mol Genet* 10, 19, pp. 2165-2170.
- Mankodi A., Takahashi M. P., Jiang H., Beck C. L., Bowers W. J., Moxley R. T., Cannon S. C., 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, 1, pp. 35-44.
- Manley J. L., Krainer A. R. A rational nomenclature for serine/arginine-rich protein splicing factors (SR proteins). *Genes Dev.* 2010 Jun 1;24(11):1073-4. doi: 10.1101/gad.1934910.p.
- Maroney P. A., Yu Y., Fisher J., Nilsen T. W. (2006). Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nat Struct Mol Biol* 13, 12, pp. 1102-1107.
- Marquis J., Paillard L., Audic Y., Cosson B., Danos O., Le Bec C., Osborne H. B. (2006). CUG-BP1/CELF1 requires UGU-rich sequences for high-affinity binding. *Biochem J* 400, 2, pp. 291-301.
- Marteyn A., Maury Y., Gauthier M. M., Lecuyer C., Vernet R., Denis J. A., Pietu G., Peschanski M., Martinat C. (2011). Mutant human embryonic stem cells reveal neurite and synapse formation defects in type 1 myotonic dystrophy. *Cell Stem Cell* 8, 4, pp. 434-444.
- Martinez J., Patkaniowska A., Urlaub H., Luhrmann R., Tuschl T. (2002). Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 110, 5, pp. 563-574.
- Martinez-Contreras R., Cloutier P., Shkreta L., Fiset J. F., Revil T., Chabot B. (2007). hnRNP proteins and splicing control. *Adv Exp Med Biol* 623, pp. 123-147.
- Martinez-Contreras R., Fiset J. F., Nasim F. U., Madden R., Cordeau M., Chabot B. (2006). Intronic binding sites for hnRNP A/B and hnRNP F/H proteins stimulate pre-mRNA splicing. *PLoS Biol* 4, 2, pp. e21.
- Martorell L., Monckton D. G., Gamez J., Johnson K. J., Gich I., Lopez de Munain A., Baiget M. (1998). Progression of somatic CTG repeat length heterogeneity in the blood cells of myotonic dystrophy patients. *Hum Mol Genet* 7, 2, pp. 307-312.
- Massa R., Panico M. B., Caldarola S., Fusco F. R., Sabatelli P., Terracciano C., Botta A., Novelli G., Bernardi G., Loreni F. (2010). The myotonic dystrophy type 2 (DM2) gene product zinc finger protein 9 (ZNF9) is associated with sarcomeres and normally localized in DM2 patients' muscles. *Neuropathol Appl Neurobiol* 36, 4, pp. 275-284.
- Mastroiannopoulos N. P., Feldman M. L., Uney J. B., Mahadevan M. S., Phylactou L. A. (2005). Woodchuck post-transcriptional element induces nuclear export of myotonic dystrophy 3' untranslated region transcripts. *EMBO Rep* 6, 5, pp. 458-463.
- Masuda A., Andersen H. S., Doktor T. K., Okamoto T., Ito M., Andresen B. S., Ohno K. (2012). CUGBP1 and MBNL1 preferentially bind to 3' UTRs and facilitate mRNA decay. *Sci Rep* 2, pp. 209.
- Mathieu J., Allard P., Potvin L., Prevost C., Begin P. (1999). A 10-year study of mortality in a cohort of patients with myotonic dystrophy. *Neurology* 52, 8, pp. 1658-1662.
- Mathieu J., Allard P., Potvin L., Prevost C., Begin P. (1999). A 10-year study of mortality in a cohort of patients with myotonic dystrophy. *Neurology* 52, 8, pp. 1658-1662.
- Matsuura T. (2010). RNA-mediated disease mechanism of spinocerebellar ataxia type 10. *Rinsho Shinkeigaku* 50, 11, pp. 984.
- Matsuura T., Yamagata T., Burgess D. L., Rasmussen A., Grewal R. P., Watase K., Khajavi M., McCall A. E., Davis C. F., Zu L., Achari M., Pulst S. M., Alonso E., Noebels J. L., Nelson D. L., Zoghbi H. Y., Ashizawa T. (2000). Large expansion of the ATTCT pentanucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 10. *Nat Genet* 26, 2, pp. 191-194.

- Matynia A., Ng C. H., Dansithong W., Chiang A., Silva A. J., Reddy S. (2010). Muscleblind1, but not Dmpk or Six5, contributes to a complex phenotype of muscular and motivational deficits in mouse models of myotonic dystrophy. *PLoS One* 5, 3, pp. 0009857.
- Mayr F., Schutz A., Doge N., Heinemann U. (2012). The Lin28 cold-shock domain remodels pre-let-7 microRNA. *Nucleic Acids Res* 40, 15, pp. 7492-7506.
- McClatchey A. I., McKenna-Yasek D., Cros D., Worthen H. G., Kuncel R. W., DeSilva S. M., Cornblath D. R., Gusella J. F., Brown R. H., Jr. (1992). Novel mutations in families with unusual and variable disorders of the skeletal muscle sodium channel. *Nat Genet* 2, 2, pp. 148-152.
- McClatchey A. I., Van den Bergh P., Pericak-Vance M. A., Raskind W., Verellen C., McKenna-Yasek D., Rao K., Haines J. L., Bird T., Brown R. H., Jr., et al. (1992). Temperature-sensitive mutations in the III-IV cytoplasmic loop region of the skeletal muscle sodium channel gene in paramyotonia congenita. *Cell* 68, 4, pp. 769-774.
- McFarland K. N., Liu J., Landrian I., Gao R., Sarkar P. S., Raskin S., Moscovich M., Gatto E. M., Teive H. A., Ochoa A., Rasmussen A., Ashizawa T. (2013). Paradoxical effects of repeat interruptions on spinocerebellar ataxia type 10 expansions and repeat instability. *Eur J Hum Genet* 27, 10, pp. 32.
- Medeiros-Domingo A., Kaku T., Tester D. J., Iturralde-Torres P., Itty A., Ye B., Valdivia C., Ueda K., Canizales-Quinteros S., Tusie-Luna M. T., Makielski J. C., Ackerman M. J. (2007). SCN4B-encoded sodium channel beta4 subunit in congenital long-QT syndrome. *Circulation* 116, 2, pp. 134-142.
- Meister G., Landthaler M., Peters L., Chen P. Y., Urlaub H., Luhrmann R., Tuschl T. (2005). Identification of novel argonaute-associated proteins. *Curr Biol* 15, 23, pp. 2149-2155.
- Melo S. A., Ropero S., Moutinho C., Aaltonen L. A., Yamamoto H., Calin G. A., Rossi S., Fernandez A. F., Carneiro F., Oliveira C., Ferreira B., Liu C. G., Villanueva A., Capella G., Schwartz S., Jr., Shiekhhattar R., Esteller M. (2009). A TARBP2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and DICER1 function. *Nat Genet* 41, 3, pp. 365-370.
- Meola G., Sansone V., Radice S., Skradski S., Ptacek L. (1996). A family with an unusual myotonic and myopathic phenotype and no CTG expansion (proximal myotonic myopathy syndrome): a challenge for future molecular studies. *Neuromuscul Disord* 6, 3, pp. 143-150.
- Merritt W. M., Lin Y. G., Han L. Y., Kamat A. A., Spannuth W. A., Schmandt R., Urbauer D., Pennacchio L. A., Cheng J. F., Nick A. M., Deavers M. T., Mourad-Zeidan A., Wang H., Mueller P., Lenburg M. E., Gray J. W., Mok S., Birrer M. J., Lopez-Berestein G., Coleman R. L., Bar-Eli M., Sood A. K. (2008). Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer. *N Engl J Med* 359, 25, pp. 2641-2650.
- Meyer S., Temme C., Wahle E. (2004). Messenger RNA turnover in eukaryotes: pathways and enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 39, 4, pp. 197-216.
- Michalowski S., Miller J. W., Urbinati C. R., Paliouras M., Swanson M. S., Griffith J. (1999). Visualization of double-stranded RNAs from the myotonic dystrophy protein kinase gene and interactions with CUG-binding protein. *Nucleic Acids Res* 27, 17, pp. 3534-3542.
- Michlewski G., Guil S., Semple C. A., Caceres J. F. (2008). Posttranscriptional regulation of miRNAs harboring conserved terminal loops. *Mol Cell* 32, 3, pp. 383-393.
- Michlewski G., Caceres J. F. (2010). Antagonistic role of hnRNP A1 and KSRP in the regulation of let-7a biogenesis. *Nat Struct Mol Biol* 17, 8, pp. 1011-1018.
- Michlewski G., Guil S., Caceres J. F. (2010). Stimulation of pri-miR-18a processing by hnRNP A1. *Adv Exp Med Biol* 700, pp. 28-35.
- Miller J. W., Urbinati C. R., Teng-Umuay P., Stenberg M. G., Byrne B. J., Thornton C. A., Swanson M. S. (2000). Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy. *EMBO J* 19, 17, pp. 4439-4448.

- Minovitsky S., Gee S. L., Schokrpur S., Dubchak I., Conboy J. G. (2005). The splicing regulatory element, UGCAUG, is phylogenetically and spatially conserved in introns that flank tissue-specific alternative exons. *Nucleic Acids Res* 33, 2, pp. 714-724.
- Miragoli M., Salvarani N., Rohr S. (2007). Myofibroblasts induce ectopic activity in cardiac tissue. *Circ Res* 101, 8, pp. 755-758.
- Mishima Y., Abreu-Goodger C., Staton A. A., Stahlhut C., Shou C., Cheng C., Gerstein M., Enright A. J., Giraldez A. J. (2009). Zebrafish miR-1 and miR-133 shape muscle gene expression and regulate sarcomeric actin organization. *Genes Dev* 23, 5, pp. 619-632.
- Mohler P. J., Rivolta I., Napolitano C., LeMaillet G., Lambert S., Priori S. G., Bennett V. (2004). Nav1.5 E1053K mutation causing Brugada syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Nav1.5 on the surface of cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 50, pp. 17533-17538.
- Monckton D. G., Caskey C. T. (1995). Unstable triplet repeat diseases. *Circulation* 91, 2, pp. 513-520.
- Monferrer L., Artero R. (2006). An interspecific functional complementation test in *Drosophila* for introductory genetics laboratory courses. *J Hered* 97, 1, pp. 67-73.
- Mori D., Sasagawa N., Kino Y., Ishiura S. (2008). Quantitative analysis of CUG-BP1 binding to RNA repeats. *J Biochem* 143, 3, pp. 377-383.
- Morkin E. (2000). Control of cardiac myosin heavy chain gene expression. *Microsc Res Tech* 50, 6, pp. 522-531.
- Moseley M. L., Zu T., Ikeda Y., Gao W., Mosemiller A. K., Daughters R. S., Chen G., Weatherspoon M. R., Clark H. B., Ebner T. J., Day J. W., Ranum L. P. (2006). Bidirectional expression of CUG and CAG expansion transcripts and intranuclear polyglutamine inclusions in spinocerebellar ataxia type 8. *Nat Genet* 38, 7, pp. 758-769.
- Moss E. G., Lee R. C., Ambros V. (1997). The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the *lin-4* RNA. *Cell* 88, 5, pp. 637-646.
- Moxley R. T., 3rd, Griggs R. C., Goldblatt D., VanGelder V., Herr B. E., Thiel R. (1978). Decreased insulin sensitivity of forearm muscle in myotonic dystrophy. *J Clin Invest* 62, 4, pp. 857-867.
- Moxley R. T., Griggs R. C., Goldblatt D. (1980). Muscle insulin resistance in myotonic dystrophy: effect of supraphysiologic insulinization. *Neurology* 30, 10, pp. 1077-1083.
- Moxley R. T., Corbett A. J., Minaker K. L., Rowe J. W. (1984). Whole body insulin resistance in myotonic dystrophy. *Ann Neurol* 15, 2, pp. 157-162.
- Moxley R. T., 3rd, Meola G., Udd B., Ricker K. (2002). Report of the 84th ENMC workshop: PROMM (proximal myotonic myopathy) and other myotonic dystrophy-like syndromes: 2nd workshop. 13-15th October, 2000, Loosdrecht, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 12, 3, pp. 306-317.
- Mukhopadhyay D., Houchen C. W., Kennedy S., Dieckgraefe B. K., Anant S. (2003). Coupled mRNA stabilization and translational silencing of cyclooxygenase-2 by a novel RNA binding protein, CUGBP2. *Mol Cell* 11, 1, pp. 113-126.
- Mulders S. A., van den Broek W. J., Wheeler T. M., Croes H. J., van Kuik-Romeijn P., de Kimpe S. J., Furling D., Platenburg G. J., Gourdon G., Thornton C. A., Wieringa B., Wansink D. G. (2009). Triplet-repeat oligonucleotide-mediated reversal of RNA toxicity in myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 33, pp. 13915-13920.
- Murphy L. L., Moon-Grady A. J., Cuneo B. F., Wakai R. T., Yu S., Kunic J. D., Benson D. W., George A. L., Jr. (2012). Developmentally regulated SCN5A splice variant potentiates dysfunction of a novel mutation associated with severe fetal arrhythmia. *Heart Rhythm* 9, 4, pp. 590-597.

~ N ~

- Nakahata S., Kawamoto S. (2005). Tissue-dependent isoforms of mammalian Fox-1 homologs are associated with tissue-specific splicing activities. *Nucleic Acids Res* 33, 7, pp. 2078-2089.
- Nakamori M., Kimura T., Fujimura H., Takahashi M. P., Sakoda S. (2007). Altered mRNA splicing of dystrophin in type 1 myotonic dystrophy. *Muscle Nerve* 36, 2, pp. 251-257.
- Nakamori M., Gourdon G., Thornton C. A. (2011). Stabilization of expanded (CTG)ⁿ(CAG) repeats by antisense oligonucleotides. *Mol Ther* 19, 12, pp. 2222-2227.
- Nam Y., Chen C., Gregory R. I., Chou J. J., Sliz P. (2011). Molecular basis for interaction of let-7 microRNAs with Lin28. *Cell* 147, 5, pp. 1080-1091.
- Nayler O., Cap C., Stamm S. (1998). Human transformer-2-beta gene (SFRS10): complete nucleotide sequence, chromosomal localization, and generation of a tissue-specific isoform. *Genomics* 53, 2, pp. 191-202.
- Nelson P. T., Hatzigeorgiou A. G., Mourelatos Z. (2004). miRNP:mRNA association in polyribosomes in a human neuronal cell line. *RNA* 10, 3, pp. 387-394.
- Neugebauer K. M. (2002). On the importance of being co-transcriptional. *J Cell Sci* 115, Pt 20, pp. 3865-3871.
- Nicastro G., Garcia-Mayoral M. F., Hollingworth D., Kelly G., Martin S. R., Briata P., Gherzi R., Ramos A. (2012). Noncanonical G recognition mediates KSRP regulation of let-7 biogenesis. *Nat Struct Mol Biol* 19, 12, pp. 1282-1286.
- Nicot A. S., Toussaint A., Tosch V., Kretz C., Wallgren-Pettersson C., Iwarsson E., Kingston H., Garnier J. M., Biancalana V., Oldfors A., Mandel J. L., Laporte J. (2007). Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy. *Nat Genet* 39, 9, pp. 1134-1139.
- Nottrott S., Simard M. J., Richter J. D. (2006). Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat Struct Mol Biol* 13, 12, pp. 1108-1114.
- Nyegaard M., Overgaard M. T., Sondergaard M. T., Vranas M., Behr E. R., Hildebrandt L. L., Lund J., Hedley P. L., Camm A. J., Wettrell G., Fosdal I., Christiansen M., Borglum A. D. (2012). Mutations in calmodulin cause ventricular tachycardia and sudden cardiac death. *Am J Hum Genet* 91, 4, pp. 703-712.

~ O ~

- Oana K., Oma Y., Suo S., Takahashi M. P., Nishino I., Takeda S., Ishiura S. (2013). Manumycin A corrects aberrant splicing of Clcn1 in myotonic dystrophy type 1 (DM1) mice. *Sci Rep* 3, pp. 2142.
- Oberle I., Rousseau F., Heitz D., Kretz C., Devys D., Hanauer A., Boue J., Bertheas M. F., Mandel J. L. (1991). Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 252, 5009, pp. 1097-1102.
- O'Brien T. A., Harper P. S. (1984). Course, prognosis and complications of childhood-onset myotonic dystrophy. *Dev Med Child Neurol* 26, 1, pp. 62-67.
- Okamura K., Phillips M. D., Tyler D. M., Duan H., Chou Y. T., Lai E. C. (2008). The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. *Nat Struct Mol Biol* 15, 4, pp. 354-363.

O'Leary D. A., Vargas L., Sharif O., Garcia M. E., Sigal Y. J., Chow S. K., Schmedt C., Caldwell J. S., Brinker A., Engels I. H. (2010). HTS-Compatible Patient-Derived Cell-Based Assay to Identify Small Molecule Modulators of Aberrant Splicing in Myotonic Dystrophy Type 1. *Curr Chem Genomics* 4, pp. 9-18.

Olofsson B. O., Forsberg H., Andersson S., Bjerle P., Henriksson A., Wedin I. (1988). Electrocardiographic findings in myotonic dystrophy. *Br Heart J* 59, 1, pp. 47-52.

Onkal R., Mattis J. H., Fraser S. P., Diss J. K., Shao D., Okuse K., Djamgoz M. B. (2008). Alternative splicing of Nav1.5: an electrophysiological comparison of 'neonatal' and 'adult' isoforms and critical involvement of a lysine residue. *J Cell Physiol* 216, 3, pp. 716-726.

Orengo J. P., Chambon P., Metzger D., Mosier D. R., Snipes G. J., 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, 7, pp. 2646-2651.

Orom U. A., Nielsen F. C., Lund A. H. (2008). MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell* 30, 4, pp. 460-471.

Orr H. T., Zoghbi H. Y. (2007). Trinucleotide repeat disorders. *Annu Rev Neurosci* 30, pp. 575-621.

Osborne R. J., Lin X., Welle S., Sobczak K., O'Rourke J. R., Swanson M. S., Thornton C. A. (2009). Transcriptional and post-transcriptional impact of toxic RNA in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 18, 8, pp. 1471-1481.

Otten A. D., Tapscott S. J. (1995). Triplet repeat expansion in myotonic dystrophy alters the adjacent chromatin structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 12, pp. 5465-5469.

Ou S. W., Kameyama A., Hao L. Y., Horiuchi M., Minobe E., Wang W. Y., Makita N., Kameyama M. (2005). Tetrodotoxin-resistant Na⁺ channels in human neuroblastoma cells are encoded by new variants of Nav1.5/SCN5A. *Eur J Neurosci* 22, 4, pp. 793-801.

Oustanina S., Hause G., Braun T. (2004). Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification. *EMBO J* 23, 16, pp. 3430-3439.

Owada K., Ishikawa K., Toru S., Ishida G., Gomyoda M., Tao O., Noguchi Y., Kitamura K., Kondo I., Noguchi E., Arinami T., Mizusawa H. (2005). A clinical, genetic, and neuropathologic study in a family with 16q-linked ADCA type III. *Neurology* 65, 4, pp. 629-632.

~P~

Paillard L., Legagneux V., Beverley Osborne H. (2003). A functional deadenylation assay identifies human CUG-BP as a deadenylation factor. *Biol Cell* 95, 2, pp. 107-113.

Paillard L., Legagneux V., Maniey D., Osborne H. B. (2002). c-Jun ARE targets mRNA deadenylation by an EDEN-BP (embryo deadenylation element-binding protein)-dependent pathway. *J Biol Chem* 277, 5, pp. 3232-3235.

Pandya-Jones A. (2011). Pre-mRNA splicing during transcription in the mammalian system. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2, 5, pp. 700-717.

Papadatos G., Rangan A. M., Psarianos T., Ung O., Taylor R., Boyages J. (2001). Probability of axillary node involvement in patients with tubular carcinoma of the breast. *Br J Surg* 88, 6, pp. 860-864.

Papadatos G. A., Wallerstein P. M., Head C. E., Ratcliff R., Brady P. A., Benndorf K., Saumarez R. C., Trezise A. E., Huang C. L., Vandenberg J. I., Colledge W. H., Grace A. A. (2002). Slowed conduction and ventricular tachycardia after targeted disruption of the cardiac sodium channel gene *Scn5a*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9, pp. 6210-6215.

- Park J. E., Heo I., Tian Y., Simanshu D. K., Chang H., Jee D., Patel D. J., Kim V. N. (2011). Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature* 475, 7355, pp. 201-205.
- Pascual M., Vicente M., Monferrer L., Artero R. (2006). The Muscleblind family of proteins: an emerging class of regulators of developmentally programmed alternative splicing. *Differentiation* 74, 2-3, pp. 65-80.
- Pasquinelli A. E., Reinhart B. J., Slack F., Martindale M. Q., Kuroda M. I., Maller B., Hayward D. C., Ball E. E., Degan B., Muller P., Spring J., Srinivasan A., Fishman M., Finnerty J., Corbo J., Levine M., Leahy P., Davidson E., Ruvkun G. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408, 6808, pp. 86-89.
- Pasquinelli A. E. (2012). MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet* 13, 4, pp. 271-282.
- Patel A. A., Steitz J. A. (2003). Splicing double: insights from the second spliceosome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 12, pp. 960-970.
- Pawlicki J. M., Steitz J. A. (2010). Nuclear networking fashions pre-messenger RNA and primary microRNA transcripts for function. *Trends Cell Biol* 20, 1, pp. 52-61.
- Pelargonio G., Dello Russo A., Sanna T., De Martino G., Bellocchi F. (2002). Myotonic dystrophy and the heart. *Heart* 88, 6, pp. 665-670.
- Pelletier R., Hamel F., Beaulieu D., Patry L., Haineault C., Tarnopolsky M., Schoser B., Puymirat J. (2009). Absence of a differentiation defect in muscle satellite cells from DM2 patients. *Neurobiol Dis* 36, 1, pp. 181-190.
- Pellizzoni L., Charroux B., Dreyfuss G. (1999). SMN mutants of spinal muscular atrophy patients are defective in binding to snRNP proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 20, pp. 11167-11172.
- Perdoni F., Malatesta M., Cardani R., Giagnacovo M., Mancinelli E., Meola G., Pellicciari C. (2009). RNA/MBNL1-containing foci in myoblast nuclei from patients affected by myotonic dystrophy type 2: an immunocytochemical study. *Eur J Histochem* 53, 3, pp. 151-158.
- Peters L., Meister G. (2007). Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Mol Cell* 26, 5, pp. 611-623.
- Petri H., Vissing J., Witting N., Bundgaard H., Kober L. (2012). Cardiac manifestations of myotonic dystrophy type 1. *Int J Cardiol* 160, 2, pp. 82-88.
- Philips A. V., Timchenko L. T., Cooper T. A. (1998). Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science* 280, 5364, pp. 737-741.
- Phillips M. F., Harper P. S. (1997). Cardiac disease in myotonic dystrophy. *Cardiovasc Res* 33, 1, pp. 13-22.
- Pieretti M., Zhang F. P., Fu Y. H., Warren S. T., Oostra B. A., Caskey C. T., Nelson D. L. (1991). Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell* 66, 4, pp. 817-822.
- Piskounova E., Polyarchou C., Thornton J. E., LaPierre R. J., Pothoulakis C., Hagan J. P., Iliopoulos D., Gregory R. I. (2011). Lin28A and Lin28B inhibit let-7 microRNA biogenesis by distinct mechanisms. *Cell* 147, 5, pp. 1066-1079.
- Polesskaya A., Harel-Bellan A. (2007). [A novel role for an embryonic regulatory protein Lin-28 in adult skeletal muscle differentiation]. *Med Sci (Paris)* 23, 10, pp. 796-797.
- Pollard V. W., Michael W. M., Nakielny S., Siomi M. C., Wang F., Dreyfuss G. (1996). A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway. *Cell* 86, 6, pp. 985-994.
- Polontchouk L., Haefliger J. A., Ebel B., Schaefer T., Stuhlmann D., Mehlhorn U., Kuhn-Regnier F., De Vivie E. R., Dhein S. (2001). Effects of chronic atrial fibrillation on gap junction distribution in human and rat atria. *J*

Am Coll Cardiol 38, 3, pp. 883-891.

Polydorides A. D., Okano H. J., Yang Y. Y., Stefani G., Darnell R. B. (2000). A brain-enriched polypyrimidine tract-binding protein antagonizes the ability of Nova to regulate neuron-specific alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12, pp. 6350-6355.

Ponthier J. L., Schluepen C., Chen W., Lersch R. A., Gee S. L., Hou V. C., Lo A. J., Short S. A., Chasis J. A., Winkelmann J. C., Conboy J. G. (2006). Fox-2 splicing factor binds to a conserved intron motif to promote inclusion of protein 4.1R alternative exon 16. *J Biol Chem* 281, 18, pp. 12468-12474.

Potthoff M. J., Olson E. N., Bassel-Duby R. (2007). Skeletal muscle remodeling. *Curr Opin Rheumatol* 19, 6, pp. 542-549.

Poulos M. G., Batra R., Li M., Yuan Y., Zhang C., Darnell R. B., Swanson M. S. (2013). Progressive impairment of muscle regeneration in muscleblind-like 3 isoform knockout mice. *Hum Mol Genet*, pp.

Probst V., Kyndt F., Potet F., Trochu J. N., Mialet G., Demolombe S., Schott J. J., Baro I., Escande D., Le Marec H. (2003). Haploinsufficiency in combination with aging causes SCN5A-linked hereditary Lenegre disease. *J Am Coll Cardiol* 41, 4, pp. 643-652.

Probst V., Allouis M., Sacher F., Pattier S., Babuty D., Mabo P., Mansourati J., Victor J., Nguyen J. M., Schott J. J., Boisseau P., Escande D., Le Marec H. (2006). Progressive cardiac conduction defect is the prevailing phenotype in carriers of a Brugada syndrome SCN5A mutation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 17, 3, pp. 270-275.

Pushechnikov A., Lee M. M., Childs-Disney J. L., Sobczak K., French J. M., Thornton C. A., Disney M. D. (2009). Rational design of ligands targeting triplet repeating transcripts that cause RNA dominant disease: application to myotonic muscular dystrophy type 1 and spinocerebellar ataxia type 3. *J Am Chem Soc* 131, 28, pp. 9767-9779.

~ Q ~

Qu Y., Isom L. L., Westenbroek R. E., Rogers J. C., Tanada T. N., McCormick K. A., Scheuer T., Catterall W. A. (1995). Modulation of cardiac Na⁺ channel expression in *Xenopus* oocytes by beta 1 subunits. *J Biol Chem* 270, 43, pp. 25696-25701.

Qu Y., Curtis R., Lawson D., Gilbride K., Ge P., DiStefano P. S., Silos-Santiago I., Catterall W. A., Scheuer T. (2001). Differential modulation of sodium channel gating and persistent sodium currents by the beta1, beta2, and beta3 subunits. *Mol Cell Neurosci* 18, 5, pp. 570-580.

~ R ~

Ramachandran V., Chen X. (2008). Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in *Arabidopsis*. *Science* 321, 5895, pp. 1490-1492.

Ranum L. P., Rasmussen P. F., Benzow K. A., Koob M. D., Day J. W. (1998). Genetic mapping of a second myotonic dystrophy locus. *Nat Genet* 19, 2, pp. 196-198.

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

Rattenbacher B., Beisang D., Wiesner D. L., Jeschke J. C., von Hohenberg M., St Louis-Vlasova I. A., Bohjanen P. R. (2010). Analysis of CUGBP1 targets identifies GU-repeat sequences that mediate rapid mRNA decay. *Mol Cell Biol* 30, 16, pp. 3970-3980.

Reardon W., MacMillan J. C., Myring J., Harley H. G., Rundle S. A., Beck L., Harper P. S., Shaw D. J. (1993).

- Cataract and myotonic dystrophy: the role of molecular diagnosis. *Br J Ophthalmol* 77, 9, pp. 579-583.
- Reddy K., Tam M., Bowater R. P., Barber M., Tomlinson M., Nichol Edamura K., Wang Y. H., Pearson C. E. (2011). Determinants of R-loop formation at convergent bidirectionally transcribed trinucleotide repeats. *Nucleic Acids Res* 39, 5, pp. 1749-1762.
- Reinhart B. J., Slack F. J., Basson M., Pasquinelli A. E., Bettinger J. C., Rougvie A. E., Horvitz H. R., Ruvkun G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 6772, pp. 901-906.
- Richards M., Tan S. P., Tan J. H., Chan W. K., Bongso A. (2004). The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE. *Stem Cells* 22, 1, pp. 51-64.
- Ricker K., Koch M. C., Lehmann-Horn F., Pongratz D., Speich N., Reiners K., Schneider C., Moxley R. T., 3rd (1995). Proximal myotonic myopathy. Clinical features of a multisystem disorder similar to myotonic dystrophy. *Arch Neurol* 52, 1, pp. 25-31.
- Ricker K., Grimm T., Koch M. C., Schneider C., Kress W., Reimers C. D., Schulte-Mattler W., Mueller-Myhsok B., Toyka K. V., Mueller C. R. (1999). Linkage of proximal myotonic myopathy to chromosome 3q. *Neurology* 52, 1, pp. 170-171.
- Rigoutsos I. (2009). New tricks for animal microRNAs: targeting of amino acid coding regions at conserved and nonconserved sites. *Cancer Res* 69, 8, pp. 3245-3248.
- Rinaldi F., Terracciano C., Pisani V., Massa R., Loro E., Vergani L., Di Girolamo S., Angelini C., Gourdon G., Novelli G., Botta A. (2012). Aberrant splicing and expression of the non muscle myosin heavy-chain gene MYH14 in DM1 muscle tissues. *Neurobiol Dis* 45, 1, pp. 264-271.
- Roberts R., Timchenko N. A., Miller J. W., Reddy S., Caskey C. T., Swanson M. S., 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, 24, pp. 13221-13226.
- Rodriguez A., Griffiths-Jones S., Ashurst J. L., Bradley A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 14, 10A, pp. 1902-1910.
- Rogart R. B., Regan L. J., Dziekan L. C., Galper J. B. (1983). Identification of two sodium channel subtypes in chick heart and brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 4, pp. 1106-1110.
- Rogart R. B. (1986). High-STX-affinity vs. low-STX-affinity Na⁺ channel subtypes in nerve, heart, and skeletal muscle. *Ann N Y Acad Sci* 479, pp. 402-430.
- Rokita A. G., Anderson M. E. (2012). New therapeutic targets in cardiology: arrhythmias and Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II (CaMKII). *Circulation* 126, 17, pp. 2125-2139.
- Ronnbloom A., Forsberg H., Danielsson A. (1996). Gastrointestinal symptoms in myotonic dystrophy. *Scand J Gastroenterol* 31, 7, pp. 654-657.
- Roof D. J., Hayes A., Adamian M., Chishti A. H., Li T. (1997). Molecular characterization of abLIM, a novel actin-binding and double zinc finger protein. *J Cell Biol* 138, 3, pp. 575-588.
- Rook M. B., Evers M. M., Vos M. A., Bierhuizen M. F. (2012). Biology of cardiac sodium channel Nav1.5 expression. *Cardiovasc Res* 93, 1, pp. 12-23.
- Rosahl T. W., Geppert M., Spillane D., Herz J., Hammer R. E., Malenka R. C., Sudhof T. C. (1993). Short-term synaptic plasticity is altered in mice lacking synapsin I. *Cell* 75, 4, pp. 661-670.
- Rosenberg M. I., Georges S. A., Asawachaicharn A., Analau E., Tapscott S. J. (2006). MyoD inhibits Fstl1 and Utn expression by inducing transcription of miR-206. *J Cell Biol* 175, 1, pp. 77-85.

Rosman N. P., Rebeiz J. J. (1967). The cerebral defect and myopathy in myotonic dystrophy. A comparative clinicopathological study. *Neurology* 17, 11, pp. 1106-1112.

Rossi A. C., Mammucari C., Argentini C., Reggiani C., Schiaffino S. (2010). Two novel/ancient myosins in mammalian skeletal muscles: MYH14/7b and MYH15 are expressed in extraocular muscles and muscle spindles. *J Physiol* 588, Pt 2, pp. 353-364.

Roush S., Slack F. J. (2008). The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol* 18, 10, pp. 505-516.

Rudel R., Ruppersberg J. P., Spittelman W. (1989). Abnormalities of the fast sodium current in myotonic dystrophy, recessive generalized myotonia, and adynamia episodica. *Muscle Nerve* 12, 4, pp. 281-287.

Rudelli R. D., Brown W. T., Wisniewski K., Jenkins E. C., Laure-Kamionowska M., Connell F., Wisniewski H. M. (1985). Adult fragile X syndrome. Clinico-neuropathologic findings. *Acta Neuropathol* 67, 3-4, pp. 289-295.

Rudnik-Schoneborn S., Schaupp M., Lindner A., Kress W., Schulze-Bahr E., Zumhagen S., Elbracht M., Zerres K. (2010). Brugada-like cardiac disease in myotonic dystrophy type 2: report of two unrelated patients. *Eur J Neurol* 18, pp. 18.

Ruggiu M., Herbst R., Kim N., Jevsek M., Fak J. J., Mann M. A., Fischbach G., Burden S. J., Darnell R. B. (2009). Rescuing Z+ agrin splicing in Nova null mice restores synapse formation and unmasks a physiologic defect in motor neuron firing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 9, pp. 3513-3518.

Ryan K. J., Cooper T. A. (1996). Muscle-specific splicing enhancers regulate inclusion of the cardiac troponin T alternative exon in embryonic skeletal muscle. *Mol Cell Biol* 16, 8, pp. 4014-4023.

Rybak A., Fuchs H., Smirnova L., Brandt C., Pohl E. E., Nitsch R., Wulczyn F. G. (2008). A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment. *Nat Cell Biol* 10, 8, pp. 987-993.

~ S ~

Saba S., Vanderbrink B. A., Luciano B., Aronovitz M. J., Berul C. I., Reddy S., Housman D., Mendelsohn M. E., Estes N. A., 3rd, Wang P. J. (1999). Localization of the sites of conduction abnormalities in a mouse model of myotonic dystrophy. *J Cardiovasc Electrophysiol* 10, 9, pp. 1214-1220.

Sabouri L. A., Mahadevan M. S., Narang M., Lee D. S., Surh L. C., Korneluk R. G. (1993). Effect of the myotonic dystrophy (DM) mutation on mRNA levels of the DM gene. *Nat Genet* 4, 3, pp. 233-238.

Saffitz J. E., Kanter H. L., Green K. G., Tolley T. K., Beyer E. C. (1994). Tissue-specific determinants of anisotropic conduction velocity in canine atrial and ventricular myocardium. *Circ Res* 74, 6, pp. 1065-1070.

Sahgal V., Bernes S., Sahgal S., Lischwey C., Subramani V. (1983). Skeletal muscle in preterm infants with congenital myotonic dystrophy. Morphologic and histochemical study. *J Neurol Sci* 59, 1, pp. 47-55.

Sakabe M., Fujiki A., Nishida K., Sugao M., Nagasawa H., Tsuneda T., Mizumaki K., Inoue H. (2004). Enalapril prevents perpetuation of atrial fibrillation by suppressing atrial fibrosis and over-expression of connexin43 in a canine model of atrial pacing-induced left ventricular dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol* 43, 6, pp. 851-859.

Sakharkar M. K., Chow V. T., Kanguane P. (2004). Distributions of exons and introns in the human genome. *In Silico Biol* 4, 4, pp. 387-393.

Salisbury E., Schoser B., Schneider-Gold C., Wang G. L., Huichalaf C., Jin B., Siritto M., Sarkar P., Krahe R., Timchenko N. A., Timchenko L. T. (2009). Expression of RNA CCUG repeats dysregulates translation and degradation of proteins in myotonic dystrophy 2 patients. *Am J Pathol* 175, 2, pp. 748-762.

Sansone V. A., Brignonzi E., Schoser B., Villani S., Gaeta M., De Ambroggi G., Bandera F., De Ambroggi L.,

- Meola G. (2012). The frequency and severity of cardiac involvement in myotonic dystrophy type 2 (DM2): Long-term outcomes. *Int J Cardiol*, pp.
- Sarao R., Gupta S. K., Auld V. J., Dunn R. J. (1991). Developmentally regulated alternative RNA splicing of rat brain sodium channel mRNAs. *Nucleic Acids Res* 19, 20, pp. 5673-5679.
- Sarhan M. F., Van Petegem F., Ahern C. A. (2009). A double tyrosine motif in the cardiac sodium channel domain III-IV linker couples calcium-dependent calmodulin binding to inactivation gating. *J Biol Chem* 284, 48, pp. 33265-33274.
- Sarkar P. S., Appukuttan B., Han J., Ito Y., Ai C., Tsai W., Chai Y., Stout J. T., Reddy S. (2000). Heterozygous loss of Six5 in mice is sufficient to cause ocular cataracts. *Nat Genet* 25, 1, pp. 110-114.
- Sarnat H. B., Silbert S. W. (1976). Maturation arrest of fetal muscle in neonatal myotonic dystrophy. A pathologic study of four cases. *Arch Neurol* 33, 7, pp. 466-474.
- Satin J., Kyle J. W., Chen M., Bell P., Cribbs L. L., Fozzard H. A., Rogart R. B. (1992). A mutant of TTX-resistant cardiac sodium channels with TTX-sensitive properties. *Science* 256, 5060, pp. 1202-1205.
- Sato N., Amino T., Kobayashi K., Asakawa S., Ishiguro T., Tsunemi T., Takahashi M., Matsuura T., Flanigan K. M., Iwasaki S., Ishino F., Saito Y., Murayama S., Yoshida M., Hashizume Y., Takahashi Y., Tsuji S., Shimizu N., Toda T., Ishikawa K., Mizusawa H. (2009). Spinocerebellar ataxia type 31 is associated with "inserted" penta-nucleotide repeats containing (TGGAA)_n. *Am J Hum Genet* 85, 5, pp. 544-557.
- Savkur R. S., Philips A. V., Cooper T. A. (2001). Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat Genet* 29, 1, pp. 40-47.
- Savkur R. S., Philips A. V., Cooper T. A., Dalton J. C., Moseley M. L., Ranum L. P., Day J. W. (2004). Insulin receptor splicing alteration in myotonic dystrophy type 2. *Am J Hum Genet* 74, 6, pp. 1309-1313.
- Scadden A. D. (2005). The RISC subunit Tudor-SN binds to hyper-edited double-stranded RNA and promotes its cleavage. *Nat Struct Mol Biol* 12, 6, pp. 489-496.
- Schaeffer C., Bardoni B., Mandel J. L., Ehresmann B., Ehresmann C., Moine H. (2001). The fragile X mental retardation protein binds specifically to its mRNA via a purine quartet motif. *EMBO J* 20, 17, pp. 4803-4813.
- Schott J. J., Alshinawi C., Kyndt F., Probst V., Hoorntje T. M., Hulsbeek M., Wilde A. A., Escande D., Mannens M. M., Le Marec H. (1999). Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A. *Nat Genet* 23, 1, pp. 20-21.
- Schroder F., Handrock R., Beuckelmann D. J., Hirt S., Hullin R., Priebe L., Schwinger R. H., Weil J., Herzig S. (1998). Increased availability and open probability of single L-type calcium channels from failing compared with nonfailing human ventricle. *Circulation* 98, 10, pp. 969-976.
- Schroder J. M., Adams R. D. (1968). The ultrastructural morphology of the muscle fiber in myotonic dystrophy. *Acta Neuropathol* 10, 3, pp. 218-241.
- Schroeter A., Walzik S., Blechschmidt S., Haufe V., Benndorf K., Zimmer T. (2010). Structure and function of splice variants of the cardiac voltage-gated sodium channel Na(v)1.5. *J Mol Cell Cardiol* 49, 1, pp. 16-24.
- Schwarz D. S., Hutvagner G., Du T., Xu Z., Aronin N., Zamore P. D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 2, pp. 199-208.
- Sebastian S., Faralli H., Yao Z., Rakopoulos P., Pali C., Cao Y., Singh K., Liu Q. C., Chu A., Aziz A., Brand M., Tapscott S. J., Dilworth F. J. (2013). Tissue-specific splicing of a ubiquitously expressed transcription factor is essential for muscle differentiation. *Genes Dev* 27, 11, pp. 1247-1259.
- Sellier C., Rau F., Liu Y., Tassone F., Hukema R. K., Gattoni R., Schneider A., Richard S., Willemsen R., Elliott D. J., Hagerman P. J., Charlet-Berguerand N. (2010). Sam68 sequestration and partial loss of function are associated with splicing alterations in FXTAS patients. *EMBO J* 29, 7, pp. 1248-1261.

- Sellier C., Freyermuth F., Tabet R., Tran T., He F., Ruffenach F., Alunni V., Moine H., Thibault C., Page A., Tassone F., Willemsen R., Disney M. D., Hagerman P. J., Todd P. K., Charlet-Berguerand N. (2013). Sequestration of DROSHA and DGCR8 by expanded CGG RNA repeats alters microRNA processing in fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Cell Rep* 3, 3, pp. 869-880.
- Sen S., Talukdar I., Webster N. J. (2009). SRp20 and CUG-BP1 modulate insulin receptor exon 11 alternative splicing. *Mol Cell Biol* 29, 3, pp. 871-880.
- Sen S., Talukdar I., Liu Y., Tam J., Reddy S., Webster N. J. (2010). Muscleblind-like 1 (Mbnl1) promotes insulin receptor exon 11 inclusion via binding to a downstream evolutionarily conserved intronic enhancer. *J Biol Chem* 285, 33, pp. 25426-25437.
- Sergeant N., Sablonniere B., Schraen-Maschke S., Ghestem A., Maurage C. A., Watzet A., Vermersch P., Delacourte A. (2001). Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 10, 19, pp. 2143-2155.
- Severs N. J., Rothery S., Dupont E., Coppen S. R., Yeh H. I., Ko Y. S., Matsushita T., Kaba R., Halliday D. (2001). Immunocytochemical analysis of connexin expression in the healthy and diseased cardiovascular system. *Microsc Res Tech* 52, 3, pp. 301-322.
- Severs N. J., Coppen S. R., Dupont E., Yeh H. I., Ko Y. S., Matsushita T. (2004). Gap junction alterations in human cardiac disease. *Cardiovasc Res* 62, 2, pp. 368-377.
- Severs N. J., Dupont E., Coppen S. R., Halliday D., Inett E., Baylis D., Rothery S. (2004). Remodelling of gap junctions and connexin expression in heart disease. *Biochim Biophys Acta* 1662, 1-2, pp. 138-148.
- Severs N. J., Bruce A. F., Dupont E., Rothery S. (2008). Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium. *Cardiovasc Res* 80, 1, pp. 9-19.
- Seznec H., Agbulut O., Sergeant N., Savouret C., Ghestem A., Tabti N., Willer J. C., Ourth L., Duros C., Brisson E., Fouquet C., Butler-Browne G., Delacourte A., Junien C., Gourdon G. (2001). Mice transgenic for the human myotonic dystrophy region with expanded CTG repeats display muscular and brain abnormalities. *Hum Mol Genet* 10, 23, pp. 2717-2726.
- Shimizu W., Matsuo K., Kokubo Y., Satomi K., Kurita T., Noda T., Nagaya N., Suyama K., Aihara N., Kamakura S., Inamoto N., Akahoshi M., Tomoike H. (2007). Sex hormone and gender difference--role of testosterone on male predominance in Brugada syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol* 18, 4, pp. 415-421.
- Shiohama A., Sasaki T., Noda S., Minoshima S., Shimizu N. (2003). Molecular cloning and expression analysis of a novel gene DGCR8 located in the DiGeorge syndrome chromosomal region. *Biochem Biophys Res Commun* 304, 1, pp. 184-190.
- Singh R., Valcarcel J. (2005). Building specificity with nonspecific RNA-binding proteins. *Nat Struct Mol Biol* 12, 8, pp. 645-653.
- Siomi M. C., Siomi H. (2003). [Fragile X syndrome, a disease caused by defects in an RNA-binding protein]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 48, 4 Suppl, pp. 480-486.
- Sofola O. A., Jin P., Qin Y., Duan R., Liu H., de Haro M., Nelson D. L., Botas J. (2007). RNA-binding proteins hnRNP A2/B1 and CUGBP1 suppress fragile X CGG premutation repeat-induced neurodegeneration in a Drosophila model of FXTAS. *Neuron* 55, 4, pp. 565-571.
- Song J. J., Liu J., Tolia N. H., Schneiderman J., Smith S. K., Martienssen R. A., Hannon G. J., Joshua-Tor L. (2003). The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol* 10, 12, pp. 1026-1032.
- Sorensen A. B., Sondergaard M. T., Overgaard M. T. (2013). Calmodulin in a Heartbeat. *FEBS J*, pp.
- Spach M. S., Barr R. C. (2000). Effects of cardiac microstructure on propagating electrical waveforms. *Circ Res* 86, 2, pp. E23-28.

- Splawski I., Timothy K. W., Sharpe L. M., Decher N., Kumar P., Bloise R., Napolitano C., Schwartz P. J., Joseph R. M., Condouris K., Tager-Flusberg H., Priori S. G., Sanguinetti M. C., Keating M. T. (2004). Ca(V)_{1.2} calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell* 119, 1, pp. 19-31.
- Spranger M., Spranger S., Tischendorf M., Meinck H. M., Cremer M. (1997). Myotonic dystrophy. The role of large triplet repeat length in the development of mental retardation. *Arch Neurol* 54, 3, pp. 251-254.
- Srivastava D., Cserjesi P., Olson E. N. (1995). A subclass of bHLH proteins required for cardiac morphogenesis. *Science* 270, 5244, pp. 1995-1999.
- Steinbach P., Glaser D., Vogel W., Wolf M., Schwemmler 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, 2, pp. 278-285.
- Stoilov P., Daoud R., Nayler O., Stamm S. (2004). Human tra2-beta1 autoregulates its protein concentration by influencing alternative splicing of its pre-mRNA. *Hum Mol Genet* 13, 5, pp. 509-524.
- Stuhmer W., Conti F., Suzuki H., Wang X. D., Noda M., Yahagi N., Kubo H., Numa S. (1989). Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* 339, 6226, pp. 597-603.
- Suenaga K., Lee K. Y., Nakamori M., Tatsumi Y., Takahashi M. P., Fujimura H., Jinnai K., Yoshikawa H., Du H., Ares M., Jr., Swanson M. S., Kimura T. (2012). Muscleblind-like 1 knockout mice reveal novel splicing defects in the myotonic dystrophy brain. *PLoS One* 7, 3, pp. e33218.
- Sun S., Zhang Z., Fregoso O., Krainer A. R. (2012). Mechanisms of activation and repression by the alternative splicing factors RBFOX1/2. *RNA* 18, 2, pp. 274-283.
- Suominen T., Bachinski L. L., Auvinen S., Hackman P., Baggerly K. A., Angelini C., Peltonen L., Krahe R., Udd B. (2011). Population frequency of myotonic dystrophy: higher than expected frequency of myotonic dystrophy type 2 (DM2) mutation in Finland. *Eur J Hum Genet* 19, 7, pp. 776-782.
- Sureau A., Sauliere J., Expert-Bezancon A., Marie J. (2011). CELF and PTB proteins modulate the inclusion of the beta-tropomyosin exon 6B during myogenic differentiation. *Exp Cell Res* 317, 1, pp. 94-106.
- ~ T ~
- Takahashi N., Sasagawa N., Suzuki K., Ishiura S. (2000). The CUG-binding protein binds specifically to UG dinucleotide repeats in a yeast three-hybrid system. *Biochem Biophys Res Commun* 277, 2, pp. 518-523.
- Tan B. H., Valdivia C. R., Rok B. A., Ye B., Ruwaldt K. M., Tester D. J., Ackerman M. J., Makielski J. C. (2005). Common human SCN5A polymorphisms have altered electrophysiology when expressed in Q1077 splice variants. *Heart Rhythm* 2, 7, pp. 741-747.
- Tan B. H., Valdivia C. R., Song C., Makielski J. C. (2006). Partial expression defect for the SCN5A missense mutation G1406R depends on splice variant background Q1077 and rescue by mexiletine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291, 4, pp. H1822-1828.
- Tang Z. Z., Yarotsky V., Wei L., Sobczak K., Nakamori M., Eichinger K., Moxley R. T., Dirksen R. T., 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, 6, pp. 1312-1324.
- Tang Z. Z., Zheng S., Nikolic J., Black D. L. (2009). Developmental control of CaV1.2 L-type calcium channel splicing by Fox proteins. *Mol Cell Biol* 29, 17, pp. 4757-4765.
- Tarleton J., Kenneson A., Taylor A. K., Crandall K., Fletcher R., Casey R., Hart P. S., Hatton D., Fisch G., Warren S. T. (2002). A single base alteration in the CGG repeat region of FMR1: possible effects on gene

expression and phenotype. *J Med Genet* 39, 3, pp. 196-200.

Tassone F., Hagerman R. J., Loesch D. Z., Lachiewicz A., Taylor A. K., Hagerman P. J. (2000). Fragile X males with unmethylated, full mutation trinucleotide repeat expansions have elevated levels of FMR1 messenger RNA. *Am J Med Genet* 94, 3, pp. 232-236.

Tassone F., Hagerman R. J., Taylor A. K., Gane L. W., Godfrey T. E., Hagerman P. J. (2000). Elevated levels of FMR1 mRNA in carrier males: a new mechanism of involvement in the fragile-X syndrome. *Am J Hum Genet* 66, 1, pp. 6-15.

Tassone F., Hagerman R. J., Garcia-Arocena D., Khandjian E. W., Greco C. M., Hagerman P. J. (2004). Intranuclear inclusions in neural cells with premutation alleles in fragile X associated tremor/ataxia syndrome. *J Med Genet* 41, 4, pp. e43.

Tassone F., Iwahashi C., Hagerman P. J. (2004). FMR1 RNA within the intranuclear inclusions of fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *RNA Biol* 1, 2, pp. 103-105.

Teive H. A., Roa B. B., Raskin S., Fang P., Arruda W. O., Neto Y. C., Gao R., Werneck L. C., Ashizawa T. (2004). Clinical phenotype of Brazilian families with spinocerebellar ataxia 10. *Neurology* 63, 8, pp. 1509-1512.

Teive H. A., Munhoz R. P., Arruda W. O., Lopes-Cendes I., Raskin S., Werneck L. C., Ashizawa T. (2012). Spinocerebellar ataxias: genotype-phenotype correlations in 104 Brazilian families. *Clinics (Sao Paulo)* 67, 5, pp. 443-449.

Teplova M., Patel D. J. (2008). Structural insights into RNA recognition by the alternative-splicing regulator muscleblind-like MBNL1. *Nat Struct Mol Biol* 15, 12, pp. 1343-1351.

Teplova M., Song J., Gaw H. Y., Teplov A., Patel D. J. (2010). Structural insights into RNA recognition by the alternate-splicing regulator CUG-binding protein 1. *Structure* 18, 10, pp. 1364-1377.

Teplova M., Malinina L., Darnell J. C., Song J., Lu M., Abagyan R., Musunuru K., Teplov A., Burley S. K., Darnell R. B., Patel D. J. (2011). Protein-RNA and protein-protein recognition by dual KH1/2 domains of the neuronal splicing factor Nova-1. *Structure* 19, 7, pp. 930-944.

Terenzi F., Ladd A. N. (2010). Conserved developmental alternative splicing of muscleblind-like (MBNL) transcripts regulates MBNL localization and activity. *RNA Biol* 7, 1, pp. 43-55.

Thermann R., Hentze M. W. (2007). *Drosophila* miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation. *Nature* 447, 7146, pp. 875-878.

Thornell L. E., Lindstom M., Renault V., Klein A., Mouly V., Ansved T., Butler-Browne G., Furling D. (2009). Satellite cell dysfunction contributes to the progressive muscle atrophy in myotonic dystrophy type 1. *Neuropathol Appl Neurobiol* 35, 6, pp. 603-613.

Thornton C. A., Wymer J. P., Simmons Z., McClain C., Moxley R. T., 3rd (1997). Expansion of the myotonic dystrophy CTG repeat reduces expression of the flanking DMAHP gene. *Nat Genet* 16, 4, pp. 407-409.

Thornton J. E., Chang H. M., Piskounova E., Gregory R. I. (2012). Lin28-mediated control of let-7 microRNA expression by alternative TUTases Zcchc11 (TUT4) and Zcchc6 (TUT7). *RNA* 18, 10, pp. 1875-1885.

Timchenko L. T., Miller J. W., Timchenko N. A., DeVore D. R., Datar K. V., Lin L., Roberts R., Caskey C. T., Swanson M. S. (1996). Identification of a (CUG)_n triplet repeat RNA-binding protein and its expression in myotonic dystrophy. *Nucleic Acids Res* 24, 22, pp. 4407-4414.

Timchenko L. T., Timchenko N. A., Caskey C. T., Roberts R. (1996). Novel proteins with binding specificity for DNA CTG repeats and RNA CUG repeats: implications for myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 5, 1, pp. 115-121.

Timchenko L. T., Caskey C. T. (1999). Triplet repeat disorders: discussion of molecular mechanisms. *Cell Mol Life Sci* 55, 11, pp. 1432-1447.

- Timchenko N. A., Welm A. L., Lu X., 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, 22, pp. 4517-4525.
- Timchenko N. A., Iakova P., Cai Z. J., Smith J. R., Timchenko L. T. (2001). Molecular basis for impaired muscle differentiation in myotonic dystrophy. *Mol Cell Biol* 21, 20, pp. 6927-6938.
- Timchenko L. T., Iakova P., Welm A. L., Cai Z. J., Timchenko N. A. (2002). Calreticulin interacts with C/EBPalpha and C/EBPbeta mRNAs and represses translation of C/EBP proteins. *Mol Cell Biol* 22, 20, pp. 7242-7257.
- Timchenko N. A., Patel R., Iakova P., Cai Z. J., Quan L., Timchenko L. T. (2004). Overexpression of CUG triplet repeat-binding protein, CUGBP1, in mice inhibits myogenesis. *J Biol Chem* 279, 13, pp. 13129-13139.
- Timchenko N. A., Wang G. L., 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, 21, pp. 20549-20557.
- Timchenko L. T., Salisbury E., Wang G. L., Nguyen H., Albrecht J. H., Hershey J. W., Timchenko N. A. (2006). Age-specific CUGBP1-eIF2 complex increases translation of CCAAT/enhancer-binding protein beta in old liver. *J Biol Chem* 281, 43, pp. 32806-32819.
- Tonegawa S., Brack C., Hozumi N., Pirrotta V. (1978). Organization of immunoglobulin genes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 42 Pt 2, pp. 921-931.
- Toussaint A., Nicot A. S., Mandel J. L., Laporte J. (2007). [Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) cause autosomal recessive centronuclear myopathy]. *Med Sci (Paris)* 23, 12, pp. 1080-1082.
- Trabucchi M., Briata P., Garcia-Mayoral M., Haase A. D., Filipowicz W., Ramos A., Gherzi R., Rosenfeld M. G. (2009). The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of microRNAs. *Nature* 459, 7249, pp. 1010-1014.
- Tran H., Gourrier N., Lemercier-Neuillet C., Dhaenens C. M., Vautrin A., Fernandez-Gomez F. J., Arandel L., Carpentier C., Obriot H., Eddarkaoui S., Delattre L., Van Brussels E., Holt I., Morris G. E., Sablonniere B., Buee L., Charlet-Berguerand N., Schraen-Maschke S., Furling D., Behm-Ansmant I., Branlant C., Caillet-Boudin M. L., Sergeant N. (2011). Analysis of exonic regions involved in nuclear localization, splicing activity, and dimerization of Muscleblind-like-1 isoforms. *J Biol Chem* 286, 18, pp. 16435-16446.
- Trembley J. H., Tatsumi S., Sakashita E., Loyer P., Slaughter C. A., Suzuki H., Endo H., Kidd V. J., Mayeda A. (2005). Activation of pre-mRNA splicing by human RNPS1 is regulated by CK2 phosphorylation. *Mol Cell Biol* 25, 4, pp. 1446-1457.
- Tsuda K., Kuwasako K., Takahashi M., Someya T., Inoue M., Terada T., Kobayashi N., Shirouzu M., Kigawa T., Tanaka A., Sugano S., Guntert P., Muto Y., Yokoyama S. (2009). Structural basis for the sequence-specific RNA-recognition mechanism of human CUG-BP1 RRM3. *Nucleic Acids Res* 37, 15, pp. 5151-5166.
- Tsutsumi A., Kawamata T., Izumi N., Seitz H., Tomari Y. (2011). Recognition of the pre-miRNA structure by *Drosophila* Dicer-1. *Nat Struct Mol Biol* 18, 10, pp. 1153-1158.
- Turner C., Hilton-Jones D. (2010). The myotonic dystrophies: diagnosis and management. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81, 4, pp. 358-367.

~U~

Udd B., Krahe R. (2012). The myotonic dystrophies: molecular, clinical, and therapeutic challenges. *Lancet Neurol* 11, 10, pp. 891-905.

Ueda H., Shimokawa M., Yamamoto M., Kameda N., Mizusawa H., Baba T., Terada N., Fujii Y., Ohno S., Ishiura S., Kobayashi T. (1999). Decreased expression of myotonic dystrophy protein kinase and disorganization of sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle of myotonic dystrophy. *J Neurol Sci* 162, 1, pp. 38-50.

Ule J., Jensen K. B., Ruggiu M., Mele A., Ule A., Darnell R. B. (2003). CLIP identifies Nova-regulated RNA networks in the brain. *Science* 302, 5648, pp. 1212-1215.

Ule J., Jensen K., Mele A., Darnell R. B. (2005). CLIP: a method for identifying protein-RNA interaction sites in living cells. *Methods* 37, 4, pp. 376-386.

Ule J., Ule A., Spencer J., Williams A., Hu J. S., Cline M., Wang H., Clark T., Fraser C., Ruggiu M., Zeeberg B. R., Kane D., Weinstein J. N., Blume J., Darnell R. B. (2005). Nova regulates brain-specific splicing to shape the synapse. *Nat Genet* 37, 8, pp. 844-852.

Ule J., Stefani G., Mele A., Ruggiu M., Wang X., Taneri B., Gaasterland T., Blencowe B. J., Darnell R. B. (2006). An RNA map predicting Nova-dependent splicing regulation. *Nature* 444, 7119, pp. 580-586.

Umeda Y., Ikeda U., Yamamoto J., Fukazawa H., Hayashi Y., Fujikawa H., Shimada K. (1999). Myotonic dystrophy associated with QT prolongation and torsade de pointes. *Clin Cardiol* 22, 2, pp. 136-138.

Underwood J. G., Boutz P. L., Dougherty J. D., Stoilov P., Black D. L. (2005). Homologues of the *Caenorhabditis elegans* Fox-1 protein are neuronal splicing regulators in mammals. *Mol Cell Biol* 25, 22, pp. 10005-10016.



Valcarcel J., Gaur R. K., Singh R., Green M. R. (1996). Interaction of U2AF65 RS region with pre-mRNA branch point and promotion of base pairing with U2 snRNA [corrected]. *Science* 273, 5282, pp. 1706-1709.

Valdivia C. R., Medeiros-Domingo A., Ye B., Shen W. K., Algiers T. J., Ackerman M. J., Makielski J. C. (2010). Loss-of-function mutation of the SCN3B-encoded sodium channel β_3 subunit associated with a case of idiopathic ventricular fibrillation. *Cardiovasc Res* 86, 3, pp. 392-400.

van Bemmelen M. X., Rougier J. S., Gavillet B., Apotheloz F., Daidie D., Tateyama M., Rivolta I., Thomas M. A., Kass R. S., Staub O., Abriel H. (2004). Cardiac voltage-gated sodium channel Nav1.5 is regulated by Nedd4-2 mediated ubiquitination. *Circ Res* 95, 3, pp. 284-291.

Van Dam D., Eriijgers V., Kooy R. F., Willemsen R., Mientjes E., Oostra B. A., De Deyn P. P. (2005). Cognitive decline, neuromotor and behavioural disturbances in a mouse model for fragile-X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Behav Brain Res* 162, 2, pp. 233-239.

van Kempen M. J., Fromaget C., Gros D., Moorman A. F., Lamers W. H. (1991). Spatial distribution of connexin43, the major cardiac gap junction protein, in the developing and adult rat heart. *Circ Res* 68, 6, pp. 1638-1651.

van Rooij E., Sutherland L. B., Qi X., Richardson J. A., Hill J., Olson E. N. (2007). Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science* 316, 5824, pp. 575-579.

van Rooij E., Quiat D., Johnson B. A., Sutherland L. B., Qi X., Richardson J. A., Kelm R. J., Jr., Olson E. N. (2009). A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Dev Cell* 17, 5, pp. 662-673.

van Woerden G. M., Hoebeek F. E., Gao Z., Nagaraja R. Y., Hoogenraad C. C., Kushner S. A., Hansel C., De Zeeuw C. I., Elgersma Y. (2009). betaCaMKII controls the direction of plasticity at parallel fiber-Purkinje cell synapses. *Nat Neurosci* 12, 7, pp. 823-825.

Varani L., Hasegawa M., Spillantini M. G., Smith M. J., Murrell J. R., Ghetti B., Klug A., Goedert M., Varani G. (1999). Structure of tau exon 10 splicing regulatory element RNA and destabilization by mutations of frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14, pp. 8229-8234.

Vasudevan S., Tong Y., Steitz J. A. (2008). Cell-cycle control of microRNA-mediated translation regulation. *Cell Cycle* 7, 11, pp. 1545-1549.

Vatta M., Dumaine R., Varghese G., Richard T. A., Shimizu W., Aihara N., Nademanee K., Brugada R., Brugada J., Veerakul G., Li H., Bowles N. E., Brugada P., Antzelevitch C., Towbin J. A. (2002). Genetic and biophysical basis of sudden unexplained nocturnal death syndrome (SUNDS), a disease allelic to Brugada syndrome. *Hum Mol Genet* 11, 3, pp. 337-345.

Vazquez J. A., Pines J. A., Martul P., De los Rios A., Gatzambide S., Busturia M. A. (1990). Hypothalamic-pituitary-testicular function in 70 patients with myotonic dystrophy. *J Endocrinol Invest* 13, 5, pp. 375-379.

Venables J. P., Klinck R., Koh C., Gervais-Bird J., Bramard A., Inkel L., Durand M., Couture S., Froehlich U., Lapointe E., Lucier J. F., Thibault P., Rancourt C., Tremblay K., Prinos P., Chabot B., Elela S. A. (2009). Cancer-associated regulation of alternative splicing. *Nat Struct Mol Biol* 16, 6, pp. 670-676.

Verkerk A. J., Pieretti M., Sutcliffe J. S., Fu Y. H., Kuhl D. P., Pizzuti A., Reiner O., Richards S., Victoria M. F., Zhang F. P., et al. (1991). Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 65, 5, pp. 905-914.

Vermersch P., Sergeant N., Ruchoux M. M., Hofmann-Radvanyi H., Watez A., Petit H., Dwailly P., Delacourte A. (1996). Specific tau variants in the brains of patients with myotonic dystrophy. *Neurology* 47, 3, pp. 711-717.

Vignaud A., Ferry A., Huguet A., Baraibar M., Trollet C., Hyzewicz J., Butler-Browne G., Puymirat J., Gourdon G., 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, 5, pp. 319-325.

Villace P., Marion R. M., Ortin J. (2004). The composition of Staufen-containing RNA granules from human cells indicates their role in the regulated transport and translation of messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 32, 8, pp. 2411-2420.

Viswanathan S. R., Daley G. Q., Gregory R. I. (2008). Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science* 320, 5872, pp. 97-100.

Viswanathan S. R., Powers J. T., Einhorn W., Hoshida Y., Ng T. L., Toffanin S., O'Sullivan M., Lu J., Phillips L. A., Lockhart V. L., Shah S. P., Tanwar P. S., Mermel C. H., Beroukhi R., Azam M., Teixeira J., Meyerson M., Hughes T. P., Llovet J. M., Radich J., Mullighan C. G., Golub T. R., Sorensen P. H., Daley G. Q. (2009). Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. *Nat Genet* 41, 7, pp. 843-848.

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., Bohjanen P. R. (2008). Conserved GU-rich elements mediate mRNA decay by binding to CUG-binding protein 1. *Mol Cell* 29, 2, pp. 263-270.

Vora T., Corry B., Chung S. H. (2005). A model of sodium channels. *Biochim Biophys Acta* 1668, 1, pp. 106-116.

~W~

Wahbi K., Meune C., Becane H. M., Laforet P., Bassez G., Lazarus A., Radvanyi-Hoffman H., Eymard B., Duboc D. (2009). Left ventricular dysfunction and cardiac arrhythmias are frequent in type 2 myotonic dystrophy: a case control study. *Neuromuscul Disord* 19, 7, pp. 468-472.

- Wahl M. C., Will C. L., Luhrmann R. (2009). The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* 136, 4, pp. 701-718.
- Walzik S., Schroeter A., Benndorf K., Zimmer T. (2011). Alternative splicing of the cardiac sodium channel creates multiple variants of mutant T1620K channels. *PLoS One* 6, 4, pp. e19188.
- Wang D. W., Desai R. R., Crotti L., Arnestad M., Insolia R., Pedrazzini M., Ferrandi C., Vege A., Rognum T., Schwartz P. J., George A. L., Jr. (2007). Cardiac sodium channel dysfunction in sudden infant death syndrome. *Circulation* 115, 3, pp. 368-376.
- Wang G. S., Kearney D. L., De Biasi M., Taffet G., 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, 10, pp. 2802-2811.
- Wang X., Xu R., Abernathy G., Taylor J., Alzghoul M. B., Hannon K., Hockerman G. H., Pond A. L. (2008). Kv11.1 channel subunit composition includes MinK and varies developmentally in mouse cardiac muscle. *Dev Dyn* 237, 9, pp. 2430-2437.
- Wang Y., Li L., Cuculich P. S., Rudy Y. (2008). Electrocardiographic imaging of ventricular bigeminy in a human subject. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 1, 1, pp. 74-75.
- Wang G. S., Kuyumcu-Martinez M. N., Sarma S., Mathur N., Wehrens X. H., Cooper T. A. (2009). PKC inhibition ameliorates the cardiac phenotype in a mouse model of myotonic dystrophy type 1. *J Clin Invest* 119, 12, pp. 3797-3806.
- Wang J., Ou S. W., Wang Y. J., Kameyama M., Kameyama A., Zong Z. H. (2009). Analysis of four novel variants of Nav1.5/SCN5A cloned from the brain. *Neurosci Res* 64, 4, pp. 339-347.
- 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., Lecuyer E., Burge C. B. (2012). Transcriptome-wide regulation of pre-mRNA splicing and mRNA localization by muscleblind proteins. *Cell* 150, 4, pp. 710-724.
- Ward A. J., Rimer M., Killian J. M., Dowling J. J., Cooper T. A. (2010). CUGBP1 overexpression in mouse skeletal muscle reproduces features of myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 19, 18, pp. 3614-3622.
- Warf M. B., Berglund J. A. (2007). MBNL binds similar RNA structures in the CUG repeats of myotonic dystrophy and its pre-mRNA substrate cardiac troponin T. *RNA* 13, 12, pp. 2238-2251.
- Warf M. B., Diegel J. V., von Hippel P. H., Berglund J. A. (2009). The protein factors MBNL1 and U2AF65 bind alternative RNA structures to regulate splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 23, pp. 9203-9208.
- Warf M. B., Nakamori M., Matthys C. M., Thornton C. A., Berglund J. A. (2009). Pentamidine reverses the splicing defects associated with myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 44, pp. 18551-18556.
- Warf M. B., Berglund J. A. (2010). Role of RNA structure in regulating pre-mRNA splicing. *Trends Biochem Sci* 35, 3, pp. 169-178.
- Watanabe H., Koopmann T. T., Le Scouarnec S., Yang T., Ingram C. R., Schott J. J., Demolombe S., Probst V., Anselme F., Escande D., Wiesfeld A. C., Pfeufer A., Kaab S., Wichmann H. E., Hasdemir C., Aizawa Y., Wilde A. A., Roden D. M., Bezzina C. R. (2008). Sodium channel beta1 subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans. *J Clin Invest* 118, 6, pp. 2260-2268.
- Watanabe H., Darbar D., Kaiser D. W., Jiramongkolchai K., Chopra S., Donahue B. S., Kannankeril P. J., Roden D. M. (2009). Mutations in sodium channel beta1- and beta2-subunits associated with atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2, 3, pp. 268-275.
- Wetzel U., Boldt A., Lauschke J., Weigl J., Schirdewahn P., Dorszewski A., Doll N., Hindricks G., Dhein S., Kottkamp H. (2005). Expression of connexins 40 and 43 in human left atrium in atrial fibrillation of different aetiologies. *Heart* 91, 2, pp. 166-170.
- Wheeler T. M., Lueck J. D., Swanson M. S., Dirksen R. T., Thornton C. A. (2007). Correction of CIC-1 splicing

eliminates chloride channelopathy and myotonia in mouse models of myotonic dystrophy. *J Clin Invest* 117, 12, pp. 3952-3957.

Wheeler T. M., Sobczak K., Lueck J. D., Osborne R. J., Lin X., Dirksen R. T., Thornton C. A. (2009). Reversal of RNA dominance by displacement of protein sequestered on triplet repeat RNA. *Science* 325, 5938, pp. 336-339.

Wheeler T. M., Leger A. J., Pandey S. K., MacLeod A. R., Nakamori M., Cheng S. H., Wentworth B. M., Bennett C. F., Thornton C. A. (2012). Targeting nuclear RNA for in vivo correction of myotonic dystrophy. *Nature* 488, 7409, pp. 111-115.

White M. C., Gao R., Xu W., Mandal S. M., Lim J. G., Hazra T. K., Wakamiya M., Edwards S. F., Raskin S., Teive H. A., Zoghbi H. Y., Sarkar P. S., Ashizawa T. (2010). Inactivation of hnRNP K by expanded intronic AUUCU repeat induces apoptosis via translocation of PKCdelta to mitochondria in spinocerebellar ataxia 10. *PLoS Genet* 6, 6, pp. e1000984.

White M., Xia G., Gao R., Wakamiya M., Sarkar P. S., McFarland K., Ashizawa T. (2012). Transgenic mice with SCA10 pentanucleotide repeats show motor phenotype and susceptibility to seizure: a toxic RNA gain-of-function model. *J Neurosci Res* 90, 3, pp. 706-714.

Wightman B., Ha I., Ruvkun G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 5, pp. 855-862.

Wilburn B., Rudnicki D. D., Zhao J., Weitz T. M., Cheng Y., Gu X., Greiner E., Park C. S., Wang N., Sopher B. L., La Spada A. R., Osmand A., Margolis R. L., Sun Y. E., Yang X. W. (2011). An antisense CAG repeat transcript at JPH3 locus mediates expanded polyglutamine protein toxicity in Huntington's disease-like 2 mice. *Neuron* 70, 3, pp. 427-440.

Wilde A. A., Brugada R. (2011). Phenotypical manifestations of mutations in the genes encoding subunits of the cardiac sodium channel. *Circ Res* 108, 7, pp. 884-897.

Wilson K. D., Hu S., Venkatasubrahmanyam S., Fu J. D., Sun N., Abilez O. J., Baugh J. J., Jia F., Ghosh Z., Li R. A., Butte A. J., Wu J. C. (2010). Dynamic microRNA expression programs during cardiac differentiation of human embryonic stem cells: role for miR-499. *Circ Cardiovasc Genet* 3, 5, pp. 426-435.

Wu J. Y., Maniatis T. (1993). Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing. *Cell* 75, 6, pp. 1061-1070.

Wu L., Belasco J. G. (2008). Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 29, 1, pp. 1-7.

Wu H., Sun S., Tu K., Gao Y., Xie B., Krainer A. R., Zhu J. (2010). A splicing-independent function of SF2/ASF in microRNA processing. *Mol Cell* 38, 1, pp. 67-77.



Xi Y., Ai T., De Lange E., Li Z., Wu G., Brunelli L., Kyle W. B., Turker I., Cheng J., Ackerman M. J., Kimura A., Weiss J. N., Qu Z., Kim J. J., Faulkner G., Vatta M. (2012). Loss of function of hNav1.5 by a ZASP1 mutation associated with intraventricular conduction disturbances in left ventricular noncompaction. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 5, 5, pp. 1017-1026.

Xi Z., Zinman L., Moreno D., Schymick J., Liang Y., Sato C., Zheng Y., Ghani M., Dib S., Keith J., Robertson J., Rogaeva E. (2013). Hypermethylation of the CpG Island Near the GC Repeat in ALS with a C9orf72 Expansion. *Am J Hum Genet*, pp.

Xu H. F., Ding Y. J., Shen Y. W., Xue A. M., Xu H. M., Luo C. L., Li B. X., Liu Y. L., Zhao Z. Q. (2012). MicroRNA-1 represses Cx43 expression in viral myocarditis. *Mol Cell Biochem* 362, 1-2, pp. 141-148.

Xue Y., Zhou Y., Wu T., Zhu T., Ji X., Kwon Y. S., Zhang C., Yeo G., Black D. L., Sun H., Fu X. D., Zhang Y. (2009). Genome-wide analysis of PTB-RNA interactions reveals a strategy used by the general splicing repressor to modulate exon inclusion or skipping. *Mol Cell* 36, 6, pp. 996-1006.

~Y~

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., Mahadevan M. S. (2008). RNA toxicity in myotonic muscular dystrophy induces NKX2-5 expression. *Nat Genet* 40, 1, pp. 61-68.

Yamashita A., Chang T. C., Yamashita Y., Zhu W., Zhong Z., Chen C. Y., Shyu A. B. (2005). Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* 12, 12, pp. 1054-1063.

Yamashita Y., Matsuura T., Shinmi J., Amakusa Y., Masuda A., Ito M., Kinoshita M., Furuya H., Abe K., Ibi T., Sahashi K., Ohno K. (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, 6, pp. 368-374.

Yang Y. Y., Yin G. L., Darnell R. B. (1998). The neuronal RNA-binding protein Nova-2 is implicated as the autoantigen targeted in POMA patients with dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 22, pp. 13254-13259.

Yang D. H., Moss E. G. (2003). Temporally regulated expression of Lin-28 in diverse tissues of the developing mouse. *Gene Expr Patterns* 3, 6, pp. 719-726.

Yang B., Lin H., Xiao J., Lu Y., Luo X., Li B., Zhang Y., Xu C., Bai Y., Wang H., Chen G., Wang Z. (2007). The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat Med* 13, 4, pp. 486-491.

Yang G., Huang S. C., Wu J. Y., Benz E. J., Jr. (2008). Regulated Fox-2 isoform expression mediates protein 4.1R splicing during erythroid differentiation. *Blood* 111, 1, pp. 392-401.

Yang H., Sun C., Li H., Zhang A., Xue X., Wang D., Shu J., Cui C. (2008). [Identification of a novel KCNH2 mutation in a family with congenital long QT syndrome and prediction of the secondary structure of its encoding protein]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 25, 6, pp. 704-707.

Yeo G. W., Coufal N. G., Liang T. Y., Peng G. E., Fu X. D., Gage F. H. (2009). An RNA code for the FOX2 splicing regulator revealed by mapping RNA-protein interactions in stem cells. *Nat Struct Mol Biol* 16, 2, pp. 130-137.

Yi R., Qin Y., Macara I. G., Cullen B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17, 24, pp. 3011-3016.

Young P. J., DiDonato C. J., Hu D., Kothary R., Androphy E. J., Lorson C. L. (2002). SRp30c-dependent stimulation of survival motor neuron (SMN) exon 7 inclusion is facilitated by a direct interaction with hTra2 beta 1. *Hum Mol Genet* 11, 5, pp. 577-587.

Yu J., Vodyanik M. A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J. L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G. A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin, II, Thomson J. A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 5858, pp. 1917-1920.

Yuan Y., Compton S. A., Sobczak K., Stenberg M. G., Thornton C. A., Griffith J. D., Swanson M. S. (2007). Muscleblind-like 1 interacts with RNA hairpins in splicing target and pathogenic RNAs. *Nucleic Acids Res* 35, 16, pp. 5474-5486.

~Z~

- Zdanowicz A., Thermann R., Kowalska J., Jemielity J., Duncan K., Preiss T., Darzynkiewicz E., Hentze M. W. (2009). Drosophila miR2 primarily targets the m7GpppN cap structure for translational repression. *Mol Cell* 35, 6, pp. 881-888.
- Zekri L., Kuzuoglu-Ozturk D., Izaurrealde E. (2013). GW182 proteins cause PABP dissociation from silenced miRNA targets in the absence of deadenylation. *EMBO J* 32, 7, pp. 1052-1065.
- Zeng Y., Cullen B. R. (2004). Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res* 32, 16, pp. 4776-4785.
- Zhang C., Zhang Z., Castle J., Sun S., Johnson J., Krainer A. R., Zhang M. Q. (2008). Defining the regulatory network of the tissue-specific splicing factors Fox-1 and Fox-2. *Genes Dev* 22, 18, pp. 2550-2563.
- Zhang D., Li X., Chen C., Li Y., Zhao L., Jing Y., Liu W., Wang X., Zhang Y., Xia H., Chang Y., Gao X., Yan J., Ying H. (2012). Attenuation of p38-mediated miR-1/133 expression facilitates myoblast proliferation during the early stage of muscle regeneration. *PLoS One* 7, 7, pp. 24.
- Zhang Q. S., Manche L., Xu R. M., Krainer A. R. (2006). hnRNP A1 associates with telomere ends and stimulates telomerase activity. *RNA* 12, 6, pp. 1116-1128.
- Zhang X., Wan G., Berger F. G., He X., Lu X. (2011). The ATM kinase induces microRNA biogenesis in the DNA damage response. *Mol Cell* 41, 4, pp. 371-383.
- Zhao Y., Ransom J. F., Li A., Vedantham V., von Drehle M., Muth A. N., Tsuchihashi T., McManus M. T., Schwartz R. J., Srivastava D. (2007). Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell* 129, 2, pp. 303-317.
- Zhao Y., Samal E., Srivastava D. (2005). Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* 436, 7048, pp. 214-220.
- Zheng Y., Miskimins W. K. (2011). CUG-binding protein represses translation of p27Kip1 mRNA through its internal ribosomal entry site. *RNA Biol* 8, 3, pp. 365-371.
- Zhou J., Shin H. G., Yi J., Shen W., Williams C. P., Murray K. T. (2002). Phosphorylation and putative ER retention signals are required for protein kinase A-mediated potentiation of cardiac sodium current. *Circ Res* 91, 6, pp. 540-546.
- Zhou J., Ng S. B., Chng W. J. (2013). LIN28/LIN28B: an emerging oncogenic driver in cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 45, 5, pp. 973-978.
- Zhu J., Mayeda A., Krainer A. R. (2001). Exon identity established through differential antagonism between exonic splicing silencer-bound hnRNP A1 and enhancer-bound SR proteins. *Mol Cell* 8, 6, pp. 1351-1361.
- Zimmer T., Surber R. (2008). SCN5A channelopathies--an update on mutations and mechanisms. *Prog Biophys Mol Biol* 98, 2-3, pp. 120-136.
- Zu L., Figueroa K. P., Grewal R., Pulst S. M. (1999). Mapping of a new autosomal dominant spinocerebellar ataxia to chromosome 22. *Am J Hum Genet* 64, 2, pp. 594-599.
- 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., Nan Z., Forster C., Low W. C., Schoser B., Somia N. V., Clark H. B., Schmechel S., Bitterman P. B., Gourdon G., Swanson M. S., Moseley M., Ranum L. P. (2011). Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 1, pp. 260-265.
- Zubovic L., Baralle M., Baralle F. E. (2012). Mutually exclusive splicing regulates the Nav 1.6 sodium channel function through a combinatorial mechanism that involves three distinct splicing regulatory elements and their ligands. *Nucleic Acids Res* 40, 13, pp. 6255-6269.

Etudes des bases moléculaires à l'origine des troubles cardiaques des patients atteints de Dystrophies Myotoniques.

Les dystrophies myotoniques (DM) sont les formes les plus communes de dystrophies musculaires chez l'adulte. Ces maladies sont caractérisées par de nombreux symptômes, et notamment des défauts de conduction et du rythme cardiaques pouvant s'avérer fatals. Les dystrophies myotoniques sont des maladies à gain de fonction d'ARN dont le modèle proposé fait intervenir une séquestration du facteur d'épissage alternatif MBNL1 et une augmentation de la protéine CUGBP1. La dérégulation de ces deux protéines conduit à des altérations spécifiques de l'épissage alternatif, dont certaines sont associées aux symptômes des patients DM. Ainsi, l'altération de l'épissage alternatif du canal chlore (*CLCN1*) est responsable de la myotonie, tandis que celles de l'amphyphisine 2 (*BINI*) et du canal calcique squelettique $Ca_v1.1$ (*CACNA1S*) sont associées à la faiblesse musculaire.

Cependant, les causes moléculaires à l'origine des atteints cardiaques des patients DM sont inconnues. C'est pourquoi, durant ma thèse, nous avons identifié par des approches de puce à ADN et de séquençage à haut débit de nouveaux ARNs codants et non codants pouvant être dérégulés dans le cœur des patients DM.

Parmi ces différents ARNs, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'ARNm *SCN5A* et au miARN, miR-1. En effet, le rôle essentiel des miARNs dans le développement et le fonctionnement de différents tissus, dont le cœur, nous a conduits à orienter nos recherches sur les mécanismes moléculaires et les conséquences physiologiques de la dérégulation de miR-1. Nous avons ainsi montré une diminution de l'expression de miR-1 dans des échantillons de cœur de patients DM1 et DM2. Nous avons également montré que la séquestration de MBNL1 par les répétitions CUG inhibe la maturation de miR-1. En effet, MBNL1 protège miR-1 de l'inhibition de sa biogénèse par la voie LIN28/TUT-4. Nous avons ainsi mis en évidence une nouvelle fonction de MBNL1, comme régulateur de la maturation de miARN spécifiques. Enfin, nous avons observé que la diminution de miR-1 dans le cœur des patients DM entraîne une augmentation de deux protéines, essentielles au fonctionnement cardiaque, la connexine 43 (*GJA1*) et le canal calcique $Ca_v1.2$ (*CACNA1C*), pouvant participer aux troubles cardiaques des patients DM.

Puis, je me suis intéressée à l'épissage alternatif des exons 6A/6B du principal canal sodique cardiaque, *SCN5A*. Ce gène est particulièrement intéressant pour l'étude des DM car des mutations de *SCN5A* sont associées à des troubles de la conduction et du rythme cardiaques, qui s'apparentent aux signes cliniques observés chez les patients DM. J'ai confirmé l'altération de l'épissage des exons 6A et 6B dans des échantillons de cœurs de patients CDM, DM1 et DM2. Nous avons alors montré que l'épissage alternatif de ces exons mutuellement exclusifs est régulé par MBNL1. En outre, l'inclusion anormale de l'exon 6A fœtal à la place de l'exon 6B adulte conduit à une diminution de l'activité de *SCN5A*, s'apparentant à une perte de fonction de ce canal. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'expression de *SCN5A* contenant l'exon 6A chez les patients DM pourrait contribuer à l'apparition des défauts de conduction et d'arythmies cardiaques observés chez ces patients.

En conclusion, durant ma thèse, nous avons mis en évidence une dérégulation spécifique de la maturation d'un miARN, miR-1, ainsi que de l'épissage alternatif de nombreux ARNm, dont *SCN5A*, dans des échantillons de cœurs de patients DM. Nous proposons que ces altérations puissent jouer un rôle dans l'apparition des symptômes cardiaques chez les patients DM.

Etudes des bases moléculaires à l'origine des troubles cardiaques des patients atteints de Dystrophies Myotoniques

Résumé

Les dystrophies myotoniques sont les formes les plus communes des dystrophies musculaires chez l'adulte, caractérisées par de nombreux symptômes tels que les défauts de conduction et de rythme cardiaques fatals chez 30% des patients DM, dont les causes moléculaires sont inconnues. Les DM sont des maladies à gain de fonction d'ARN faisant intervenir une séquestration des facteurs d'épissage alternatif MBNL par des ARNs contenant de longues répétitions (C)CUG, conduisant à des altérations de l'épissage alternatif. Par des approches de puces à ADN, nous avons identifié et confirmé la diminution spécifique de miR-1, conduisant à la dérégulation de l'expression de la connexine 43 et du canal à calcium cardiaque $Ca_v1.2$ dans le cœur de patients DM. Par séquençage à haut débit d'ARNs de cœur de patients atteints ou non de DM, j'ai montré la dérégulation de plus d'une centaine d'épissages alternatifs dont celui des exons 6A/6B du principal canal à sodium cardiaque, *SCN5A*. J'ai montré que cet épissage est régulé par MBNL, et j'ai confirmé l'inclusion anormale de l'exon 6A à la place de l'exon 6B dans l'ARNm *SCN5A* conduisant à une diminution de l'activité du canal *SCN5A*, pouvant expliquer les défauts cardiaques des patients DM.

Mots-clés : Dystrophies Myotoniques, troubles de la conduction cardiaque, MBNL, *SCN5A*, miR-1

Résumé en anglais

The myotonic dystrophies (DM) are the most common forms of muscular dystrophies in adults, characterized by several symptoms such as cardiac conduction defects and arrhythmias, fatals in 30% of DM patients. The molecular causes of DM cardiac defects are unknown. The RNA gain of function involving a sequestration of MBNL, alternatives splicing factors by large RNAs containing large (C)CUG, leading to alternative splicing defects. By microarray analysis, we identified and confirmed the specific decrease of miR-1, leading to misregulation of connexin 43 and cardiac calcium channel $Ca_v1.2$ expressions in DM patients' hearts. By RNA-Sequencing of samples from DM and non-DM patients hearts, we have shown misregulation of more than 100 alternative splicing, such as the most interesting splicing alteration which is that of exons 6A/6B of *SCN5A*, the main cardiac sodium channel. We have shown this splicing is regulated by MBNL, and we have confirmed the abnormal inclusion of exon 6A instead of exon 6B in *SCN5A* mRNA in heart of DM patients, resulting in the decrease of *SCN5A* channel activity. This decrease could explain the cardiac defects of DM patients.

Keywords: Myotonic Dystrophies, cardiac defects, MBNL, *SCN5A*, miR-1