



HAL
open science

Les rôles de PABPN1 dans la dystrophie musculaire oculopharyngée

Pierre Klein

► **To cite this version:**

Pierre Klein. Les rôles de PABPN1 dans la dystrophie musculaire oculopharyngée. Génétique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066217 . tel-01441859

HAL Id: tel-01441859

<https://theses.hal.science/tel-01441859>

Submitted on 20 Jan 2017

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

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

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale 515 - Complexité du Vivant

Centre de Recherche en Myologie - U974

Les rôles de PABPN1 dans la dystrophie musculaire oculopharyngée

Par Pierre KLEIN

Thèse de doctorat en sciences du vivant

Dirigée par Capucine Trollet et Vincent Mouly

Présentée et soutenue publiquement le 20 Septembre 2016

Devant un jury composé de :

Mr Didier Auboeuf, Directeur de recherche, Inserm, Lyon

Mme Ana Buj-Bello, Chargée de recherche, Inserm, Evry

Mr Nicolas Levy, PU-PH, Marseille

Mme Dominique Weil, Directeur de recherche, CNRS, Paris

Mme Capucine Trollet, Chargée de recherche, Inserm, Paris

Mr Vincent Mouly, Directeur de recherche, CNRS, Paris

Rapporteur

Rapporteuse

Examineur

Examinatrice

Directrice de thèse

Directeur de thèse



A ma mère,

Remerciements

Je souhaiterais commencer par remercier chaleureusement Mme Anna Buj Bello et Mr Dider Auboeuf d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Je souhaite aussi remercier Mme Dominique Weil ainsi que Mr Nicolas Lévy d'avoir accepté d'en être examinateurs.

Ce travail a été financé par la bourse de Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche de l'Université Pierre et Marie Curie.

Mon début au laboratoire a commencé en 2012 en tant qu'ingénieur d'étude dans l'équipe de Gillian Butler-Browne et Vincent Mouly au sein du groupe de Capucine Trollet. Je tiens à vous remercier tous les trois pour ce poste et aussi d'avoir suffisamment cru en moi pour me permettre de réaliser cette thèse.

Vincent, merci d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse. Merci aussi pour le temps que tu as passé à assister à mes présentations orales et pour les corrections de ce manuscrit. J'ai également beaucoup apprécié aller aux congrès SFTCG avec toi.

Capucine je ne vous remercierai jamais assez, et Anne et toi, de m'avoir choisi après cet entretien dans la cuisine de Babinski, il y a quatre ans déjà. Je suis arrivé dans ton groupe qui commençait seulement à voir le jour. J'ai fait partie des premiers et j'en suis très fier. J'ai adoré travailler sous ta responsabilité durant toutes ces années. C'était un réel plaisir de parler manip avec toi sur Skype et ca va réellement me manquer. Le bonheur que tu as à faire de la science est contagieux. Tu as été une source d'inspiration mais aussi de stimulation scientifique exceptionnelle. Ta réactivité dépasse l'entendement. J'ai peur de m'y être trop habitué, comment je vais faire maintenant ?! Merci pour cette thèse et pour toutes les réussites qui vont avec (le postdoc à NY, les articles, les prix), pour ces super congrès auxquels tu m'as permis d'assister mais aussi pour m'avoir donné l'occasion d'aller pendant quelques mois à Londres. Sans toi je n'en serais jamais arrivé là et je me sens prêt à enlever les petites roues maintenant. Un énorme Merci pour tout cela.

Un grand merci à toute l'équipe OPMD. Martine, merci pour ton aide dans la réalisation de cette thèse. Ton aide a été extrêmement précieuse. Surtout merci pour ta joie de vivre au quotidien. J'ai passé de très bons moments à chercher des primers avec toi. Merci aussi Teresa d'avoir partagé un bout de cette aventure.

Je souhaiterais remercier aussi tous les nouveaux arrivés (enfin plus si nouveaux que ça) : Gonzalo, Julien (je te souhaite toute la réussite que tu mérites dans ta nouvelle aventure), Allison, Fanny, Marie-Cécilie. Cela aura été compliqué de tous vous réunir pour une photo mais ça en valait le coup. Ca va me manquer de ne plus travailler avec vous. Fanny je te laisse prendre la relève de la thèse et de l'enseignement. Je suis sûr que tu vas très bien t'en sortir.

Elisa merci à toi d'avoir partagé cette aventure et le bureau avec moi. Merci pour ta gentillesse, pour nos discussions, de me faire partager l'aventure de ton appartement mais aussi de comprendre mon côté parfois un peu hypochondriaque. Merci pour ton soutien qui a été particulièrement nécessaire ces derniers mois. Sans toi je ne sais pas si j'en serais arrivé au bout.

Un énorme merci à tous les membres de l'équipe de Gill et Vincent (Anne, Kamel, Jean Thomas, Mona), mais aussi à tous les DM1 (Denis, Joëlle, Arnaud, Ludo, Micaela, Magdalena, Damily, Fredo). J'ai passé de merveilleux moments avec vous. Merci à ceux qui ont partagé la pièce de manip avec moi. Ca fût très enrichissant à tous les points de vue. Promis j'essaierai de soigner ma cleptomanie. Mais avouez que c'était utile car au final vous saviez où chercher les marqueurs. Ludo et Micaela merci pour cette super soirée du congrès SFM à Lyon.

Fredo au final on est arrivé quasiment au même moment et on a partagé le même labo toutes ces années. Merci pour ces bons moments, toutes tes blagues et les discussions clonage. Vive le monde de l'ARN et à bientôt sur Londres.

D'une manière plus générale merci à toutes les personnes de Babinski. Vous êtes trop nombreuses pour que je puisse toutes vous citer mais vous êtes chères à mon cœur. Merci pour toutes ces années passées ensemble et tous les super échanges qu'on a eu d'un point de vue professionnel et personnel.

Je tiens aussi à remercier tous ceux qui ont quitté le labo et avec qui j'ai adoré partager une partie de cette aventure, voir le bureau pour certains (Stéphanie, Aurore, Cyril). En parlant de bureau merci aussi à toi Hala de l'avoir partagé avec moi depuis le début. Une petite pensée aux anciens doctorants : Denis, Laetitia, Maxime, Esma. C'est à mon tour maintenant. Laetitia rendez-vous à l'âge d'or. J'ai du temps maintenant.

Je souhaiterais dire un grand merci à George Dickson de m'avoir accueilli dans son laboratoire à Londres. Merci à toute son équipe pour leur extrême gentillesse et leur patience avec mon anglais plus qu'approximatif et aussi pour tout ce que j'ai appris durant ces quelques mois. Merci pour notre collaboration et le super article qui en est sorti. Merci à Lukas, Denis, Golnoush, Marc, Aaron et Jade de m'avoir montré Royal Holloway, la Main Street d'Egham mais surtout Londres. J'ai passé quatre mois super. J'espère vous revoir rapidement.

Merci à Martine Simonellig et à Aymeric pour cette fructueuse collaboration. Merci de m'avoir accueilli dans votre laboratoire à Montpellier et de m'avoir appris la technique du PAT. Martine merci d'avoir fait partie de mon jury de mi-thèse. Merci aussi à Caroline Le Guiner et Cécile Hautmaitre pour en avoir fait partie aussi.

D'un point de vue plus personnel :

Merci Matthieu d'avoir partagé une petite partie de cette aventure. Je te souhaite plein de réussite dans ta recherche.

Merci à Ben et Maria pour ces années passées dans cette super coloc. J'ai aimé vivre ces moments avec vous. Maria comment te remercier pour tout ce que tu es et ton soutien au quotidien. Nos conversations, nos verres de vins... Les choses ne se sont pas finies comme je l'aurais imaginé mais au final c'est un mal pour un bien. Je ne te souhaite que du bonheur. Tu le mérites amplement.

Merci aussi à ma famille pour m'avoir permis d'en arriver là.

Enfin il y aussi la famille qu'on choisit. Un énorme merci à vous : Justine, Pauline, Florence, Richard, Fanny et Maxime. Merci d'être qui vous êtes et surtout d'être aussi géniaux. Merci pour toutes ces merveilleuses années passées ensemble - pleines d'échanges, de joies, de rire, mais aussi parfois aussi de tristesse qui ne dure pas. Quand je pense à tout

ce qu'on a vécu je ne peux qu'être impatient de vivre ce qui va suivre, Vous me connaissez mieux que moi-même et vous êtes là dans tous les moments de ma vie qui ne seraient clairement pas aussi bien sans vous tous. Tout simplement je vous aime p*****. Cette réussite est aussi la vôtre aussi. Je vous souhaite tout le bonheur possible. Je ne sais pas ce que vous en pensez mais ça sent bien la fin d'un cycle, mais j'ai réalisé que ça veut dire le début du suivant. C'est pas mal en fait. J'espère que vous avez déjà vos billets pour NY !!!!!

Elise merci pour ces derniers mois. Tu m'as été indispensable au moment le plus compliqué de ma vie. Comment te remercier suffisamment pour cela ?! Ce que je sais c'est que tu vas devenir une super infirmière.

Enfin un merci spécialement pour toi Pauli. Cette thèse est à toi aussi. Il y a des rencontres qui nous changent complètement et tu fais partie de celles là. Qui l'aurait cru ?! pas moi à l'époque. Merci d'être là pour voir la finalité de ce travail et la libération qui va avec. Pour ton soutien inconditionnel de ces derniers mois. Il était plus qu'indispensable. Merci aussi pour toutes ces corrections de mon anglais et surtout pour me faire rire comme tu sais le faire. Ma lettre est prête : « Dear Mrs The Queen, ». Enfin un énorme merci de partager la prochaine aventure avec moi et toutes celles qui suivront. Je n'arrive toujours pas à y croire et si c'est un rêve je ne veux pas me réveiller.

Sommaire

Sommaire.....	5
Liste des figures.....	8
Liste des tableaux	10
Abbréviations	11
Avant propos	13
Introduction	15
1. La maturation de l'ARN pré-messager	15
1.1. Ajout de la coiffe à l'extrémité 5' de l'ARNm	17
1.2. Epissage des ARNm	18
1.3. Polyadénylation de l'extrémité 3' des ARNm	22
2. La protéine « Poly (A) binding protein nuclear 1 » (PABPN1).....	27
2.1. La famille des protéines de liaison à la queue poly(A).....	27
2.2. Structure du gène PABPN1	29
2.3. Structure de la protéine PABPN1	31
2.4. Expression de la protéine PABPN1	32
2.5. Les fonctions moléculaires de PABPN1	33
2.5.1. Mécanisme de polyadénylation	33
2.5.2. Régulation de la taille de la queue poly(A)	34
2.5.3. Export nucléaire.....	35
2.5.4. Régulation de la polyadénylation alternative	36
2.5.5. Surveillance et dégradation des ARNs	37
2.5.6. Régulation de l'épissage	39
2.5.7. Transcription.....	40
2.5.8. Les fonctions cytoplasmiques de PABPN1	40
3. La dystrophie musculaire oculopharyngée (OPMD)	41
3.1. Le muscle strié squelettique.....	41
3.2. Les dystrophies musculaires	44
3.3. La découverte de l'OPMD	47
3.4. Physiopathologie de l'OPMD	48
3.5. Cause génétique de l'OPMD	49
3.5.1. Maladies à expansion d'alanines	49

3.5.2. Expansions (GCN) dans l'OPMD	52
3.6. Histopathologie	53
3.7. Les agrégats nucléaires de PABPN1.....	54
3.7.1. Structure des agrégats	54
3.7.2. Localisation intranucléaire des agrégats	55
3.7.3. Composition.....	59
3.7.4. Formation des agrégats nucléaires.....	60
3.7.5. Implication des agrégats dans l'OPMD.....	62
3.8. Les modèles cellulaires et animaux de l'OPMD.....	64
3.8.1. Modèles cellulaires	64
3.8.2. Modèle animaux	66
4. Dérégulations dans l'OPMD.....	67
4.1. Complexe ubiquitine-protéasome	67
4.2. Apoptose	68
4.3. Atrophie musculaire.....	69
4.4. Polyadénylation alternative (APA).....	69
4.5. Fibrose.....	70
4.6. Vieillesse prématuré	70
4.7. Défauts mitochondriaux.....	71
5. Stratégies thérapeutiques dans l'OPMD	72
5.1. Traitements actuels pour l'OPMD.....	72
5.2. Etudes expérimentales : stratégies anti-agrégation et anti-apoptose.....	72
5.3. Thérapie cellulaire	74
5.4. Thérapie génique.....	75
5.4.1. Généralités	76
5.4.2. Thérapie génique pour OPMD.....	80
5.4.3. Interférence à ARN.....	80
Résultats	83
Mitochondrial Dysfunction Reveals the Role of mRNA Poly(A) Tail Regulation in Oculopharyngeal Muscular Dystrophy Pathogenesis	84
Contexte de l'étude.....	85
Résultats	86
Discussion.....	88

Nuclear poly(A)-binding protein aggregates misplace a pre-mRNA outside of SC35 speckle causing its abnormal splicing.....	92
Contexte de l'étude.....	93
Résultats	95
Discussion.....	97
PABPN1 gene therapy rescues disease phenotype in oculopharyngeal muscular dystrophy	101
Contexte de l'étude.....	102
Résultats	103
Discussion.....	105
Discussion générale.....	109
Fonctions cellulaires de PABPN1	110
Contribution des agrégats nucléaires de PABPN1	112
Dérégulations physiopathologiques dans l'OPMD	114
Bibliographie	117

Liste des figures

Figure 1 : Interconnexions entre les projets d'étude des mécanismes physiopathologiques de l'OPMD et de développement d'une stratégie thérapie génique	14
Figure 2 : Dynamique de la formation et assemblage des mRNP de la transcription jusqu'à la traduction.....	16
Figure 3 : Représentation de la coiffe des ARN messenger.....	17
Figure 4 : Représentation des séquences consensus conservées dans les introns et reconnues par le spliceosome	18
Figure 5: Vue simplifiée de la réaction d'épissage	20
Figure 6 : Représentation de la cinétique d'assemblage du spliceosome lors de la réaction d'épissage ...	21
Figure 7: Principales formes d'épissage alternatif	22
Figure 8 : Schématisation de la réaction de maturation en 3' des ARNm	23
Figure 9: Signaux de polyadénylation retrouvés chez les mammifères et chez la levure <i>S. cerevisiae</i>	24
Figure 10: Réseau d'interaction protéique impliqué dans la maturation 3' des ARNm	25
Figure 11: Modèle de l'interaction du complexe de maturation en 3' avec le pré-ARNm chez les mammifères.....	26
Figure 12: Structure des protéines de liaison à la queue poly(A).	29
Figure 13: Structure génomique de <i>PABPN1</i> décrite par Brais <i>et al.</i>	30
Figure 14: Structure génomique de <i>PABPN1</i> décrite par Corbeil-Girard <i>et al.</i>	30
Figure 15: Structure des transcrits de <i>PABPN1</i> décrits par Pavlath <i>et al.</i>	30
Figure 16: Domaines structurels de la protéine PABPN1.....	32
Figure 17: Gauche - Modèle du contrôle de la longueur de la queue poly(A). Droite - Image en microscopie à force atomique de complexes PABPN1-poly(A) formés <i>in vitro</i>	35
Figure 18: Gauche - Représentation d'une coupe transversale d'un muscle strié squelettique. Droite - Représentation de la structure et de l'ultrastructure d'un muscle strié squelettique.	42
Figure 19 : Représentation de l'interaction entre les filaments fins et épais de la fibre musculaire.....	43
Figure 20: Répartition de la faiblesse musculaire retrouvée dans les principaux groupes de dystrophies musculaires.	45
Figure 21: Représentation schématique d'une coupe transversale d'une fibre musculaire avec les différentes protéines impliquées dans des dystrophies musculaires	46
Figure 22: Séquence nucléotidique au début du gène <i>PABPN1</i> sauvage et muté.....	52
Figure 23: Pourcentage de familles et de cas partageant différents types d'expansions dans plusieurs populations	53
Figure 24: Première observation au microscope électronique d'agrégats nucléaires de PABPN1 à partir d'une biopsie d'un patient OPMD par Tomé en 1980.....	54
Figure 25: FISH sur une coupe issue d'un muscle de patient OPMD.....	60
Figure 26: Immunofluorescence dans des cellules Hela transfectées avec PABPN1 sauvage ou mutée tagués avec l'anticorps SC35.	61

Figure 27: FRAP sur des cellules Hela exprimant la protéine PABPN1 sauvage tagué GFP.	62
Figure 28 : Gauche - Modification génétique des vecteurs de thérapie génique viraux. Droite - Exemple de production d'un vecteur de thérapie génique viral de type AAV recombinant.	79
Figure 29: Mécanisme moléculaire de l'interférence à l'ARN.	81
Figure 30: Structure de la mitochondrie.	85
Figure 31: Représentation des causes pouvant conduire à une maladie liée à un défaut épissage.	95
Figure 32: Mesure de la longueur de la queue poly(A) de l'ARN de <i>TNNT3</i> dans des biopsies SCM de patients OPMD et d'individus contrôles.	100
Figure 33 : Organisation et régulation des complexes ARNm-RBP.	111

Liste des tableaux

Tableau 1: Pathologies causées par des expansions de triplets alanines.....	51
Tableau 2 : Principaux corps nucléaires retrouvés dans le noyau.....	57
Tableau 3: Principaux modèles cellulaires dans l'OPMD	65
Tableau 4 : Modèles animaux dans l'OPMD	67
Tableau 5 : Vecteurs viraux utilisés en Thérapie génique	78
Tableau 6 : Nombre de gènes présentant un défaut d'épissage, détecté par « exon array » effectué sur des biopsies musculaires de patients OPMD comparées à celles d'individus contrôles, et classés par indice de confiance et par type d'épissage	93
Tableau 7: Comparaison des améliorations phénotypiques dans la souris A17.1 (OPMD) injectée par différents AAV ou d'une solution saline en comparaison à une souris contrôle	104

Abbreviations

Les termes utilisés dans ce manuscrit sont ceux du langage courant de la communauté scientifique et la plupart sont présentés sous leur version Anglaise. La traduction Française de certains est donnée quand cela possible.

3'ss	3' splice site
3'UTR	3' untranslated région
5'ss	5' splice site
5'UTR	5' untranslated région
AAV	Adenoassociated virus
AD	Autosomique dominant
Ad	Adénovirus
ADNc	Acide desoxyribonucléique complémentaire
ADP	Adénosine diphosphate
AON	Oligonucléotide antisens
APA	Alternative polyadenylation
AR	Autosomique récessive
ARN	Acide ribonucléique
ARN pol II	Acide ribonucléique polymérase II
ARNdb	Acide ribonucléique double brin
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
AuxDSE	Auxiliaire downstream sequence element
BP	Branching point
CBC	Cap binding complexe
CBP	Cap binding protein
CF II _m	Cleavage factor secondaire
CF I _m	Cleavage factor primaire
KCl	Chlorure de potassium
cM	Centimorgan
CPM	Muscle pharyngien
CPSF	Cleavage and polyadenylation specificity factor
CSTF	Cleavage stimulation factor
CTD	C-terminal Domain
DES	Downstream element
DM	Dystrophie musculaire
DUE	Downstream U-rich element
EE	Efficiency element
EJC	Exon junction complex
ESE	Exon splicing enhancer
ESS	Exon splicing silencer
FRAP	Fluorescence recovery after photobleaching
hnRNPQ1	Heterogeneous ribonucleoprotein Q1
hRNPs	Heterogeneous ribonucleoprotein
hTERT	Human telomerase reverse transcriptase
hTR	Human telomerase
ISE	Intronic splicing enhancer
ISS	Intronic splicing silencer
Kb	Kilobase

kDa	Kilodalton
LARP4	La-Related Protein 4
lncARN	ARN long non codant
Lv	Lentivirus
MEC	Matrice extracellulaire
miARN	MicroARN
mRNP	Messenger ribonucleoprotein particles
ncSNGH	Non coding snoRNA host genes
NLS	Nuclear localisation signal
NMD	Nonsense mediated decay
OD	Oligomerisation domain
OPMD	Oculopharyngeal muscular dystrophy
PAB	Poly(A) binding protein
PABPN1	Poly(A) binding protein nuclear 1
PAP	Poly(A) polymérase
PARN	poly(A)-specific RNase
PAS	Poly(A) site
PE	Positioning element
PPD	PABPN1 and PAP mediated RNA decay
PPT	Polypyrimidine Tract
Pre-ARN	ARN pré-messager
PROMPT	promoter upstream transcripts
RBP	RNA binding protein
RISC	RNA-induced silencing complex
RNAi	RNA interférence
RPM	Muscle releveur des paupière
RRM	RNA recognition motif
SA	Site accepteur
scaRNA	Small Cajal body-specific acide ribonucléique
SD	Site donneur
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
shARN	Short hairpin acide ribonucléique
siARN	Small interferent acide ribonucléique
SKIP	ski-interacting protein
snoRNA	Small nucleolar RiboNucleic Acid
snoRNP	Small nucleolar ribonucleoprotein
snRNA	small nuclear RiBonucleic Acid
snRNP	Small nuclear ribonucleoprotein
SR	Arginine riche protein
TFIID	Facteur d'initiation de la transcription
TnC	Troponine C
TnI	Troponine I
TnT	Troponin T
USE	Upstream sequence element
UUE	Upstream U-rich element
UsnRNPs	Uridine-rich small nuclear RiboNucleoprotein
XR	Récessif lié à l'X
ZC3H14	Zinc finger CCCH-Type containing protein 14

Avant propos

Mon travail de thèse a porté sur l'étude des fonctions d'une protéine de liaison à l'ARN appelée PABPN1 pour « poly(A) binding protein nuclear 1 », dans le contexte de la dystrophie musculaire oculopharyngée (OPMD). Il s'agit d'une protéine ubiquitaire qui intervient dans de nombreux mécanismes essentiels de la régulation post-transcriptionnelle des ARN chez les eucaryotes. Une courte expansion anormale de triplets GCN dans le premier exon du gène *PABPN1* conduit à une expansion anormale d'alanines et à cette dystrophie musculaire appelée OPMD pour oculopharyngeal muscular dystrophy (DMOP - dystrophie musculaire oculopharyngée en Français). Il s'agit d'une maladie rare avec une apparition des premiers symptômes dans la cinquième décennie de vie. Dans ce manuscrit, je traiterai tout d'abord de l'état de l'art concernant la protéine PABPN1 du point de vue de sa structure et de ses différentes fonctions cellulaires. Ensuite, une partie sera consacrée à l'OPMD et à sa place dans le groupe hétérogène des dystrophies musculaires et des maladies à expansions de triplets. Depuis plusieurs années, PABPN1 apparaît comme une protéine clé intervenant à de nombreux niveaux de régulation dans la maturation des ARN. Dans ce contexte, l'OPMD se révèle être une maladie aux mécanismes physiopathologiques complexes où de nombreuses voies semblent dérégulées. Cependant les mécanismes moléculaires qui conduisent de cette simple expansion de triplet à la maladie ne sont pas encore connus. Au cours de ma thèse j'ai donc étudié certaines fonctions de PABPN1 et j'ai cherché à comprendre si leur dérégulation pouvait expliquer la pathologie. Dans le cadre du premier axe d'étude de ma thèse je me suis intéressé à la principale caractéristique pathologique de l'OPMD : la présence au sein des muscles d'agrégats nucléaires de la protéine PABPN1. J'ai montré que ces agrégats de PABPN1 séquestraient au moins un pré-ARN messager (pré-ARNm) et que cette séquestration entraînait un défaut d'épissage. Dans un deuxième axe, j'ai étudié les défauts mitochondriaux présents dans l'OPMD, qui sont aussi retrouvés dans de nombreuses dystrophies musculaires. En collaboration avec l'équipe de Martine Simonelig (Montpellier), j'ai mis en évidence une sensibilité accrue des ARN mitochondriaux à la déadénylation conduisant à leur déstabilisation et à une diminution de leur expression dans un contexte pathologique. Enfin dans un troisième axe, j'ai développé, en collaboration avec l'équipe de George Dickson (Londres) une stratégie de thérapie génique afin de corriger la mutation responsable de l'OPMD (Figure 1).

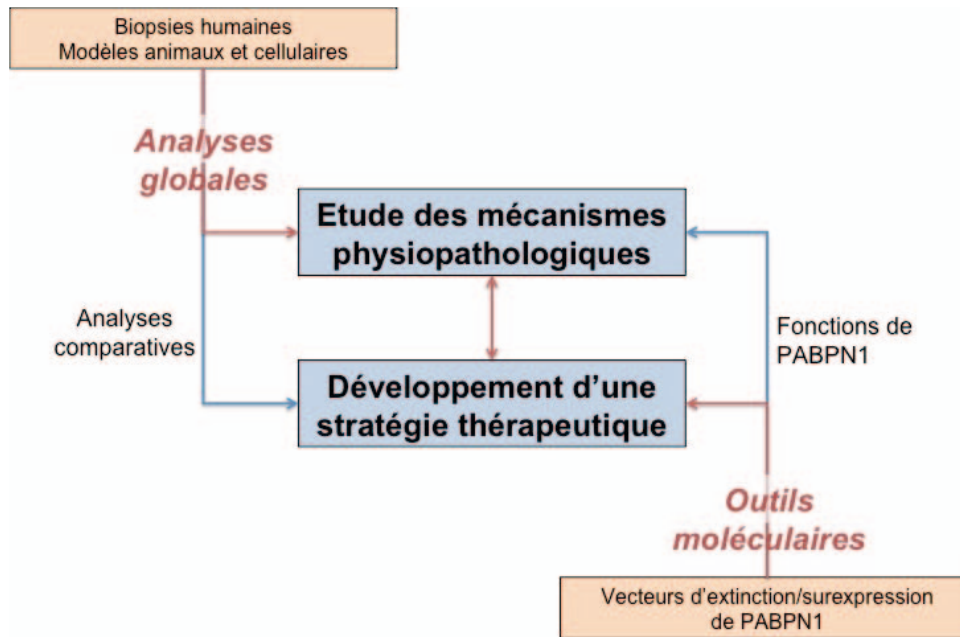


Figure 1 : Interconnections entre les projets d'étude des mécanismes physiopathologiques de l'OPMD et de développement d'une stratégie thérapie génique

L'étude des mécanismes physiopathologiques (à partir de biopsies humaines et de modèles in vivo et in vitro de la pathologie) et le développement d'une stratégie thérapeutique pour l'OPMD (par des outils moléculaires d'extinction et de surexpression de PABPN1) sont des projets interconnectés. L'étude des dérégulations dans l'OPMD nous permet de mieux comprendre la pathologie et donc de disposer de marqueurs indispensables pour valider l'efficacité des stratégies thérapeutiques et les outils moléculaires thérapeutiques développés dans le cadre du projet de thérapie génique nous permettent en parallèle d'étudier les fonctions de la protéine PABPN1.

Introduction

1. La maturation de l'ARN pré-messager

La molécule d'ARN est d'abord synthétisée dans le noyau puis exportée dans le cytoplasme où elle sera dégradée après avoir servi de support à la fabrication d'une protéine fonctionnelle. La molécule passe par de nombreuses étapes essentielles qui permettent de l'acheminer jusqu'au lieu de sa traduction mais aussi de réguler son métabolisme (niveau de synthèse et de dégradation). L'ARN subit aussi diverses étapes de contrôle qualité pour s'assurer que seules les molécules capables de produire des protéines fonctionnelles seront traduites. La molécule d'ARN n'est jamais isolée mais toujours associée à de nombreuses protéines de liaisons à l'ARN (RNA binding protein en Anglais = RBP) qui interviennent à toutes les étapes de ces différents processus. Ces protéines servent à la fois d'éléments structurels et d'éléments de contrôle des étapes de son cycle de vie (synthèse, maturation, contrôles qualités, export nucléaire, stabilité, localisation, traduction). Les RBP forment avec l'ARN, mais aussi par des interactions avec des cofacteurs protéiques, des particules ribonucléoprotéiques (messenger ribonucleoprotein particules en Anglais = mRNP). Chaque ARN est ainsi lié par de nombreuses RBP et chaque RBP possède des centaines de milliers de cibles dans la cellule. La composition protéique des RNP évolue au cours des différentes étapes du cycle de vie de l'ARN et certaines RBP changent en fonction du processus alors que d'autres restent associées au cours de plusieurs étapes. Dans ce dernier cas elles peuvent coupler différents événements en agissant directement sur une étape ou bien en recrutant des protéines nécessaires pour la suivante. Certaines RBP peuvent aussi intervenir dans des étapes non successives (Figure 2). Chez les eucaryotes supérieurs, dans le noyau l'étape de transcription par l'ARN polymérase II conduit à la formation d'une pré-molécule d'ARNm (pré-ARNm) qui subit une série de maturations : ajout d'une coiffe dans la partie 5', épissage de ses introns, ajout d'une queue poly(A) dans la partie 3', puis est ensuite exportée dans le cytoplasme. Une vue simplifiée présente ces événements de maturation comme indépendants les uns des autres et séquentiels alors qu'ils ont lieu co-transcriptionnellement quand la molécule d'ARN n'est pas complètement synthétisée, et sont interconnectés : chaque étape pouvant influencer l'autre. Les ARN messagers (ARNm) sont les molécules support de la vie mais les RBP sont indispensables pour leur permettre de mener à bien leurs fonctions.

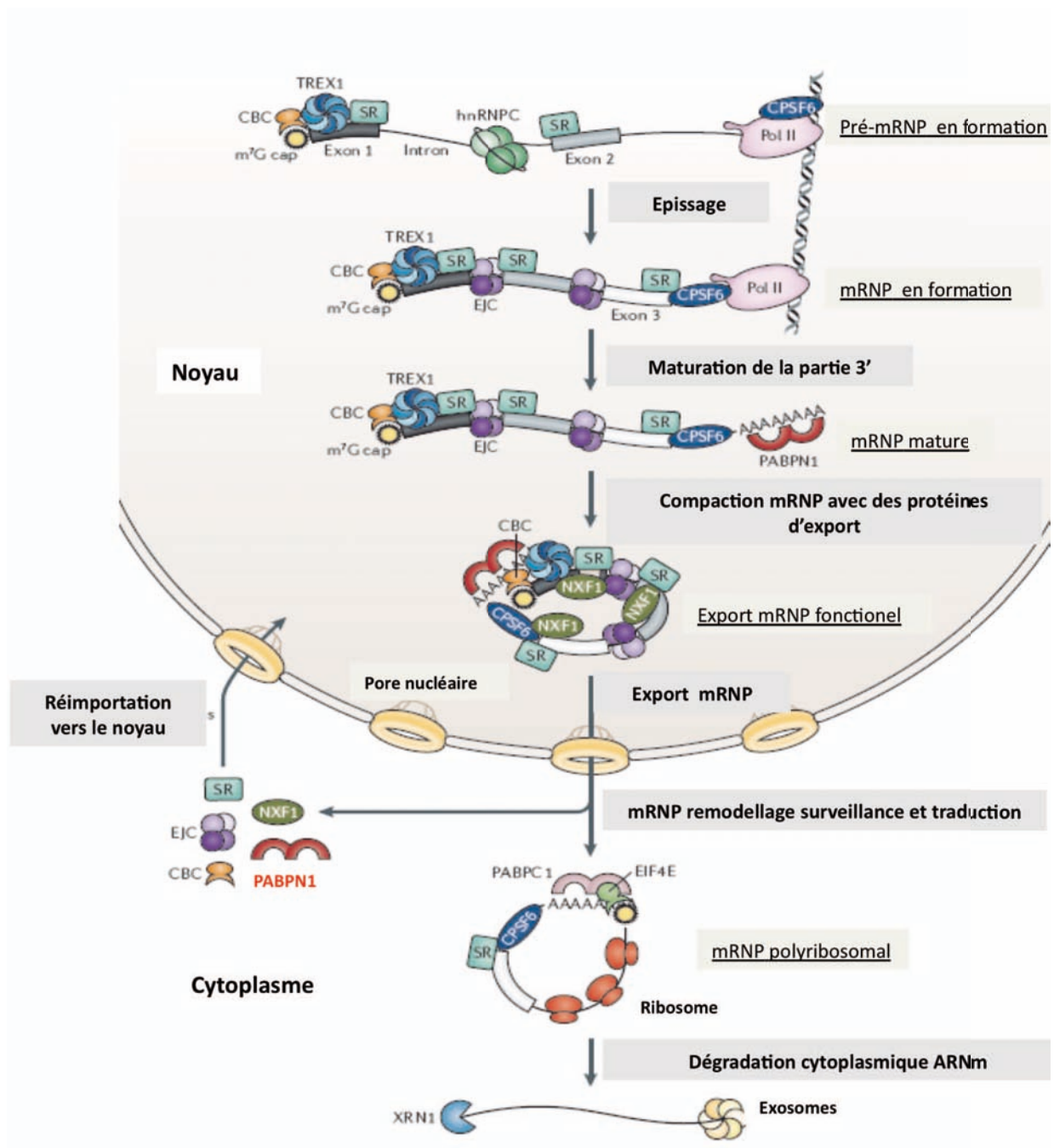


Figure 2 : Dynamique de la formation et assemblage des mRNP de la transcription jusqu'à la traduction

Juste après sa synthèse, le pré-ARNm est mûré pour conduire à une particule capable de sortir du noyau et de servir de matrice à la fabrication d'une protéine fonctionnelle. De nombreuses protéines de fixation à l'ARN interviennent au cours de ces différentes étapes. Modifié à partir de (Müller-McNicoll, Neugebauer, 2013).

1.1. Ajout de la coiffe à l'extrémité 5' de l'ARNm

La première modification co-transcriptionnelle que subissent les pré-ARNm est l'ajout d'un groupement chimique particulier : le 7-méthylguanosine appelé coiffe et situé en amont du premier nucléotide. Cette coiffe est conservée de la levure jusqu'à l'homme et son ajout se fait dès la synthèse par l'ARN polymérase II (ARN pol II) des premiers nucléotides du pré-ARNm, par des enzymes recrutées au niveau de son domaine C-terminal. Cette modification se produit lors de l'étape dite de pause qui correspond au moment où l'enzyme s'arrête au niveau de la chromatine et où la transcription stoppe. Chez les métazoaires la coiffe est ajoutée par l'action séquentielle de 3 enzymes au niveau du groupement hydroxyle 5' du premier nucléotide, via une liaison triphosphate pour produire la molécule suivante : m7G(5')ppp(5')X où la lettre p représente un groupement phosphate et le X le premier nucléotide transcrit (Figure 3). La guanosine est ajoutée par les deux premières enzymes qui est ensuite méthylée par la troisième. Ceci a lieu très tôt après l'initiation de la transcription alors que 20-30 nucléotides sont synthétisés et représente un point de contrôle qualité. Cette modification est essentielle pour la survie des cellules : elle est nécessaire pour la protection de l'ARN contre les exonucléases, l'épissage, la polyadénylation et l'export de la molécule d'ARN. Elle est enfin nécessaire pour le recrutement des ribosomes lors de l'étape de traduction. L'étape d'ajout de la coiffe est connectée avec les étapes de transcription et de polyadénylation. Dans le noyau, les deux sous-unités du complexe de liaison à la coiffe (CBC : Cap Binding Complex en Anglais) : CBP20 et CBP80 fixent le groupement 7-méthylguanosine directement après son ajout et après le premier cycle de traduction le complexe CBC est remplacé par le facteur d'initiation de la traduction eIF4E (Müller-McNicoll, Neugebauer, 2013 ; Proudfoot et al., 2002).

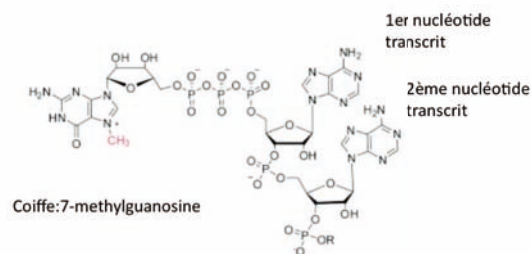


Figure 3 : Représentation de la coiffe des ARN messager

Un groupement de type 7-méthylguanosine appelé coiffe est ajouté au premier nucléotide des ARNm. Modifié à partir de (Gonatopoulos-Pournatzis, Cowling, 2014)

1.2. Epissage des ARNm

L'étape d'épissage, assurée par un complexe appelé spliceosome, va enlever les séquences introniques des ARN codant des protéines ainsi que des longs ARN non codant (LncARN) (Lee, Rio, 2015a) et ne laisser que les exons qui vont être reliés entre eux pour former l'ARN messager mature. Ce très vaste complexe multimoléculaire est composé de 5 petites ribonucléoprotéines nucléaires enrichies en uridine, appelée UsnRNPs (Uridine-rich small nuclear RiboNucleoProtein) : U1, U2, U4, U5 et U6 et de plus de 150 facteurs d'épissages. Chaque snRNP (small nuclear RiboNucleoProtein) est un complexe composé d'un petit ARN appelé snRNA (small nuclear RiboNucleic Acid) d'environ 100 à 200 nucléotides, recouvert de protéines dont le nombre est variable. Il s'agit d'un complexe dynamique dont la composition évolue parallèlement à l'avancée de la réaction. Analysé à partir d'extraits cellulaires plus de 200 protéines sont associées au spliceosome humain à une ou plusieurs étapes et environ 140 protéines sont considérées comme faisant partie du cœur du complexe basé sur leur abondance (Hegele et al., 2012). L'ensemble de ces protéines est nécessaire pour le repliement du pré-ARN facilitant les 2 réactions de *trans*-esterification de la réaction d'épissage (Hoskins, Moore, 2012).

Le processus d'épissage nécessite la reconnaissance de séquences consensus : Site Donneur (SD) ou site 5' d'épissage (5' splicing site en Anglais = 5'ss) correspondant à la jonction exon-intron, le Point de Branchement (BP) et le Site Accepteur (SA) ou site 3' d'épissage (3' splicing site en Anglais = 3'ss) correspondant à la jonction intron-exon. Le BP est typiquement suivi d'une région riche en nucléotides purines (PPT pour PolyPyrimidine Tract) chez les eucaryotes supérieurs (Burge et al., 1998). Les séquences consensus des sites SA et SD sont faiblement conservées (Cartegni et al., 2002). Les seuls motifs invariables et retrouvés dans tous les introns sont les dinucléotides GU en 5' de l'intron et AG en 3' de ce dernier (Figure 4) (Will, Lührmann, 2011).

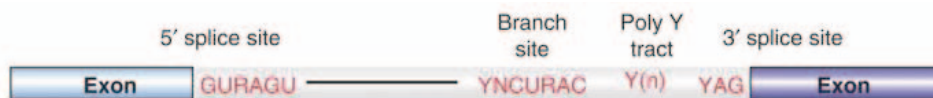


Figure 4 : Représentation des séquences consensus conservées dans les introns et reconnues par le spliceosome

Les sites donneur (5'SS) et accepteur (3'SS) d'épissage ainsi que le Point de Branchement (Branching point en Anglais = BP) sont représentés. Chez les eucaryotes supérieurs, le PolyPyrimidine tract (poly Y tract) suit le BP (Will, Lührmann, 2011).

D'autres séquences impliquées dans la régulation de l'épissage sont retrouvées aussi bien dans les exons que dans les introns. Il peut s'agir de séquences stimulatrices ou inhibitrices de l'épissage. Ces séquences peuvent ainsi être séparées en 4 groupes : ESE pour Exonic Splicing Enhancer, ESS pour Exonic Splicing Silencer, ISE pour Intronic splicing Enhancer et ISS pour Intronic Splicing Silencer. Ces séquences impliquées dans le mécanisme d'épissage alternatif vont intervenir dans la régulation: soit en activant, soit en réprimant l'assemblage des éléments du spliceosome à des sites d'épissage adjacents. Les séquences ESE et ISE fixent ainsi des facteurs d'épissage protéiques riches en sérine/arginine (protéines SR) qui vont faciliter le recrutement de facteurs auxiliaires de l'épissage et vont majoritairement favoriser l'inclusion d'exons. Les séquences ESS et ISS vont quant à elles fixer des facteurs de répression de l'épissage de la famille des ribonucléoprotéines hétérogènes (heterogenous ribonucleoprotein = hnRNP) (Wang, Burge, 2008). Cependant il ne s'agit pas d'une règle générale et les protéines SR peuvent être impliquées dans la répression de l'épissage, et les protéines hnRNPs dans l'activation. Il semblerait que l'activation ou la répression de l'épissage soit dépendante de la position de fixation sur le pré-ARN plus que du facteur impliqué (Erkelenz et al., 2013).

L'épissage du pré-ARN se déroule en deux étapes successives, impliquant chacune une réaction de *trans*-estérification. Dans la première réaction le groupe 2'OH du nucléotide adénosine présent au niveau du BP agit comme un nucléophile pour attaquer la liaison phosphodiester de la jonction exon/intron en 5'. Une *trans*-esterification conduit à une libération de l'exon 5' et la formation d'une molécule d'ARN en forme de lariat correspondant à l'intron et l'exon situé en 3'. Dans la seconde réaction, le 3'OH situé au niveau de l'exon 5' libre attaque la jonction intron/exon au niveau 3' conduisant à la fusion des 2 séquences exoniques et la libération de l'intron (Proudfoot et al., 2002) (Figure 5) .

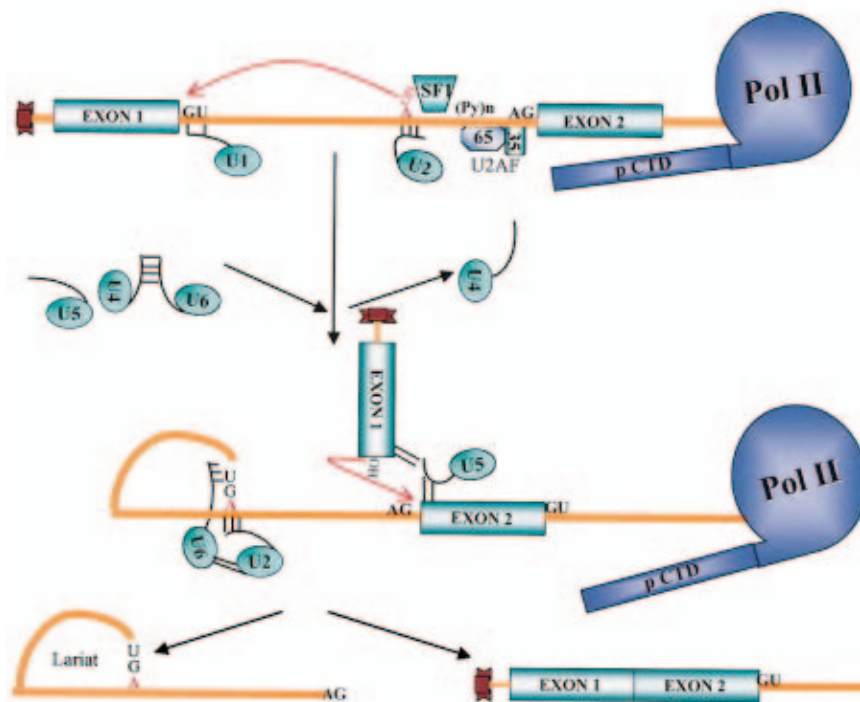


Figure 5: Vue simplifiée de la réaction d'épissage

La réaction d'épissage se déroule en 2 étapes : le 2'OH du nucléotide adénosine situé au niveau du BP agit comme un nucléophile pour attaquer la liaison exon-intron ce qui conduit à libérer l'exon 5' du reste de la molécule de pré-ARN et à la formation d'une molécule en forme de lariat contenant l'intron et l'exon 3'. L'exon 5' attaque ensuite la jonction intron-exon ce qui conduit en une fusion des deux exons et la libération de l'intron sous forme de lariat (Proudfoot et al., 2002)

L'assemblage du splicéosome est ordonné : il se fait par étape pendant lesquelles différents complexes se forment sur le pré-ARN (Brow, 2002). Chez les mammifères, l'assemblage du complexe précoce du splicéosome (E) est initié par la reconnaissance par la snRNP U1 du site d'épissage en 5' au niveau de l'intron. Le complexe A est formé par l'interaction de la snRNP U2 avec le point de branchement. L'addition du complexe composé des 3 snRNPs U4, U5, U6 donne lieu au complexe B qui est activé par la dissociation des snRNP U1 et U4 du splicéosome. Le cœur catalytique est formé au niveau du pré-ARN par les snRNP U2, U5, U6 (complexe C). Les deux étapes de la réaction d'épissage sont catalysées au niveau du complexe activé B et du complexe C. Finalement, le splicéosome se désassemble ce qui conduit à la libération de l'ARNm épissé et de l'intron (Hui, 2009) (Figure 6).

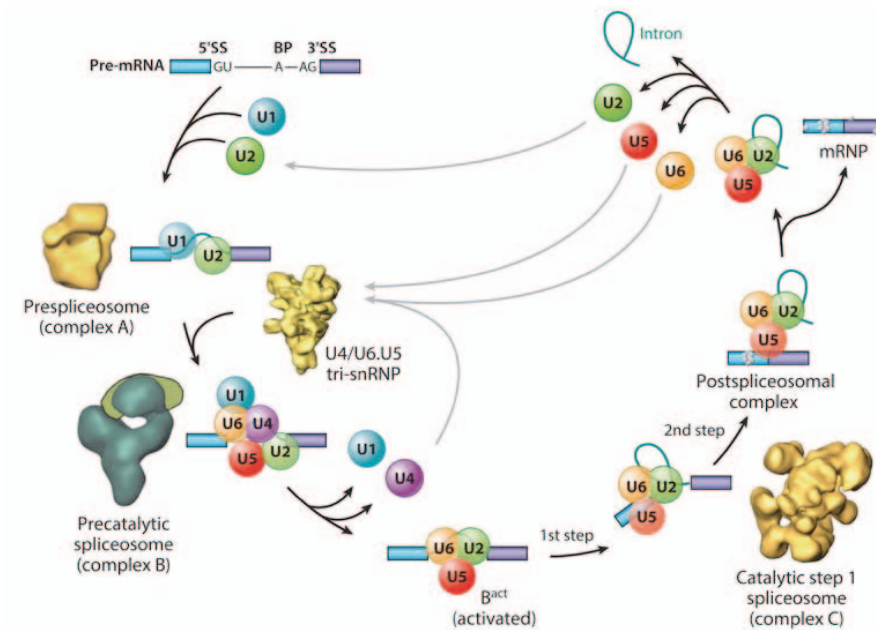


Figure 6 : Représentation de la cinétique d'assemblage du splicéosome lors de la réaction d'épissage

Le splicéosome est constitué de cinq snRNPs U1, U2, U4, U5 et U6. Il a la capacité d'épisser les pré-ARN en s'appariant de façon dynamique et ordonnée aux séquences d'épissage (5'ss, 3'ss et résidu A). Les rectangles violets et bleus représentent 2 exons séparés par l'intron avec les séquences d'épissage (Lee, Rio, 2015b).

Le mécanisme décrit précédemment s'applique pour l'épissage constitutif mais aussi pour l'épissage alternatif. Le premier cas correspond à l'élimination systématique d'un intron et à la conservation d'un exon, tandis que dans le second cas un exon (ou une partie) est soit inclus soit exclus de l'ARN mature. Aujourd'hui, on estime que chez l'homme 95% des gènes subissent un épissage alternatif (Pan et al., 2008). Plusieurs événements d'épissage alternatif existent (Figure 7). La régulation de l'épissage alternatif est dépendante du tissu ainsi que du stade de développement. Certains organes comme le cerveau, la rate, le pancréas ou encore le muscle subissent de très nombreux événements d'épissage alternatif (de la Grange et al., 2010). Il s'agit d'une source importante de diversité protéique.

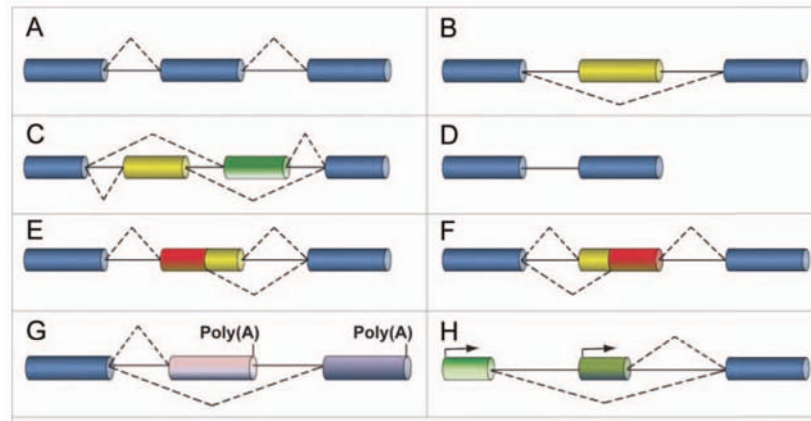


Figure 7: Principales formes d'épissage alternatif

Les exons sont représentés par des boîtes, les introns alternatifs par des lignes continues et l'évènement d'épissage par des lignes discontinues. A) épissage constitutifs, B) utilisation alternative d'un exon cassette interne, C) exons mutuellement exclusifs, D) rétention d'introns, E) site d'épissage alternatif en 5', F) site d'épissage alternatif en 3', G) utilisation d'un site de polyadénylation alternatif, H) utilisation d'un promoteur alternatif. Modifié à partir de (Pistoni et al., 2010)

A titre d'exemple, de nombreuses protéines du muscle présentent de nombreux variants d'épissage. C'est le cas des isoformes présentes dans les myofilaments qui sont différenciellement régulées en fonction du type de muscle, du type de fibre et aussi du stade de développement. Chaque isoforme possède une fonction propre pour la physiologie du muscle (Pistoni et al., 2010).

1.3. Polyadénylation de l'extrémité 3' des ARNm

Chez les eucaryotes supérieurs, presque tous les ARNm possèdent au niveau de leur partie 3' une longue séquence d'adénosines, ajoutée sans matrice lors d'une réaction co-transcriptionnelle et appelée « queue poly(A) » (Proudfoot et al., 2002). Cette queue poly(A) a été décrite pour la première fois en 1960 (Edmonds, Abrams, 1960). Elle est ajoutée lors d'une réaction de maturation qui se déroule dans le noyau en 2 étapes: 1) une première étape de clivage endonucléotidique au niveau de la région 3' non traduite (3' untranslated région en Anglais = 3'UTR) et 2) une seconde étape dite de polyadénylation (Shi et al., 2009). De façon simplifiée le clivage d'une liaison phosphodiester au niveau d'un site spécifique conduit à la formation de 2 fragments : l'un avec un groupe hydroxyle sortant et l'autre avec un groupe 5' phosphate sortant. La réaction de polyadénylation se termine par l'ajout d'environ 250 adénosines au niveau du fragment comprenant le groupe hydroxyle tandis que l'autre fragment est dégradé par l'exonucléase Xrn2. Cette étape serait responsable de l'arrêt

de la transcription (modèle torpédo) (Figure 8). L'étape de maturation en 3' des ARN nécessite les protéines canoniques suivantes : la polynucléotide adenylyltransferase PAP (Poly (A) polymérase), PABPN1 (Poly(A) binding protein nuclear 1), la large sous-unité de l'ARN pol II et 4 complexes protéiques : CPSF (cleavage et polyadenylation specificity factor), CSTF (cleavage stimulation factor), CF Im et CF IIm (cleavage factors I et II).

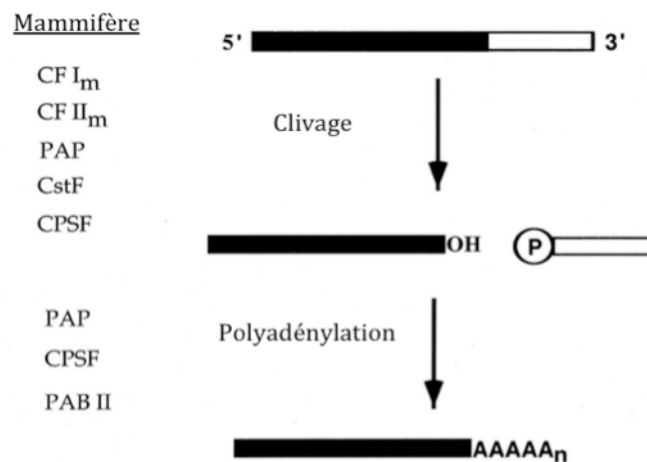


Figure 8 : Schématisation de la réaction de maturation en 3' des ARNm

La polyadénylation des ARNm se produit lors d'une réaction en 2 étapes. Dans la première se produit un clivage endonucléolotique et dans la seconde l'ajout de la queue poly(A). Modifié à partir de (Zhao et al., 1999a).

Le pré-ARNm contient des séquences en *cis* qui vont conditionner la fixation des protéines impliquées dans la réaction. Elles forment ce qu'on appelle le signal de polyadénylation (Polyadénylation Signal en Anglais = PAS) et sont présentes au niveau de la région 3'UTR (Chan et al., 2011a). Les principales séquences canoniques retrouvées chez les eucaryotes supérieurs sont les suivantes : la séquence de fixation de la protéine CPSF : A(U/A)UAAA ainsi qu'une séquence plus variable riche en U et GU (U/GU downstream element en Anglais = DSE). Ces 2 éléments déterminent le site de clivage et de polyadénylation (site Poly(A)) généralement situé entre 11 et 24 nucléotides en aval de la séquence A(U/A)UAAA et entre 10 et 30 nucléotides en amont de la séquence DSE (Pauws et al., 2001). Le site de coupure est en général retrouvé après un résidu adénosine (puis vient ensuite par ordre de préférence U, C, G) (Chen et al., 1995). Cependant, le site de sélection reste variable et se retrouve dans une fenêtre d'environ 20 nucléotides. Pour un même signal de polyadénylation plusieurs site Poly(A) peuvent être utilisés. Certaines séquences en amont de ce site (upstream sequence element en Anglais = USE) et en aval (auxiliary downstream element en Anglais = auxDSE) ont été retrouvées chez des ARN viraux et des

ARNm cellulaires. Elles interviennent dans l'efficacité de la réaction en fournissant des sites de fixation à des protéines du complexe et des co-facteurs (Chan et al., 2011b). Dans le cas des organismes inférieurs comme la levure *Saccharomyces cerevisiae*, les pré-ARN ne contiennent pas de séquence consensus AAUAAA et dans les cas où elle est présente celle-ci ne semble pas nécessaire à la réaction de maturation. Le signal de polyadénylation est alors dit dégénéré puisque différentes séquences peuvent conduire à une polyadénylation correcte (Wahle, Keller, 1992) (Figure 9).

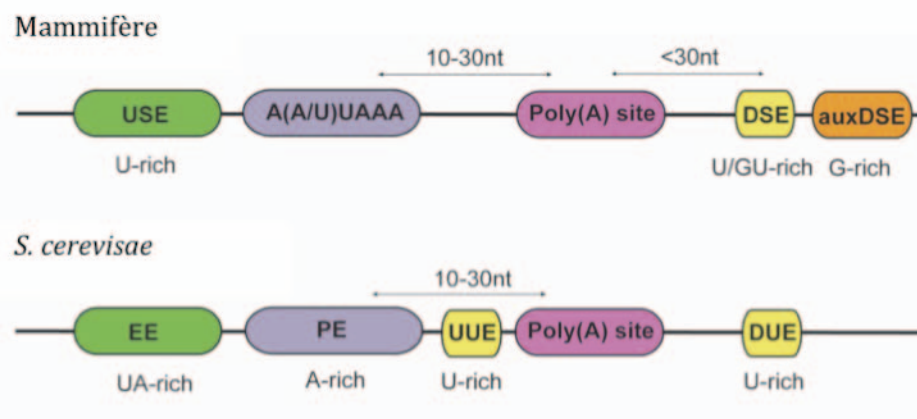


Figure 9: Signaux de polyadénylation retrouvés chez les mammifères et chez la levure *S. cerevisiae*.

USE = upstream element, *DSE*= downstream element, *auxDSE*= auxiliary downstream element, *EE*, efficiency element, *PE*= positioning element, *UUE*= upstream U-rich element, *DUE* = downstream U-rich element. Modifié à partir de (Chan et al., 2011a)

Lors de la première étape de la réaction de polyadénylation, la sous unité CPSF-73 du complexe CPSF (large complexe multiprotéique composé des protéines CPSF-160, CPSF-100, CPSF-73, CPSF-30, symplekin, hFip1, Wdr33) clive l'ARN au niveau du 3'UTR. Le complexe protéique CSTF lie la séquence DSE et participe à cette étape de clivage. Il comprend 3 sous unités : CstF77, CstF50 et CstF64 ou son paralogue CstF64 π (fortement exprimé dans le testicule) et sa fixation au site DSE nécessite la coopération avec le complexe CPSF. Le complexe CF Im est impliqué dans la fixation de l'ARN en améliorant l'efficacité de la réaction au niveau des PAS canoniques. En l'absence de site de polyadénylation, mais avec un motif de reconnaissance de type UGUAN, le complexe CF Im joue le rôle de plateforme pour recruter les autres protéines impliquées dans la réaction de clivage. CF Im interagit avec les protéines PAP, PABPN1 et des facteurs d'épissage de type SR (pour riche en acides aminés sérine et arginine) et SR-like (protéines similaires au

facteurs d'épissage SR auxquels il manque un domaine structurel ou fonctionnel). Le complexe CF Im est aussi présent dans le spliceosome et l'interaction entre CF Im et des facteurs d'épissages joue un rôle dans le couplage des réactions d'épissage et de polyadénylation (Zhou et al., 2002). Le complexe CF IIm intervient dans l'étape de clivage et interagit avec la large sous-unité de l'ARN pol II par son domaine C-terminal (CTD) pour coordonner la réaction de maturation de l'extrémité 3' des ARNm. Il interagit aussi avec les complexes CPSF, CstF, CFIIIm. Les protéines du complexe CstF et CF Im forment des dimères une fois fixées à l'ARN (Figure 10).

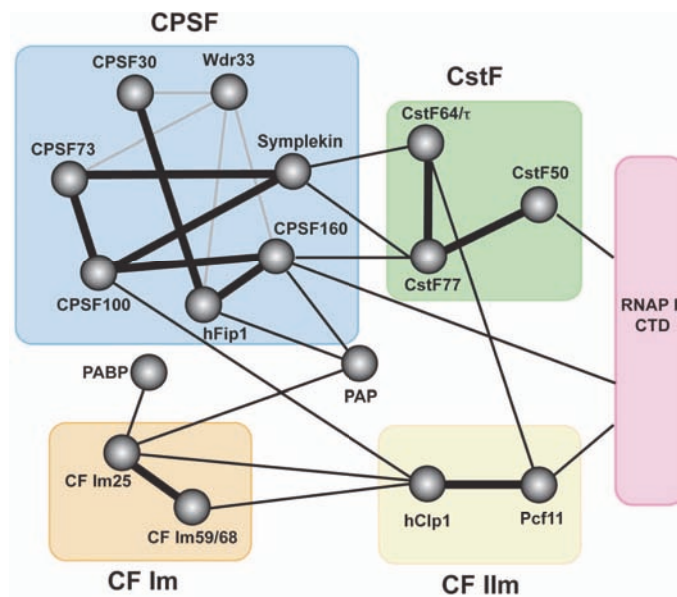


Figure 10: Réseau d'interaction protéique impliqué dans la maturation 3' des ARNm

Les cercles représentent des protéines individuelles et les rectangles colorés représentent les complexes. Les interactions entre les protéines des complexes vérifiées expérimentalement sont représentées par des lignes épaisses noires, celles parmi les complexes sont représentées par des lignes fines et enfin les lignes grises sont les interactions mises en évidence à partir d'études avec des protéines homologues (Chan et al., 2011a).

La deuxième étape de maturation qui correspond à la polyadénylation proprement dite, nécessite l'enzyme PAP qui catalyse la réaction de polymérisation des adénosines à partir de molécules d'Adénosine Tri Phosphate (ATP) (Wahle, 1992). Elle a lieu séquentiellement avec dans un premier temps l'addition des 10 premiers adénosines et dans un second temps l'élongation de la queue poly(A) qui nécessite la protéine PABPN1 et le complexe CPSF (Sheets, Wickens, 1989). La protéine PABPN1 sert à stimuler l'activité de la protéine PAP qui est faiblement active par elle-même (processive) (Wahle, 1991) pour permettre l'ajout d'environ 250 adénosines. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* la queue poly(A)

contient entre 70 et 80 adénosines (Eckmann et al., 2011). Le mécanisme de polyadénylation sera expliqué plus en détail par la suite.

In vivo, les facteurs impliqués dans la régulation 3' des ARNm sont étroitement liés à ceux de la transcription. En particulier, le complexe de clivage/polyadénylation se fixe au niveau du pré-ARN cotranscriptionnellement : CPSF se fixe lors de l'étape de pré-initiation de la transcription grâce à l'interaction avec le facteur d'initiation de la transcription (TFIID) et les complexes CstF et CFIm sont aussi associés à l'ARN pol II durant l'élongation. Lors de son passage au niveau du PAS, la protéine ARN pol II fait une pause et il semblerait que ce soit à cette étape que le complexe de maturation s'assemble complètement sur l'ARN pré-messager. Les protéines CPSF, CstF et CF Im fixent les séquences *en cis* sur l'ARN au niveau du PAS pour former un complexe stable. Puis CF IIm et PAP rejoignent le complexe de manière transitoire et avec une faible affinité pour former un complexe de maturation final. La polyadénylation peut être reproduite *in vitro* avec seulement les protéines PAP et CPSF. Il semblerait ainsi que les autres protéines se dissocient complètement du complexe après l'étape de clivage. Le facteur CPSF reste quand à lui fixé à l'ARN et lie la PAP à l'ARN pour l'étape de polyadénylation (Chan et al., 2011a) (Figure 11).

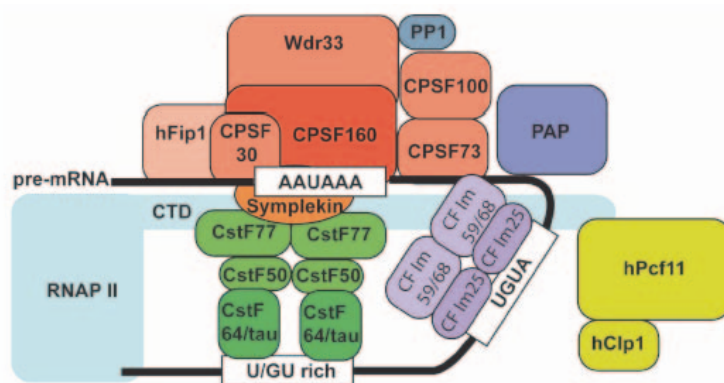


Figure 11: Modèle de l'interaction du complexe de maturation en 3' avec le pré-ARNm chez les mammifères.

In vivo le complexe de maturation en 3' est intimement connecté à l'ARN pol II qui s'assemble cotranscriptionnellement. Le complexe cœur est composé des protéines CPSF liées au niveau de la séquence consensus, des protéines CstF, CF Im et CF IIm (Chan et al., 2011a).

Une fois la réaction de polyadénylation terminée, le complexe de maturation en 3' se désassemble et l'ARN est exporté vers le cytoplasme.

2. La protéine « Poly (A) binding protein nuclear 1 » (PABPN1)

La protéine PABPN1 est une protéine nucléaire et ubiquitaire de liaison à l'ARN. Elle a d'abord été décrite comme un facteur de polyadénylation impliqué dans la synthèse et le contrôle de la longueur de la queue poly(A) des ARNm, mais de nouvelles fonctions dans la régulation générale des ARN ont récemment été mises en évidence. Les différentes fonctions de PABPN1 seront détaillées ci-dessous.

2.1. La famille des protéines de liaison à la queue poly(A)

La queue poly(A) est liée de manière permanente à tous les ARNm eucaryotes à l'exception des ARN codant les histones. Elle est recouverte par des protéines de liaison à la queue poly(A) (Poly(A) binding protein en Anglais = PAB) qui jouent un rôle dans sa synthèse, la régulation de sa longueur et permettent ses fonctions (Kühn, Wahle, 2004). En 1973 deux PAB conservées parmi les eucaryotes ont été mises en évidence : la protéine PAB cytoplasmique (PABPC1) et la protéine PAB nucléaire (PABPN1) (Blobel, 1973). Depuis de nouvelles PAB cytoplasmiques ont été découvertes conduisant à un nombre total de 5 (PABPC1, PABPC3-5 et PABPCL1). Pour qu'une protéine soit définie comme une PAB, elle doit 1) posséder un domaine de reconnaissance à l'ARN (RNA recognition motif en Anglais = RRM), 2) avoir été montrée par des études biochimiques capable de se fixer de façon spécifique et avec une haute affinité à une molécule d'ARN polyadénylée (Wigington et al., 2014a). Les protéines PABPN1 et PABPC1 sont les protéines de la famille des PAB les plus étudiées à ce jour et sont toutes deux ubiquitaires chez les mammifères. Depuis peu trois nouvelles PAB font désormais partie de la familles des protéines de liaison à la queue poly(A): ZC3H14 (Zinc finger CCCH-Type containing protein 14), heterogenous Ribonucleoprotein Q1 (hnRNP Q1) et La-Related Protein 4 (LARP4) (Wigington et al., 2014b).

PABPC1 est retrouvée chez tous les eucaryotes. Elle possède 4 domaines RRM, et un domaine C-terminal avec 5 hélices alpha. Elle lie la queue poly(A) sur un minimum de 12 adénosines mais en nécessite 25 pour la fixation des 4 domaines RRM. PABPC1 participe à la traduction de l'ARNm, module la première étape de la dégradation de l'ARN par le mécanisme de déadénylation, participe aussi à la répression de la traduction dépendante des microARN (miARN) via une interaction entre le complexe RISC (RNA-induced silencing

complex) et certains ARNm, identifie les ARNm contenant un codon stop prématuré dans la voie du NMD, et pourrait aussi influencer la localisation des ARNm par des interactions protéiques (Wigington et al., 2014b).

Contrairement aux autres PAB, ZC3H14 lie l'ARN par son domaine en tandem CCCH de type zinc finger. La protéine ZC3H14 est retrouvée dans le noyau au niveau de domaines nucléaires appelés 'speckles' mais peut également migrer vers le cytoplasme. La plupart de ses fonctions ont été mises en évidence chez *S. cerevisiae* qui possède un orthologue potentiel : la protéine Nab2. Ses fonctions dans la régulation de la taille de la queue poly(A) et l'export des ARNm du noyau vers le cytoplasme ont été mises en évidence chez la levure. D'autres orthologues possibles ont été mis en évidence chez la mouche *D.melanogaster*, le ver *C.elegans* et la souris *M. musculus*. Une mouche déficiente en ZC3H14 présente une hyperadénylation des ARNm mais aucun défaut dans l'export du noyau vers le cytoplasme. Chez les mammifères, une extinction de l'expression de cette protéine dans des cultures de cellules conduit aussi à une hyperadénylation. Cette protéine semble avoir des fonctions similaires à celles de l'autre protéine PAB nucléaire PABPN1, et leur rôle respectif n'est pas encore clair à l'heure actuelle. Bien que ZC3H14 soit exprimé de façon ubiquitaire sa fonction semble plus importante dans les neurones que dans les autres types cellulaires : chez l'homme une mutation dans la protéine conduisant à une diminution de son expression provoque une forme récessive autosomique de retards mentaux et des modèles de perte de fonctions conduisent à un phénotype neuronal (Leung et al., 2009).

La protéine hnRNPQ-1 est retrouvée majoritairement dans le cytoplasme mais elle présente des variants d'épissages nucléaires (hnRNPQ-2 et -3). Elle entre en compétition avec PABPC1 pour la fixation de la queue poly(A) et inhibe la traduction. La protéine hnRNPQ-1 lie les ARN au niveau de séquences à la fois riches en (A) mais aussi non enrichis. Dans ce dernier cas des séquences consensus pour la fixation de la protéine ont été retrouvées conduisant à une répression de la traduction pour un sous-ensemble d'ARN.

La protéine LARP4 est également retrouvée chez tous les eucaryotes. Elle est présente dans le cytoplasme et fixe PABPC1 pour influencer la traduction et la stabilité de certains ARN. Elle possède un seul domaine RRM avec une affinité élevée pour 20 adénosines (Figure 12)

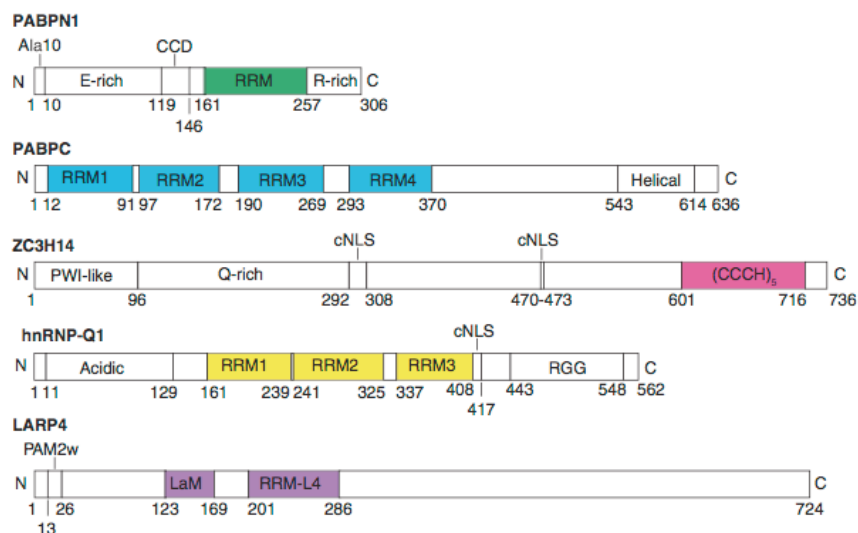


Figure 12: Structure des protéines de liaison à la queue poly(A).

Chez les mammifères différentes protéines de liaison à la queue poly(A) existent. Elle se trouvent dans le noyau ou dans le cytoplasme et possèdent toutes (à part ZC3H14) des domaines RRM (Wigington et al., 2014b).

2.2. Structure du gène PABPN1

Chez les mammifères le gène PABPN1 code une protéine nucléaire ubiquitaire de fixation de la queue poly(A) des ARN qui a initialement été appelée PABII, puis renommée PABPN2 mais est maintenant appelée PABPN1 pour « Poly(A) binding protein nuclear 1 » (Kühn, Wahle, 2004 ; Nemeth et al., 1995 ; Wahle, 1991). Le génome humain contient un seul gène *PABPN1* à la position 14q11 (numéro d'accèsion NCBI AF026029) (Brais et al., 1998) et un pseudogène au niveau Xq12-q13 (numéro d'accèsion NCBI Y08772). La séquence génomique est d'environ 6kb (Brais et al., 1998) et contient 7 exons et 6 introns plus les séquences non traduites en protéine en 5' et 3' (5' et 3' UTR), et est transcrite selon une orientation centromère vers télomère. Le gène a d'abord été cloné chez le bœuf (Nemeth et al., 1995) et ensuite chez l'homme (Brais et al., 1998). Des études contradictoires ont mis en évidence différentes formes du transcrit. Brais et al rapportent deux formes majoritaires, l'une contenant le transcrit totalement épissé et l'autre un transcrit avec la rétention de l'intron 1 et 6 (Brais et al., 1998) (Figure 13). Une étude effectuée dans des cellules humaines a mis en évidence par Northern Blot la présence de deux transcrits de *PABPN1* de taille différente de 1,1 et 3,5 kilobase (kb). Le premier transcrit correspond à la forme épissée tandis que l'autre contient les introns 2 et 6 et représente la forme majoritaire (Corbeil-Girard et al., 2005) (Figure 14). Cependant récemment une étude recherchant le

niveau d'expression de PABPN1 dans différents tissus humain et murins, a mis en évidence par Northern Blot la présence de 2 transcrits de 2,1 et 1,4 kb chez la souris. Ces transcrits contiennent un 3'UTR différent résultant d'un mécanisme de polyadénylation alternative (alternative polyadenylation en Anglais = APA). La forme avec le 3'UTR long formée par l'utilisation d'un site de polyadénylation distale est majoritaire (Apponi et al., 2013) (Figure 15)

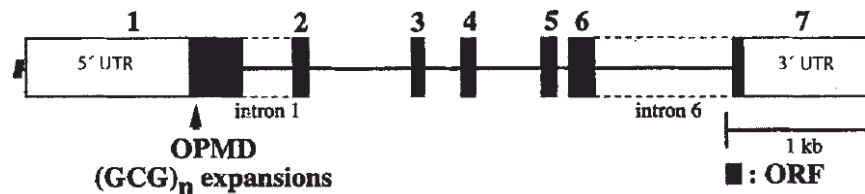


Figure 13: Structure génomique de *PABPN1* décrite par Brais *et al.*

Les rectangles noirs représentent la séquence codante. Sont aussi représentées avec des rectangles blancs les séquences 5' et 3' UTR. Les rectangles avec des pointillés représentent les introns retrouvés dans l'ARNm (Brais *et al.*, 1998).

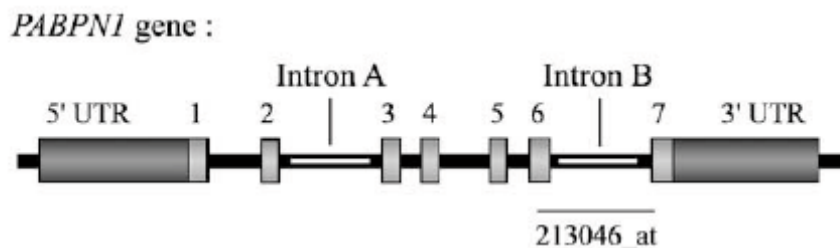


Figure 14: Structure génomique de *PABPN1* décrite par Corbeil-Girard *et al.*

Les rectangles gris clair représentent la séquence codante. Sont aussi représentées avec des rectangles gris foncés les séquences 5' et 3' UTR. Les introns A et B sont retrouvés dans certains transcrits matures de *PABPN1* (Corbeil-Girard *et al.*, 2005).



Figure 15: Structure des transcrits de *PABPN1* décrits par Pavlath *et al.*

Les rectangles noirs représentent la séquence codante. Sont aussi représentées avec des rectangles blancs les séquences 5' et 3' UTR. Deux formes de 3'UTR différentes existent résultant d'un APA (Apponi *et al.*, 2013).

La séquence génique est très similaire chez l'homme, le bœuf et la souris. Dans cette dernière espèce, le gène *PABPN1* encode une protéine identique à 96% avec la protéine PABPN1 bovine et à 95% avec la protéine humaine. La protéine PABPN1 bovine est similaire à 99% avec la protéine humaine (Lee et al., 1998).

2.3. Structure de la protéine PABPN1

La protéine PABPN1 est composée de 306 acides aminés et possède une masse moléculaire théorique de 32,8 kDa (kiloDalton) mais détectée autour de 49 kDa lors de la migration en SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) (Kerwitz et al., 2003). La protéine PABPN1 peut être divisée en 3 domaines principaux : un domaine N-terminal riche en acide aminé acides, un domaine central avec un motif RRM et un domaine C-terminal riche en arginine. Dans le domaine N-terminal, la première méthionine est immédiatement suivie par une séquence d'alanine. La protéine PABPN1 possède un seul motif RRM et en amont un domaine superhélice (ou domaine coiled-coil) formant une hélice alpha composée d'environ 30 acides aminés (Banerjee et al., 2013). La partie N-terminale est essentielle pour la stimulation de la polyadénylation via la PAP par l'intermédiaire du domaine coiled-coil, tandis que le domaine RRM et la partie C-terminale sont nécessaires pour la fixation de la queue poly(A) et l'oligomérisation de la protéine qui peut se produire en absence d'ARN. Le domaine C-terminal contient aussi le signal de localisation nucléaire (nuclear localisation signal en Anglais = NLS) (Kerwitz et al., 2003 ; Kühn et al., 2003). Le domaine RRM est hautement conservé parmi les espèces alors que le domaine N-terminal est quant à lui plus variable. *In vitro* la partie N-terminale n'est pas nécessaire pour la fixation sur l'ARN (Kühn et al., 2003) et aucune structure tertiaire n'a pu être détectée dans ce domaine (Lodderstedt et al., 2008 ; Sackewitz et al., 2008) (Figure 16)

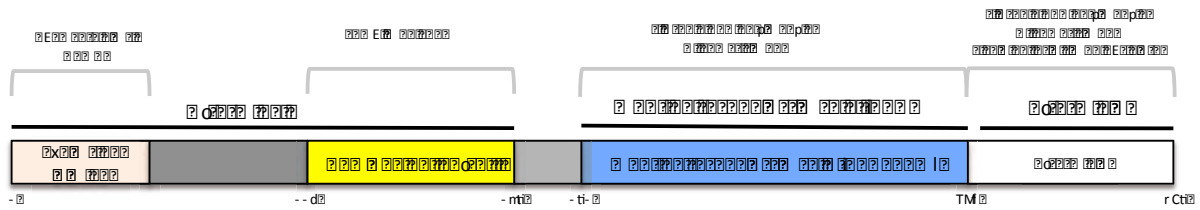


Figure 16: Domaines structuraux de la protéine PABPN1.

La protéine PABPN1 est composée de 3 grands domaines. Un domaine N-terminal contenant une séquence de 10 alanines et un élément coiled-coil, un domaine central contenant le motif de reconnaissance de l'ARN (RRM) nécessaire pour la fixation de l'ARN et l'oligomérisation, et un domaine C-terminal qui contient le domaine de localisation nucléaire et qui intervient aussi dans la reconnaissance de l'ARN et l'oligomérisation. Modifié d'après (Banerjee et al., 2013)

2.4. Expression de la protéine PABPN1

PABPN1 est une protéine ubiquitaire conservée parmi les eucaryotes. Apponi *et al* ont récemment démontré que chez l'homme et chez la souris, PABPN1 est très faiblement exprimée dans le muscle strié squelettique comparé aux autres organes (foie, reins, cerveau, cœur, intestin, poumon, rate). De plus dans la même étude les auteurs ont montré qu'au sein du tissu musculaire l'expression de la protéine PABPN1 n'est pas homogène. Elle est plus faible dans les muscles de la langue et du pharynx comparé à d'autres muscles du tronc (Apponi et al., 2013). L'expression de PABPN1 en ARN dans le muscle a aussi été montrée comme significativement diminuée au cours du vieillissement (Anvar et al., 2013). Il a été mis en évidence par Northern Blot la présence de 2 transcrits de PABPN1 : l'un avec un 3'UTR long et l'autre avec un 3'UTR court (voir paragraphe alternative polyadénylation). La faible expression retrouvée dans le muscle serait causée par une instabilité du transcrit majoritaire contenant un 3'UTR long alors que ce même transcrit est stable dans les myoblastes en culture. De façon intéressante lors d'une régénération musculaire, l'expression en ARN mais aussi en protéine de PABPN1 augmente pour ensuite revenir à un état basal. Cette étude qui met ainsi en évidence une régulation post-transcriptionnelle de PABPN1 (Apponi et al., 2013) est confortée par celle de Bergeron *et al*, qui a montré une autorégulation de PABPN1 par un mécanisme de rétention de son dernier intron et la dégradation de son ARN (Bergeron et al., 2015).

2.5. Les fonctions moléculaires de PABPN1

PABPN1 a d'abord été décrit comme un facteur de polyadénylation. Récemment de nouvelles fonctions dans la régulation post-transcriptionnelle des ARN ont été décrites. PABPN1 apparaît ainsi comme un facteur essentiel dans le contrôle de la qualité et de l'expression génique.

2.5.1. Mécanisme de polyadénylation

En 1991 Wahle *et al* identifient la protéine PABPN1 comme un facteur intervenant dans l'élongation de la polyadénylation, deuxième étape de la réaction. PABPN1 a été identifiée par immunoprécipitation avec le complexe PAP/CPSF. Par des études biochimiques il a été montré *in vitro* que le domaine RRM de PABPN1 lie préférentiellement les séquences poly(A), les séquences poly(G) presque aussi fortement, les poly(U) environ 100 fois moins et les poly(C) pas du tout. La présence de 10 adénosines au minimum est nécessaire pour que PABPN1 puisse se fixer sur la molécule d'ARN (Kühn *et al.*, 2003 ; Nemeth *et al.*, 1995) et toutes les adénosines de la queue poly(A) des ARNm sont recouvertes par des protéines PABPN1 (Kühn *et al.*, 2003). Sans PABPN1 la réaction de polyadénylation est lente et inefficace. Par ailleurs, même si le complexe CPSF n'est pas indispensable, la réaction est plus efficace en sa présence (Wahle, 1991). Ainsi les protéines CPSF et PABPN1 coopèrent pour stimuler la protéine PAP conduisant à une processivité élevée de la réaction de polyadénylation qui est *in vitro* d'une durée d'environ 1 minute pour l'ajout de 200 à 300 adénosines. Les protéines CPSF, PAP et PABPN1 forment un complexe qui stabilise la molécule d'ARN (Bienroth *et al.*, 1993). Le rôle de PABPN1 dans la polyadénylation a été confirmé chez la drosophile avec un mutant déficient en Pab2 (homologue de PABPN1) qui présente aussi un raccourcissement de la queue poly(A) des ARNm (Benoit *et al.*, 2005), et plus récemment sur des myoblastes primaires de souris qui présentent un raccourcissement de la queue poly(A) des ARNm totaux lorsque l'expression de PABPN1 est diminuée par ARN interférence (RNAi) (Apponi *et al.*, 2009). Cependant une étude contradictoire a montré dans des cellules non musculaires que l'extinction de PABPN1 par RNAi n'a pas d'effet sur le niveau transcriptionnel des ARNm ni sur la longueur de la queue poly(A) de certains ARNm pris individuellement (Beaulieu *et al.*, 2012).

2.5.2. Régulation de la taille de la queue poly(A)

La queue poly(A) des ARNm joue un rôle dans le métabolisme de l'ARN et dans l'initiation de la traduction. Sa longueur est importante pour le contrôle de la quantité de protéines correspondantes, elle est donc hautement régulée. Chez la levure, elle est d'environ 70 à 90 adénosines et d'environ 250 chez les mammifères. Lorsque la queue poly(A) a atteint sa longueur finale la réaction de polyadénylation ralentit. Le contrôle de la longueur de la queue poly(A) nécessite la présence des protéines CPSF, PAP et PABPN1 et est associé à la fixation stœchiométrique de plusieurs monomères de PABPN1 à la queue poly(A) nouvellement synthétisée. Le modèle mis en évidence *in vitro* est le suivant : la protéine CPSF fixée sur l'ARN recrute la PAP permettant l'ajout des premiers adénosines. PABPN1 vient ensuite recouvrir la queue poly(A) et stimuler la PAP. L'interaction entre PAP et CPSF est nécessaire et PABPN1 forme ainsi une boucle sphérique sur la queue poly(A) en synthèse. Quand la taille de la queue poly(A) atteint 250 résidus adénosines, une déstabilisation du complexe a lieu abolissant l'interaction entre PAP et CPSF. La réaction devient lente à nouveau. Dans ce modèle PABPN1 contrôle le nombre de résidus adénosines ajoutés (Wahle, 1995). La boucle formée par PABPN1 sur la queue poly(A) a été visualisée par microscopie à force atomique: la protéine forme des particules sphériques de 21 nanomètres de diamètre en présence d'oligo(A). Ce diamètre est atteint via des séquences de 200 à 300 adénosines et en dessous de 200 adénosines ces particules sont plus petites. Plus la longueur de la séquence poly(A) augmente plus le nombre de particules sphérique de 21nm augmente en parallèle (Meyer et al., 2002 ; Wahle et al., 1993) (Figure 17).

Même si la longueur de la queue poly(A) est finement contrôlée, une certaine hétérogénéité dans la population des ARNm peut être observée. Cette hétérogénéité provient d'un raccourcissement cytoplasmique, appelée déadénylation (Eckmann et al., 2011 ; Kühn et al., 2009).

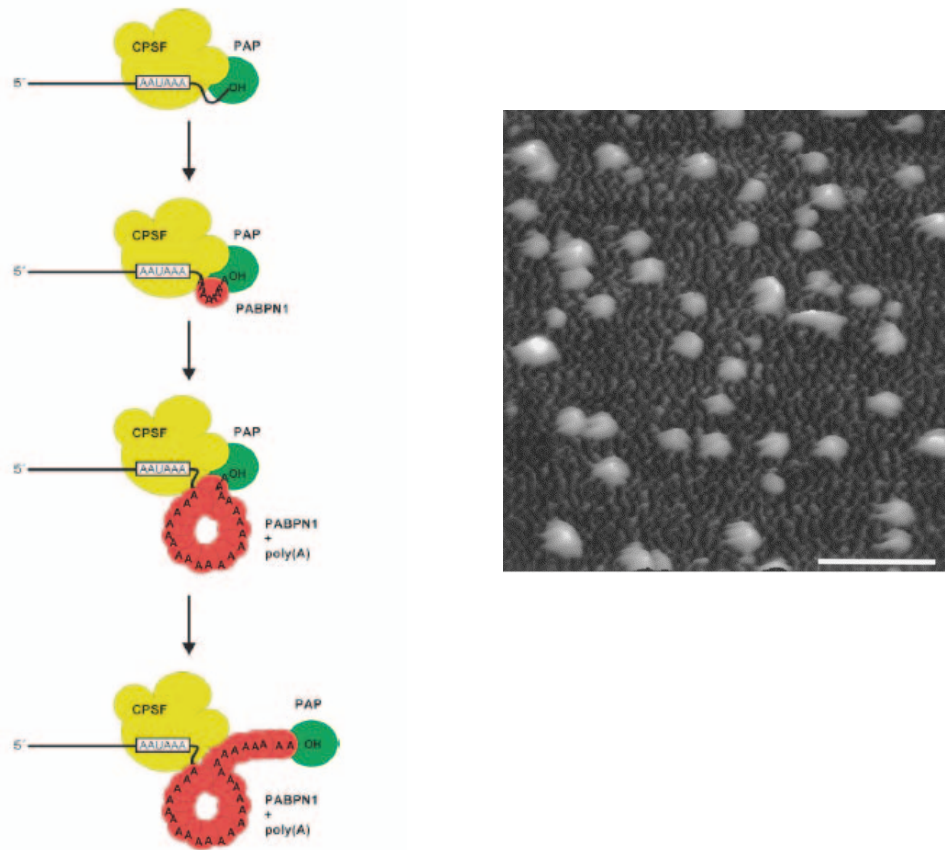


Figure 17: Gauche - Modèle du contrôle de la longueur de la queue poly(A). Droite - Image en microscopie à force atomique de complexes PABPN1-poly(A) formés *in vitro*.

*Gauche : CPSF lie l'ARN sur sa séquence consensus et recrute la protéine PAP. La protéine PABPN1 rejoint le complexe quand la queue poly(A) atteint 10 adénosines. PABPN1 recouvre la queue poly(A) au cours de la réaction formant une structure sphérique et permettant le contact entre CPSF et PAP ce qui favorise la processivité de la réaction. Lorsque la queue poly(A) atteint 250 adénosines, PABPN1 ne peut plus former de structure sphérique et le contact CPSF-PAP n'est plus maintenu (Kühn et al., 2009). Droite : Des particules sphériques sont formées *in vitro* quand PABPN1 est en contact avec de l'ARN polyadénylé. Elles ont une taille maximum de 21 nm (Keller et al., 2000).*

2.5.3. Export nucléaire

Bien qu'il s'agisse d'une protéine nucléaire, la protéine PABPN1 peut se retrouver de façon transitoire dans le cytoplasme avant de retourner dans le noyau. La fraction cytoplasmique reste cependant présente à proximité de la membrane nucléaire. Les protéines de taille relativement petites sont en général capables de diffuser à travers les pores nucléaires. La protéine PABPN1 fait partie de cette catégorie ce qui fait qu'elle serait en théorie capable de

diffuser à travers les pores nucléaires mais il a été montré par des études biochimiques *in vitro* que son import dans le noyau se fait de façon active via son signal de localisation nucléaire nécessitant la fixation sur une protéine de type transportine et que son export est dépendant d'une protéine porteuse. Il est cependant indépendant du trafic de l'ARN polyadénylé. Grâce à sa capacité à migrer dans le cytoplasme la protéine PABPN1 participe à l'export des ARNm du noyau vers le cytoplasme. (Calado, Kutay, et al., 2000) et cela a été confirmé *in vitro* : l'extinction de PABPN1 par RNAi dans des myoblastes de souris conduit à une accumulation des ARNm dans le noyau (Apponi et al., 2009).

2.5.4. Régulation de la polyadénylation alternative

La polyadénylation alternative (APA) est un mécanisme important de la régulation génique qui permet chez les eucaryotes de produire des isoformes différentes à partir d'un même ARNm par l'utilisation de différents signaux de polyadénylation présents au niveau du pré-ARNm. L'APA est ainsi un mécanisme de régulation transcriptionnelle classique dans la réponse immunitaire. La majorité des APA se produit au niveau du 3'UTR mais certaines APA peuvent aussi avoir lieu au niveau de la séquence codante, des introns, du 5'UTR et des régions intergéniques (Ji et al., 2015). L'APA permet de produire à partir d'un même pré-ARN des ARN codant des protéines différentes ou avec une séquence 3'UTR différente. La séquence 3' UTR est importante pour le contrôle de l'expression génique car elle conduit à la présence ou non de site de liaison à des microARN et à des protéines de liaison à l'ARN qui stabilisent ou déstabilisent le transcrit comme la protéine Upf1 impliquée dans le mécanisme du non sense mediated decay (NMD) (Erkelenz et al., 2013). Plusieurs paramètres peuvent réguler l'utilisation de PAS : la séquence nucléotidique, la distance entre deux PAS, l'efficacité de l'élongation de la transcription mais aussi l'encombrement stérique par la concentration en facteurs impliqués dans le métabolisme en 3' des ARNm (Davis, Shi, 2014). Chez les eucaryotes supérieurs plus de la moitié des ARNm ont une sélection de PAS variable (Proudfoot, 2011).

Par un crible par RNAi ciblant des protéines de liaison à l'ARN, il a été mis en évidence que la protéine PABPN1 est un régulateur important du choix de PAS au niveau du 3'UTR. Lorsque l'expression de PABPN1 est diminuée l'usage de PAS proximaux (par rapport au promoteur) est favorisé au profit des PAS distaux (par rapport au promoteur) à fort consensus dans plus de 90% des transcrits analysés. Les sites proximaux contiennent généralement des séquences non canoniques (AAUAAA) donc sont plus faible pour recruter

le complexe CPSF que les sites distaux (Simonelig, 2012). Il semblerait que PABPN1 interagisse directement avec les PAS entrant ainsi en compétition avec le complexe CPSF. Lorsque le PAS est canonique la reconnaissance du complexe CPSF est favorisée au détriment de PABPN1 qui se fixe alors sur les sites proximaux empêchant leur usage. De cette manière PABPN1 régule de façon indirecte l'expression de nombreux transcrits en favorisant la présence de longs 3'UTR qui servent ainsi de cible à des microARN (Jenal et al., 2012).

2.5.5. Surveillance et dégradation des ARNs

L'état d'équilibre d'un ARN est déterminé par une balance entre sa synthèse et sa dégradation. La demi-vie est très variable allant de 15 min à 10 heures en fonction du type considéré. Cependant pour un ARN donné sa demi-vie varie très peu elle mais peut toutefois être modifiée en fonction de stimuli externes (Jacobson, Peltz, 1996). Les mécanismes de dégradation des ARN sont nombreux et existent chez toutes les espèces vivantes. Ils interviennent dans le métabolisme des ARN mais aussi dans la dégradation des introns après que ceux-ci aient été retirés de la molécule de pré-ARN. Ils sont aussi responsables de la dégradation des ARNm non correctement maturés (structure tridimensionnelle, modifications post-transcriptionnelles, épissage, export) lors d'étapes de contrôle qualité. Trois grandes classes d'enzymes de dégradation de l'ARN existent (appelées ribonucléases ou RNAses) : des endonucléases, des 5' exonucléases et 3' exonucléases qui vont respectivement hydrolyser l'ARN en interne ou à partir des extrémités. Le complexe exosome eucaryote qui est retrouvé à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme, présente des activités 3' exonucléases et endonucléases et le complexe humain multiprotéique de polyadénylation TRAMP (contenant une protéine hélicase, une protéine de type PAP et une protéine de liaison à l'ARN) intervient comme cofacteur de ce complexe exosome. Ensemble ils interviennent dans la surveillance nucléaire des ARN nécessitant une étape de polyadénylation pour initier la dégradation des ARN par les exosomes. Ainsi lorsqu'un ARN nucléaire est déficient il est hyperadénylé comme marqueur de dégradation par le complexe TRAMP pour ensuite recruter les exosomes. Des études ont en effet montré qu'environ 30 nucléotides non liés par des protéines doivent être présents pour fixer le canal central du cœur du complexe exosomique conduisant ainsi à la dégradation de la molécule d'ARN (Anderson, Wang, 2009 ; Bresson, Conrad, 2013). Dans cette voie métabolique la

queue poly(A) sert à la fois à contrôler l'état d'équilibre de la molécule d'ARN mais aussi de levier pour dégrader les ARN non correctement maturés.

Des études réalisées par Beaulieu *et al* et Bresson *et al* ont montré que les protéines PAP et PABPN1 font partie des cofacteurs impliqués dans ce processus qui a récemment été nommé « PABPN1 and PAP mediated RNA decay » (PPD) (Beaulieu *et al.*, 2012 ; Bresson, Conrad, 2013 ; Bresson *et al.*, 2015). Dans ce mécanisme l'activation de PAP dépendante de PABPN1 et indépendante de CPSF stimule la polyadénylation qui est reconnue comme de l'hyperadénylation car ayant lieu après l'étape de maturation en 3' des ARN. Cette voie semble permettre de contrôler à la fois le niveau d'expression de nombreuses classes d'ARN mais aussi à les dégrader lorsqu'ils ne sont pas correctement maturés et fait intervenir le complexe TRAMP/exosomes. Différentes classes d'ARN semblent régulées par ce mécanisme : des ARN non codant, comprenant des transcrits en amont des promoteurs (promoter upstream transcripts - PROMPT en Anglais), des ARN anti-sens, des pré-microARN, des longs ARNs non codants et des ARN non codant hôtes de gènes snoRNA (non coding snoRNA host genes - ncSNGH en Anglais). Une faible mais significative proportion d'ARNm est effectivement la cible de cette voie de dégradation. Les PROMPT est la classe la plus impactée par inactivation de la voie PPD. De façon intéressante il semblerait que les transcrits ayant moins d'exons ou subissant moins d'épissage sont plus susceptibles d'être une cible de la voie PPD. Les ARN avec une rétention d'intron et ceux où l'épissage n'est pas correctement effectué sont dégradés par la voie PPD. Dans ce dernier cas, une majorité des transcrits soumis au PPD sont des ARN avec un seul exon. L'hypothèse proposée par les auteurs est que l'épissage conduit à la formation d'une molécule RNP qui est transloquée vers le cytoplasme échappant à cette voie de dégradation (Bresson, Conrad, 2013). Le même mécanisme a été retrouvé pour la maturation de la partie 3' de l'ARN télomérique (hTR) chez l'homme, qui sert de matrice à la protéine « human reverse transcriptase hTERT » pour l'élongation des télomères. Il s'agit d'un ARN non polyadénylé dans sa forme mature mais passe par une étape d'hyperadénylation de son précurseur. Cet ARN contient la séquence nécessaire pour l'élongation graduelle des télomères avec un domaine conservé parmi les petits ARN nucléolaire (Small nucleolar RNA = snoRNAs en Anglais) et les petits ARN avec un motif spécifique des corps de Cajal (Small Cajal body-specific RNAs = scaRNA en Anglais). Le contrôle de sa maturation passe par le raccourcissement de sa queue poly(A) qui est dépendante de la protéine PABPN1 et de la protéine PARN (poly(A)-specific RNase). Cette voie est en compétition avec celle de dégradation qui elle est dépendante du complexe TRAMP/exosome. Ensemble elles

permettent de réguler son niveau d'expression. Ainsi au cours de cette étude il a été montré que PABPN1 intervient dans la maintenance des télomères en interagissant directement avec l'ARN *hTR*. Une diminution de l'expression de PABPN1 conduit à une hyperadénylation de *hTR*, une accumulation de sa forme non mature, et donc au raccourcissement des télomères par une dysfonction de l'activité de la télomérase (Nguyen et al., 2015). Ce mécanisme est conservé au cours de l'évolution. Chez la levure *S. pombe* l'extinction de Pab2 (l'homologue de PABPN1) conduit à une hyperadénylation des ARN. Bien que globalement peu d'ARN voient leur état d'équilibre affecté, une augmentation de l'expression des snoRNAs est retrouvée chez ces mutants déficients en Pab2 (Δ Pab). Non polyadénylés dans leur forme mature ces snoRNA s'accumulent sous forme polyadénylés dans les souches Δ Pab dont la protéine interagit normalement avec Rrp6 et Dis3, deux exonucléases du complexe exosomique. En condition sauvage la protéine Pab2 est retrouvée à l'extrémité 3' des snoRNA polyadénylés et semble nécessaire pour l'étape de déadénylation par le complexe exosomique nucléaire, étape nécessaire pour obtenir un SnoRNP mature. Dans le cas où l'ARN serait incorrectement maturés il est dégradé par le complexe TRAMP/exosome (Lemay et al., 2010).

2.5.6. Régulation de l'épissage

L'épissage a lieu co-transcriptionnellement : pour environ 80% des transcrits : les facteurs d'épissages sont recrutés au niveau de l'ARN pol II et se fixent sur l'intron quand il vient d'être transcrit (Girard et al., 2012 ; Vargas et al., 2011). Cependant, certaines réactions d'épissage peuvent avoir lieu post-transcriptionnellement après l'étape de polyadénylation. Dans ce cas le pré-ARN contient une queue poly(A) et l'intron est retiré ultérieurement. Ceci se produit majoritairement pour les introns terminaux, à proximité de PAS. L'épissage et l'étape de clivage et polyadénylation (CPA) sont interconnectés dans un même processus pour définir l'exon terminal et nécessite la fixation de protéines qui lient à la fois la queue poly(A) et le 3'ss. Il a été récemment montré que PABPN1 joue un rôle dans ce mécanisme : l'extinction de PABPN1 par RNAi diminue l'épissage du dernier intron de certains transcrits ayant déjà réalisé l'étape CPA. Ainsi PABPN1 semble coordonner l'épissage de certains transcrits du dernier intron en présence à la fois de la queue poly(A) et de la protéine PAP. Les auteurs suggèrent la polyadénylation est nécessaire pour permettre la fixation de facteurs d'épissages et lorsque l'expression de PABPN1 est diminuée leur fixation l'est aussi. Dans le même ordre d'idée la protéine CPSF est nécessaire pour la définition de

l'exon terminal et sa fixation au niveau du 3'UTR nécessite la protéine PABPN1, ainsi lorsque l'expression de cette dernière est diminuée cela impacte la fixation de CPSF. Les transcrits avec une rétention d'intron sont ensuite dégradés par le complexe exosomique. Peu de transcrits semblent être réellement impactés par ce processus. Une des explications pourrait être que ce mécanisme ne se met en place que lorsque se produit une compétition pour la fixation de protéine entre les sites PAS à fort consensus avec un site d'épissage faible (Muniz et al., 2015).

De façon intéressante il a été montré que la protéine PABPN1 s'autorégule par un mécanisme de rétention d'intron. Le dernier intron de *PABPN1* régulé en partie par SRSF10 contient un site d'épissage en 5' à faible consensus conduisant à un épissage faiblement efficace responsable de ce mécanisme d'autorégulation. Quand le niveau de PABPN1 augmente, un processus de compétition se met en place : PABPN1 se lie dans une zone riche en A au niveau du 3'UTR de l'ARN de *PABPN1* à quelques nucléotides d'une séquence de fixation de SRSF10 empêchant la fixation du facteur. L'ARN résultant contenant l'intron terminal est ensuite dégradé par le complexe d'exosome nucléaire. Ce mécanisme semble avoir lieu co-transcriptionnellement (Bergeron et al., 2015). Chez la levure, Nab2 régule également son propre niveau d'expression par un mécanisme d'hyperadénylation de la queue poly(A) de son ARN par le complexe TRAMP suivie par une dégradation via le complexe exosomique (Roth et al., 2005).

2.5.7. Transcription

Kim *et al* ont montré par des expérimentations de surexpression une interaction entre PABPN1 (plus particulièrement la partie N-terminale), la protéine ski-interacting protein (SKIP) au niveau des speckles et le facteur de transcription MyoD. Cette interaction, mais aussi les protéines individuelles surexprimées, activent le facteur de transcription MyoD conduisant à l'expression de plusieurs transcrits myogéniques (MyoD, myogenin, MLC1a) et à une stimulation de la différenciation. Les auteurs mettent ainsi en évidence un rôle de PABPN1 comme cofacteur de transcription des gènes muscles spécifiques (Kim et al., 2001)

2.5.8. Les fonctions cytoplasmiques de PABPN1

Malgré le fait que la protéine ne se retrouve que transitoirement dans le cytoplasme, il a été démontré qu'elle possède des fonctions dans ce compartiment cellulaire. Lorsqu'un ARNm

contient un codon stop prématuré, il est dégradé par le NMD. De nombreuses protéines sont impliquées dans ce mécanisme de dégradation qui est dépendant de l'étape de traduction pour la reconnaissance de codons non-sens. Les protéines nucléaires CBP20 et CBP80, composantes du complexe de liaison à la coiffe nucléaire des ARNm, mais aussi la protéine PABPN1 (et les protéines du complexe exon jonction (EJC) et du NMD) sont retrouvées au niveau des transcrits nouvellement synthétisés durant l'étape dite de pré-traduction (« pioneer round of translation » en Anglais) qui sert de contrôle qualité des ARNm. Cette étape nécessite la présence du premier ribosome qui va reconnaître le codon stop comme étant prématuré ou terminal. Lors de cette étape, les ARN peuvent servir de cible au NMD qui a lieu soit dans le noyau ou à proximité (majorité des transcrits) soit dans le cytoplasme (Maquat, 2004) (Ishigaki et al., 2001). PABPN1 accompagne l'ARN lors de cette étape de contrôle qualité. Si la molécule d'ARN ne contient pas de codon stop prématuré, la protéine PABPN1 est remplacée par la protéine PABPC1 dans le cytoplasme (Maquat et al., 2010). Une autre fonction cytoplasmique de PABPN1 a été mise en évidence exclusivement chez la drosophile pour le moment : PABPN1 (PABP2) régule la taille de la queue poly(A) de certains ARNm cytoplasmiques via le complexe de deadénylation CCR4/NOT et PABP (homologue de PABPC1 chez la drosophile). Cette fonction est essentielle dans la régulation de l'embryogenèse dans les premiers stades du développement de la mouche (Benoit et al., 2005).

3. La dystrophie musculaire oculopharyngée (OPMD)

Une expansion anormale de triplets GCN dans le premier exon du gène *PABPN1* conduit à une maladie du muscle appelée la dystrophie musculaire oculopharyngée.

3.1. Le muscle strié squelettique

Le muscle strié squelettique est un des tissus les plus plastique et dynamique du corps humain. Chez l'homme il constitue environ 40% du poids du corps et contient 50 à 75% de toutes les protéines. Le muscle squelettique contribue à différentes fonctions mécaniques et métaboliques : il convertit l'énergie chimique présente sous forme de molécule d'ATP en énergie mécanique pour générer de la force et produire un mouvement. Il participe au métabolisme basal, sert de réserve pour divers substrats (acide aminés, sucres), produit de la chaleur (Emery, 2002) et sert aussi à la sécrétion de protéines de signalisation qui agissent

de manière autocrine et paracrine (Le Bihan et al., 2012). Le muscle squelettique est constitué par un arrangement de fibres musculaires (myofibrilles ou cellules musculaires) et de tissu conjonctif associé. La taille d'un muscle est déterminée principalement par le nombre et la taille des fibres individuelles qui le composent.

D'un point de vue structurel le muscle est entouré par une couche de tissu conjonctif appelée *épimysium*. Les fibres musculaires sont associées en faisceaux et entourées par une autre couche de tissu conjonctif appelée *périmysium*. La membrane basale de la fibre musculaire est constituée de différentes protéines liées physiquement au cytosquelette. Les fibres sont composées de myofibrilles qui s'assemblent de manière ordonnée et de façon très caractéristique (Figure 18).

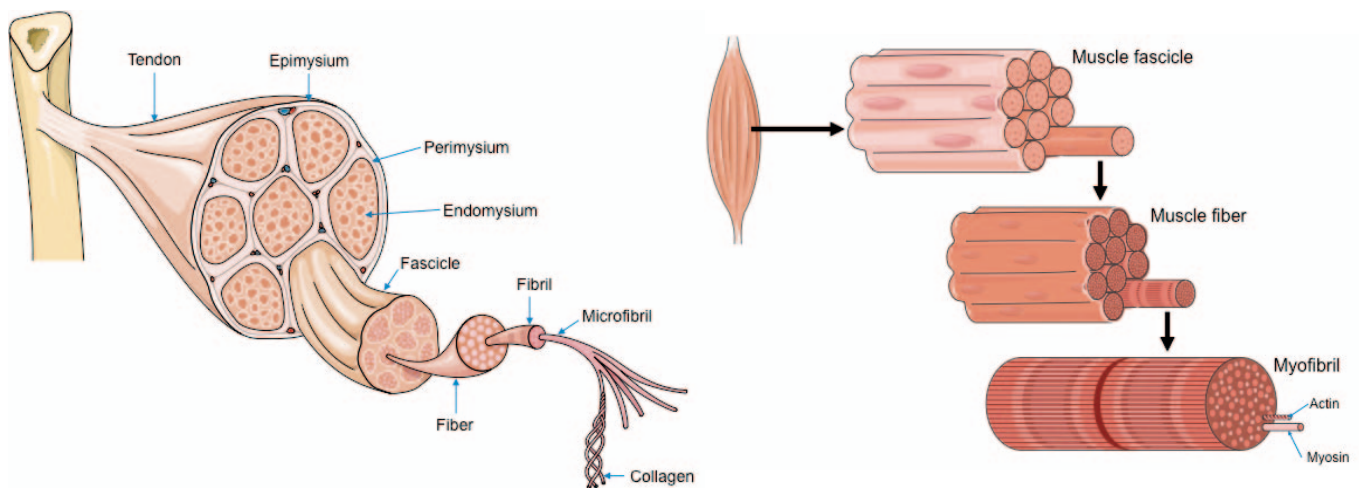


Figure 18: Gauche - Représentation d'une coupe transversale d'un muscle strié squelettique. Droite - Représentation de la structure et de l'ultrastructure d'un muscle strié squelettique.

D'après (Banque d'images Power Point - Servier)

L'unité contractile du muscle appelée sarcomère est formée par les myofilaments. Ces derniers sont constitués de deux principales protéines que sont l'actine (filaments fins) et la myosine (filaments épais) dont l'interaction est responsable de la contraction du muscle et la génération de force. Le sarcomère contient aussi d'autres protéines qui participent à la régulation de la contraction, à la structure du cytosquelette, au couplage excitation/contraction, à la libération d'énergie et à la production de la force. La contraction du muscle strié squelettique est régulée par la concentration de calcium intracellulaire et par les filaments fins de troponine et de tropomyosine. La tête de myosine contient des sites de fixation pour l'actine mais en absence de contraction l'interaction est bloquée par un

encombrement stérique de la tropomyosine et du complexe troponine. Ce dernier comprend trois sous-unités : troponine I (TnI) (qui inhibe l'interaction actine-myosine), troponine C (TnC) (qui fixe une molécule de calcium) et troponine T (TnT) (qui fixe le complexe troponine à la tropomyosine) qui interagissent fortement entre elles. En absence de calcium, l'interaction entre la myosine et l'actine est inhibée par la TnI et la tropomyosine mais lorsque que le calcium est libéré par le réticulum sarcoplasmique dans le cytoplasme, il se fixe au niveau de la TnC conduisant à un changement de conformation des autres sous unités du complexes et libérant les sites de fixation de la myosine au niveau de l'actine. Au repos la tête de myosine est associée avec une molécule d'Adénosine DiPhosphate (ADP) et un phosphate inorganique. La fixation de la myosine au niveau de l'actine déplace le phosphate inorganique ce qui fait pivoter la tête de myosine et conduit à un changement de conformation qui permet une substitution d'une molécule d'ATP pour une molécule d'ADP (Figure 19). L'hydrolyse d'une molécule ATP permet le détachement des têtes de myosine au niveau de l'actine. L'interaction actine-myosine continue aussi longtemps que la concentration de calcium cytoplasmique reste suffisamment haute. La relaxation du muscle a lieu quand le calcium est réabsorbé par le réticulum endoplasmique par une pompe appelée SERCA (Hopkins, 2006).

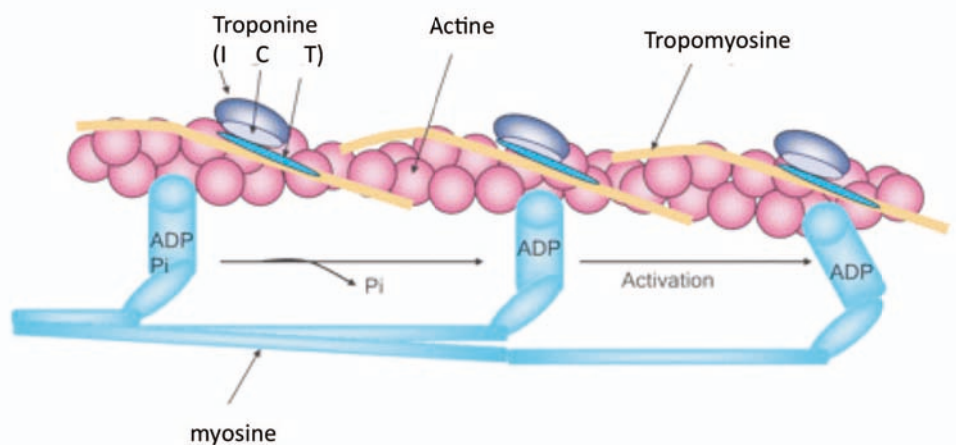


Figure 19 : Représentation de l'interaction entre les filaments fins et épais de la fibre musculaire

Trois têtes de myosine montrent les étapes progressives de la contraction musculaire. Après la fixation de calcium sur la troponine C et l'exposition des sites de fixation de la myosine au niveau de l'actine, l'interaction entre tête de myosine et actine se produit. Ceci conduit à la libération d'un phosphate inorganique et le changement de position de la tête de myosine et le mouvement de l'actine. Modifié d'après (Hopkins, 2006).

Les myofibrilles sont multinucléées et post-mitotiques. Elles proviennent de la fusion de cellules mononucléées appelées myoblastes qui dérivent des cellules souches du muscle. Les cellules souches sont appelées cellules satellites lorsqu'elles sont situées entre la membrane plasmique (ou sarcolemme) et la lame basale, donc après la mise en place des fibres au cours du développement. Les cellules satellites contribuent à la croissance du muscle, la réparation et la régénération. Quiescentes à l'état basal, elles expriment le facteur de transcription Pax-7 (ou Pax-3 dans certains muscles). Elles sont activées par des lésions ou même par l'exercice et expriment alors les facteurs myogéniques (Myf-5, MyoD, Myogénine et MRF-4). Elles prolifèrent (Myf-5, MyoD), se différencient (Myogénine, MRF-4) et fusionnent pour former de nouvelles fibres (Bareja et al., 2014 ; Hawke, Garry, 2001). Il existe deux types majeurs de fibres: 1) les fibres lentes avec un métabolisme oxydatif, 2) les fibres rapides avec un métabolisme glycolytique. Si les premières sont utilisées pour des contractions de longues durées mais de faible intensité, les secondes servent à l'inverse pour les contractions de forte intensité mais de faible durée. La composition protéique mais aussi le métabolisme sont différents entre ces deux types et la densité volumique des mitochondries, définie par le ratio du volume occupé par les mitochondries sur le volume de la fibre, est de 2 à 3 fois supérieur dans les fibres lentes avec une capacité plus faible de synthèse d'ATP par la voie non oxydative. Ce ratio reflète le nombre et la taille des mitochondries. Ces organites sont essentiels dans un tissu nécessitant beaucoup d'énergie comme le muscle (Picard et al., 2012).

3.2. Les dystrophies musculaires

Les dystrophies musculaires (DM) constituent un groupe de maladies héréditaires hétérogène d'un point de vue clinique, génétique et aussi biochimique (Davies, Nowak, 2006 ; Emery, 2002). Ces maladies sont toutes caractérisées par une faiblesse et une fonte musculaire progressive. Elles présentent certaines caractéristiques histologiques communes au niveau d'une biopsie musculaire telles que des noyaux en position centrale signe d'une fibre récemment régénérée (les noyaux reprennent leur position périphérique rapidement chez l'homme, et plus lentement chez la souris), et l'accumulation de tissus fibreux et/ou adipeux. La faiblesse musculaire progressive peut affecter les muscles des membres, du tronc ou de la face à des degrés variables. Dans certains cas une atteinte d'autres organes comme le cerveau, la peau ou l'œil est observée. Les dystrophies musculaires conduisent à une perte progressive des fonctions musculaires mais également dans certains cas à des

difficultés respiratoires et dans les cas les plus graves à une mort prématurée (Davies, Nowak, 2006). L'âge d'apparition des symptômes, la sévérité, la rapidité de la progression de la maladie et le pronostic sont des paramètres extrêmement variables entre les différents types de dystrophies musculaires. Elles ont été classées en fonction de l'âge d'apparition des symptômes (périnatal ou adulte), le mode de transmission (lié au chromosome X, autosomique dominant ou récessif) et le groupe musculaire initialement atteint (muscles des ceintures, muscles faciaux, proximaux ou distaux) (Negroni et al., 2015). Sur la base de la distribution des muscles principalement affectés, six formes principales peuvent être définies (Emery, 2002) (Figure 20).

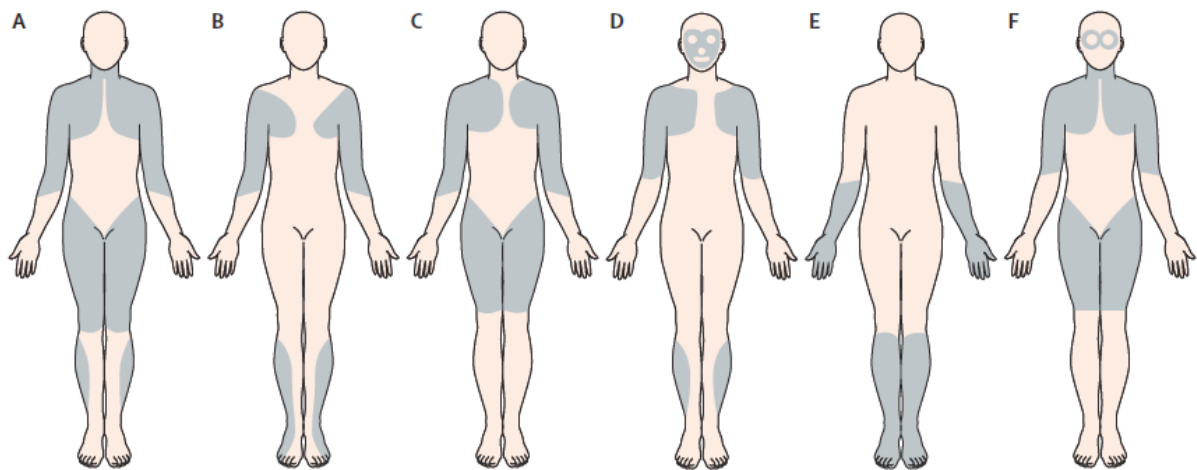


Figure 20: Répartition de la faiblesse musculaire retrouvée dans les principaux groupes de dystrophies musculaires.

A- dystrophie musculaire de Duchenne et de Becker, B- dystrophie musculaire d'Emery-Dreyfuss, C- dystrophie des ceintures, D- dystrophie fascioscapulohumeral, E- dystrophie musculaire distale, F- dystrophie musculaire oculopharyngée (Mercuri, Muntoni, 2013).

Les DM sont très hétérogènes : elles sont le plus souvent héritées ou dans certains cas causées par des mutations *de novo*. Une même mutation peut donner un tableau clinique variable entre différents individus et à l'inverse un même tableau clinique peut être causé par des mutations différentes. Par exemple, une mutation dans le gène *LMNA* peut induire la dystrophie musculaire d'Emery-Dreifus ou le syndrome de Hutchinson-Gilford, une pathologie caractérisée par un vieillissement prématuré ou encore la dystrophie musculaire d'Emery-Dreifus peut être causée par une mutation autosomique dominante dans le gène *LMNA* (Bonne et al., 1999) ou par une mutation liée au chromosome X dans le gène de

l'émerine (Bione et al., 1994). Muntoni *et al* recensait en 2013, 59 DM avec soit un tableau clinique soit une origine génétique différente (Mercuri, Muntoni, 2013).

Les DM peuvent être causées par des mutations dans des protéines associées à la fibre musculaire ou par des mutation dans des protéines non spécifiques du muscle. Les protéines impliquées peuvent être classées comme suit : 1) dystrophine ou protéines du complexe glycoprotéique associé à la dystrophine ; 2) protéines sarcomériques ou associées au sarcolemme ; 3) protéines de la matrice extracellulaire (MEC) ; 4) rotéines de la membrane externe ; 5) protéines de signalisation/enzymes ; 6) protéines nucléaires. Ainsi les protéines impliquées sont retrouvées à tous les niveaux de la fibre : dans la matrice extracellulaire, au niveau de la membrane plasmique, dans le sarcoplasme, à la membrane nucléaire ou dans le noyau (Figure 21)

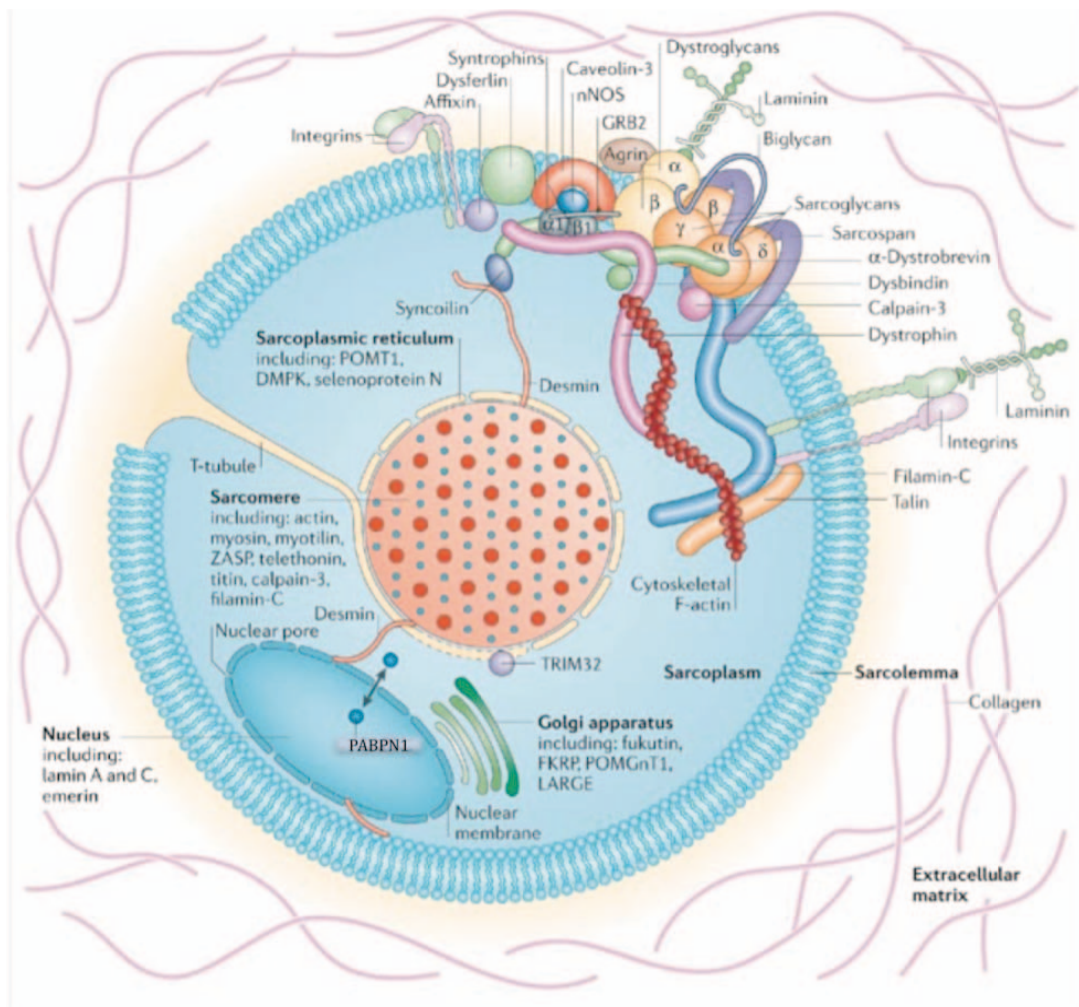


Figure 21: Représentation schématique d'une coupe transversale d'une fibre musculaire avec les différentes protéines impliquées dans des dystrophies musculaires

Modifié d'après (Davies, Nowak, 2006).

3.3. La découverte de l'OPMD

Bien que la première description d'un ptosis bilatéral congénital à apparition tardive dans une même famille française remonte à 1892 (Dutil, 1892), ce n'est qu'en 1915 que la première description des symptômes de la dystrophie musculaire oculopharyngée consistant en un ptosis familial progressif accompagné d'une dysphagie dans les 4 membres d'une famille canadienne, a été effectuée par Taylor *et al* (Taylor EW, 1915). La même famille a ensuite été étudiée en 1963 par Hayes *et al*, avec une confirmation du ptosis et de la dysphagie dans les générations suivantes (Hayes et al., 1963). Par la suite, diverses études de cas de ptosis familiaux ont été rapportées (Amyot, 1948b, 1948a). Chez certains patients présentant une dysphagie la pathologie a été classifiée comme myopathie craniale (Compston, 2008). Le terme de dystrophie musculaire oculopharyngée n'apparaît dans la littérature qu'en 1962 comme un syndrome arrivant après le milieu de la vie et faisant partie des myopathies oculaires avec ou sans dystrophie musculaire généralisée (Victor et al., 1962). Dans cette étude Victor *et al* publient un tableau clinique de l'OPMD classant la maladie dans la catégorie des maladies musculaires et, par des analyses de ségrégation de la maladie, démontrant son caractère héréditaire avec une possible dominance dans la transmission. Par des études généalogiques le neurologue André Barbeau a montré qu'il était possible de tracer tous les cas de patients OPMD dans la population française du Canada à partir d'un couple fondateur qui a quitté la France (Village de Mortagne-au-Perche) en 1634 avec leurs enfants pour s'établir au Québec (Zacharie Cloutier originaire d'un village de Mortagne-au-Perche et Sainte Dupont originaire de Niort dans le Poitou). Les descendants du couple ont ensuite traversé la rivière Saint Laurent au Québec pour coloniser les régions environnantes (l'Islet Monmagny et le Cap Saint Ignace) (Bouchard, 1997). D'autres cas similaires ont été reportés dans des régions différentes (Barbeau, 1966). Un second regroupement de patient OPMD en Israël (deuxième plus large regroupement dans le monde) a été décrit avec 76 patients appartenant à 29 familles ancestrales du Buhkharan (Ouzbékistan) (Blumen et al., 1993, 1992). De nombreuses études de cas ultérieures ont depuis montré une répartition mondiale (Brais et al., 1999).

La région génomique impliquée dans l'OPMD a d'abord été mise en évidence par des études d'association génétique au sein de 3 familles OPMD (99 participants pour la famille 1 et 9 et 6 respectivement pour la famille 2 et 3). Le locus qui a été mis en évidence était d'abord de 5 centimorgan (cM, distance génétique entre deux locus et dont 1cM correspond à une segment de chromatine sur lequel la probabilité de crossing over par méiose est de 1%) sur

le chromosome 14 entre les régions q11.2 et q13 incluant le marqueur microsatellite D14S50 et les deux gènes cardiaques myosine heavy chain : alpha (*MYH6*) et beta (*MYH7*) (Brais et al., 1995). Une étude complémentaire d'analyse génétique en 1995 sur 11 familles OPMD a permis de réduire la région à moins de 2cM entre le marqueur D14S282 et deux myosines cardiaques beta heavy chain (*MYH7.1* et *MYH7.24*) et suggérait que le locus impliqué était à 1,5 cM autour du marqueur D14D990 (Brais et al., 1997). Le gène responsable de l'OPMD, *PABP2* a finalement été découvert en 1998 par Brais *et al* dans l'équipe de Michel Fardeau et Guy Rouleau par cartographie de contigs et sélection d'acide désoxyribonucléotide complémentaire (ADNc). Le gène présente 7 exons et subit un épissage alternatif. L'exon 1 contient 6 triplets GCG codant les 6 premières alanines d'une séquence en contenant 10. En confrontant cette région à celle de patients OPMD, une expansion de 2 à 7 GCG a été observée. Dans cette même étude la succession de 9 triplets (GCG) a été mise en évidence dans une cohorte de 144 familles comme étant la mutation la plus fréquemment retrouvée. Les auteurs ont mis en évidence une corrélation génotype/phénotype entre des patients homozygotes pour 9 CGC et entre hétérozygote (GCG)⁹/(CGC)⁷. L'expansion est méiotiquement stable et un seul ajout de triplet GCG a été observé à l'époque comme pouvant induire un phénotype récessif pour la pathologie. Ce fut la première description d'une courte expansion de triplets induisant une maladie humaine (Brais et al., 1998).

De nos jours l'OPMD a une distribution mondiale avec un prévalence de 1 cas pour 100000 en Europe avec des clusters dans la population française du Canada et chez les Juifs Buhkharan d'Israël conduisant à une prévalence de respectivement 1/1000 et 1/600 (Richard et al., 2015).

3.4. Physiopathologie de l'OPMD

Les symptômes de l'OPMD commencent généralement de façon insidieuse et deviennent visibles autour de 50-60 ans. La progression est lente et tous les patients sont symptomatiques autour de 70 ans (Brais, 2003). Les principaux symptômes sont un ptosis et une dysphagie consécutifs respectivement à une faiblesse des muscles releveurs des paupières et des muscles du pharynx. L'évolution de la maladie est lente et conduit à une atteinte d'autres muscles striés squelettiques alors que les muscles lisses et le cœur sont toujours épargnés (Abu-Baker, Rouleau, 2007). L'atteinte est toujours symétrique et la sévérité variable entre les groupes musculaires avec un gradient suivant: dans un premier

temps les muscles atteints comprennent les muscles releveurs des paupières (RPM), de la langue, les muscles du pharynx (CPM), et les muscles extra-oculaires. Ensuite l'atteinte peut toucher les muscles faciaux et cervicaux, les muscles de la ceinture pelvienne (illio-psoas), les muscles fémoraux, les muscles de la fesse, les muscles de l'épaule (deltoïde) et les muscles de la cuisse (ischio-jambier) (Little, Perl, 1982). La progression de la maladie est variable d'un individu à l'autre, ainsi certains patients sont en fauteuil roulant vers l'âge de 70 ans, alors que d'autres n'ont aucune faiblesse des membres inférieurs. Le ptosis de la paupière supérieure est généralement le premier symptôme chez les patients bien qu'un certain degré de dysphagie soit souvent déjà présent. Concernant la dysphagie, dans les premiers stades, les patients présentent des difficultés pour avaler des aliments solides. Cela se poursuit en général par des problèmes de déglutition des aliments solides et liquides pouvant conduire à de la dénutrition, des problèmes d'étouffement, d'aspiration et de pneumonie, ces deux derniers symptômes pouvant conduire jusqu'à la mort éventuelle des patients. Cependant, ce tableau clinique se produisant à un âge avancé, ces conséquences sont sans impact sur l'espérance de vie des patients OPMD (Little, Perl, 1982).

Bien que l'OPMD soit considérée comme une stricte dystrophie musculaire, certains patients présentent des signes cliniques et pathologiques consécutifs à une neuropathie. La fréquence de neuropathie associée à la dystrophie musculaire varie de façon importante entre différentes études : 85% pour Hardiman *et al* et 6-7% pour Mirabella *et al* (Luigetti *et al.*, 2015). Il faut noter cependant que la recherche de défauts neurologiques n'est pas toujours réalisée de façon systématique et approfondie lors des études cliniques.

3.5. Cause génétique de l'OPMD

L'OPMD est une pathologie résultant d'une expansion de triplets (GCN) dans la séquence codante de la protéine PABPN1 conduisant à une courte expansion d'acides aminés alanines dans la partie N-terminale de la protéine.

3.5.1. Maladies à expansion d'alanines

L'expansion anormale de triplets nucléotidiques a été associée à plusieurs pathologies neurodégénératives, maladies du développement et dystrophies musculaires. Ces expansions pathologiques sont retrouvées dans des séquences non codantes du génome (comme par exemple le syndrome de l'X-fragile, l'ataxie de Friedreich), dans des séquences du génome

transcrites mais non traduites en protéines (dystrophies myotoniques) mais également dans des séquences codantes. Dans cette dernière catégorie on retrouve des maladies causées par des expansions d'alanines et celles causées par des expansions de glutamines. Dans la plupart des maladies à expansion de triplets, la taille des expansions varie beaucoup au cours des générations, alors que dans les maladies à expansion d'alanines la taille des expansions est mitotiquement et méiotiquement stable avec un faible degré de polymorphisme (Albrecht, Mundlos, 2005). Une étude suggère que l'expansion d'alanine retrouvée dans l'OPMD serait due à un mauvais crossing-over entre des allèles normaux mal appariés (Nakamoto et al., 2002). Ce mécanisme a aussi été proposé pour expliquer les autres maladies à expansion d'alanines (Albrecht, Mundlos, 2005).

A ce jour 9 pathologies à expansion d'alanines ont été décrites. A part pour l'OPMD dont la protéine responsable est un facteur de polyadénylation, toutes les autres maladies à expansion d'alanines sont causées par des mutations dans des facteurs de transcription (tableau 1). Pour ces dernières il a été reporté qu'en plus de l'expansion d'alanines, des mutations non sens, faux sens, des mutations avec décalage du cadre de lecture ou encore des délétions et des duplications de gènes peuvent induire ces mêmes pathologies. L'OPMD est différente dans ce cas aussi puisque seulement l'expansion d'alanine dans la protéine PABPN1 a été rapportée comme responsable de la maladie. De plus, seulement une alanine supplémentaire est suffisante pour être atteint de l'OPMD alors que les autres pathologies de ce groupe nécessitent au minimum 5 alanines supplémentaires et la plus longue séquence d'alanine retrouvée est de 33 acides aminés consécutifs dans le gène *PHOX2B* (Winter et al., 2013).

Nom	Protéine	Taille de l'expansion saine	Taille de l'expansion pathologique	Mode de transmission	Mécanisme proposé	Phénotype
Dystrophie musculaire oculopharyngée	PABPN1	10	11-18 (dominant)	AD,AR	Perte et/ou gain de fonction	Atteinte musculaire
		10	11 (récessif)			
Synpolydactylie, de type 2	HOXD13	15	22-29	AD	Dominant négatif	Malformation des membres
Dysplasie cleidocraniale	RUNX2	17	27	AD	Gain de fonction ou dominant négatif	Malformation congénitale du squelette
Syndrome main-pied-utérus	HOXA13	expansion 1 : 14 expansion 2 : 12 expansion 3 : 18	22 18 24-30	AD	Dominant négatif, perte de fonction	Anormalité du squelettes et malformation urogénitales
Blépharophimosis - ptosis - épicanthus inversus	FOXL2	14	19, 22, 24	AD	Perte de fonction	Anormalité de l'oeil et insuffisance ovarienne primitive
Syndrome d'hypoventilation centrale congénitale	PHOX2B	20	25-33	AD	Perte de fonction	Anormalités du système nerveux
Holoprocéphalie de type 5	ZIC2	15	25	AD	Perte de fonction	Malformation du système nerveux central au cours du développement
Retard mental lié à l'X syndromique et non syndromique	ARX	expansion 1 : 16	23	XR	Gain de fonction	Retard mental associé à un tableau clinique multiple
		expansion 2 : 12	20			
Retard mental, lié à l'X, avec hypopituitarisme	SOX3	15 alanines	22-26	XR	Perte de fonction	Nanisme et déficiences hormonales

Tableau 1: Pathologies causées par des expansions de triplets alanines

AD : autosomique dominant, AR : autosomique récessif, XR : lié à l'X récessif. Adapté d'après (Messaed, Rouleau, 2009)

3.5.2. Expansions (GCN) dans l'OPMD

Des formes autosomiques dominantes et récessives de l'OPMD ont été décrites (OMIM #164300 et #257950). Le gène *PABPN1* contient au niveau du premier exon, juste après le codon ATG, 6 répétitions de codons GCG suivi par 3 répétitions de codon GCA encore suivi par un triplet GCG qui codent au niveau protéique 10 alanines consécutives juste après l'acide aminé méthionine. Dans la forme dominante de l'OPMD le nombre d'alanines est augmenté de 1 à 8 (Figure 23). Jusqu'à récemment seulement 2 à 7 alanines supplémentaires ont été rapportés dans la forme mutée de *PABPN1* conduisant à la forme dominante de la pathologie. Un acide aminé alanine supplémentaire était alors considéré comme la forme récessive de l'OPMD (Blumen et al., 1999). Cependant récemment deux études ont montré que d'une part 11 alanines sont suffisant donner une forme dominante de pathologie (Richard et al., 2015) et d'autre part un patient OPMD avec 8 alanines supplémentaires (Jouan et al., 2014). Une étude effectuée dans 81 familles a montré la répartition suivante des différentes tailles d'expansion : 40% (GCG)₉, 26% (GCG)₁₀, 21%(GCG)₁₁, 7% (GCG)₁₂ et 1% (GCG)₁₃ (Brais, 2003) (Figure 22). L'allèle contenant (GCG)₉ a été montré comme étant majoritaire dans la population Franco-Canadienne par Brais *et al* (Brais et al., 1998). La numérotation des allèles a évolué ces dernière années pour refléter l'effet de l'expansion au niveau de la protéine plutôt que celle au niveau du gène. L'allèle codant la protéine mutée est ainsi appelé comme suit : (GCN)₁₁₋₁₈.

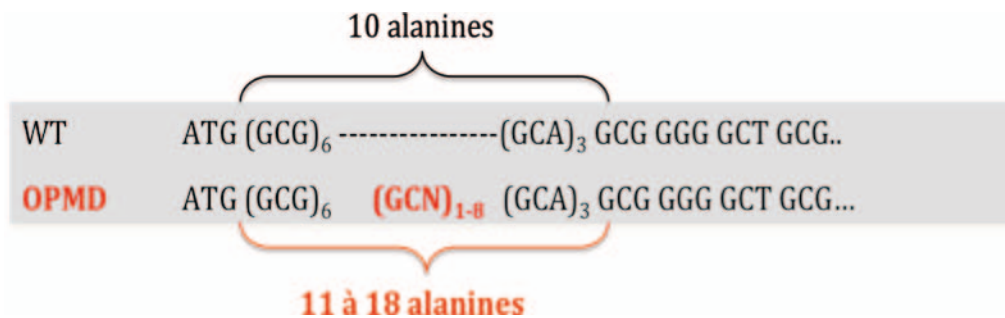


Figure 22: Séquence nucléotidique au début du gène *PABPN1* sauvage et muté.

Dans la forme sauvage, *PABPN1* présente juste après l'ATG, 6 triplets (GCG), 3 triplets (GCA) et 1 triplet (GCG) codant 10 alanines et dans la forme mutée la protéine *PABPN1* présente 1 à 8 (GCN) supplémentaires codant au total pour 11 à 18 alanines.

Pourcentage de familles et de cas partageant différentes expansion (GCG) dans plusieurs populations

Mutation	Families		Cases			
	World ^a (144 families)	UK ^b (31 cases)	Canada ^c (402 cases)	USA ^c (24 cases)	Germany ^d (16 cases)	Italy ^e (11 cases)
(GCG) ₈	3		<1	0	6	37
(GCG) ₉	69	40	95	83	37	45
(GCG) ₁₀	13	36	1	4	37	18
(GCG) ₁₁	11		2	13	19	0
(GCG) ₁₂	3		1	0	0	0
(GCG) ₁₃	<1		0	0	0	0

^a Brais et al. (1998) (n = 1).

^b Hill et al. (2001) (n = 88).

^c Brais et al. (unpublished data).

^d Müller et al. (2001) (n = 87).

^e Mirabella et al. (1999) (n = 131).

n= nombre total examiné dans chaque cas

Figure 23: Pourcentage de familles et de cas partageant différents types d'expansions dans plusieurs populations

Modifié d'après (Brais, 2003).

Aucune corrélation génotype-phénotype n'a encore été clairement établie à ce jour. Cependant des symptômes les plus sévères de la maladie ont été rapportés pour des individus homozygotes pour la forme dominante de l'OPMD. Ils présentent les symptômes aggravés de la maladie à un âge plus précoce comparé à des patients hétérozygotes (Blumen et al., 1999 ; Brais et al., 1998). Chez les patients hétérozygotes présentant un des allèles avec 11 triplets (GCN) et le second avec un nombre variable de (GCN) entre 12 et 17, une forme plus sévère de la maladie est observée (Brais et al., 1998 ; Semmler et al., 2007). Ces résultats suggèrent un effet de dosage génétique de l'allèle muté sur l'âge d'apparition et la sévérité des symptômes.

3.6. Histopathologie

Les muscles atteints chez les patients OPMD présentent des changements histologiques caractéristiques de nombreuses dystrophies musculaires. Ces caractéristiques incluent une diminution du nombre et de la taille des fibres musculaires, une augmentation de la centronucléation, ainsi qu'une augmentation de tissu fibrotique interstitiel. Au niveau d'une coupe musculaire des petites fibres angulaires et des vacuoles bordées sont retrouvés. Cependant le signe pathognomonique de l'OPMD est la présence dans les noyaux des fibres musculaires d'agrégats nucléaires immunoréactifs à un anticorps dirigé contre PABPN1 (Brais, 2003).

3.7. Les agrégats nucléaires de PABPN1

C'est en 1980 que F. Tomé et M. Fardeau mettent en évidence la principale caractéristique pathologique de l'OPMD : la présence d'agrégats nucléaires filamenteux dans les myofibrilles du muscle strié squelettique (Figure 24).

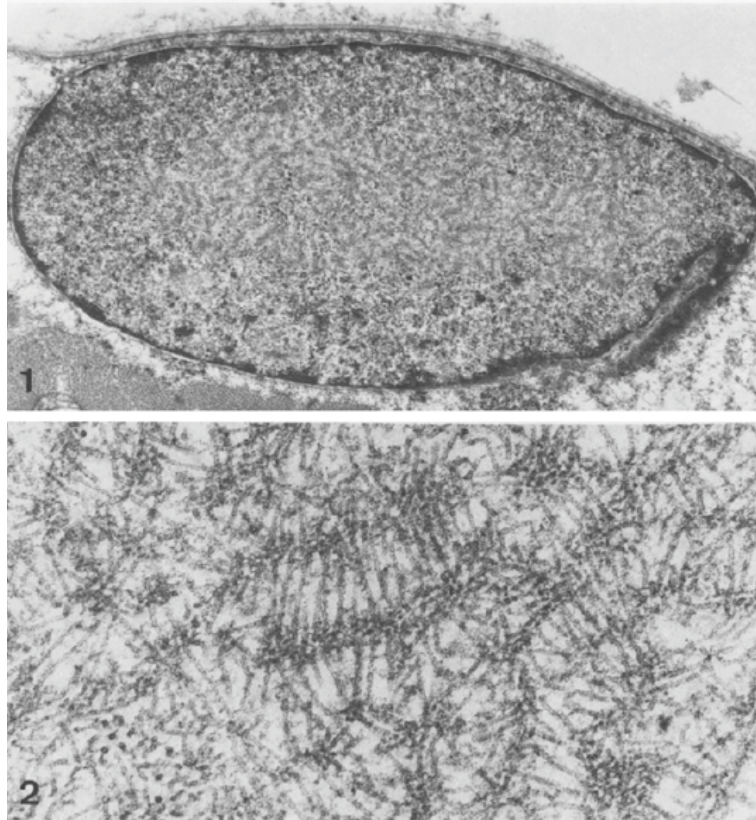


Figure 24: Première observation au microscope électronique d'agrégats nucléaires de PABPN1 à partir d'une biopsie d'un patient OPMD par Tomé en 1980.

1) Coupe transversale d'une fibre musculaire montrant un noyau contenant une inclusion, 2) Filaments tubulaires disposées en palissades radiales dans toutes les directions (Tomé, Fardeau, 1980).

3.7.1. Structure des agrégats

L'ultrastructure des agrégats correspond à un réseau de filaments tubulaires localisé dans des domaines lâches d'interchromatine. Observés au microscope électronique le diamètre extérieur est de 8,5 nm et le diamètre intérieur de 3 nm avec une longueur inférieure à 0,25 micromètre (μm) (Tomé, Fardeau, 1980). Les filaments ne sont pas branchés et sont arrangés en enchevêtrement ou palissades (figure 17). Ces inclusions ont été retrouvées

majoritairement dans des fibres normales et occasionnellement dans des fibres atrophiées. Ces agrégats ont une surface variable allant de simples *foci* de 0,1 μm^2 à une taille classique d'environ 7 μm^2 (Bengoechea et al., 2012) avec un volume pouvant varier énormément allant de 1 à 100% du volume nucléaire (Tomé et al., 1997 ; Tomé, Fardeau, 1980). Récemment il a été montré au laboratoire par immunofluorescence que la fréquence des noyaux contenant des agrégats dans les fibres musculaires chez les patients OPMD est entre 2 et 16% (Gidaro et al., 2013). Ils sont retrouvés dans les myonuclei des muscles cliniquement atteints (muscles cricopharyngien, releveur de paupière) et des muscles cliniquement non atteints (quadriceps par exemple).

3.7.2. Localisation intranucléaire des agrégats

Le noyau est une structure hautement organisée contenant différentes structures appelées corps ou domaines nucléaire. Ces structures sont essentielles pour compartimentaliser l'espace nucléaire et créer ainsi des environnements fonctionnellement différents dans le nucléoplasme (Tableau 2). Ces corps nucléaires possèdent des fonctions spécifiques et peuvent être le lieu d'activité particulière comme dans le cas de la transcription, ou agir en régulant la concentration locale des composants d'une activité pour faciliter une réaction mais aussi la réguler. Ces domaines ne sont pas délimités par des membranes lipidiques et contiennent un ensemble spécifique de protéine et ARN qui interagissent ensemble et qui les définissent à la fois structurellement et moléculairement. Elles sont pour la plupart sphériques et peuvent être caractérisées par leur morphologie souvent unique. Ces structures sont dynamiques et se désassemblent durant la mitose pour se réassembler rapidement et efficacement à la fin du processus. Certains domaines peuvent se former en réponse à des activités spécifiques de la cellule ou à des signaux issus de l'environnement comme un stress. Ils sont souvent associés à des locus spécifiques et/ou leur ARNs correspondants. Leur intégrité est essentielle pour le bon fonctionnement de la cellule. (Mao et al., 2011 ; Sleeman, Trinkle-Mulcahy, 2014).

Dans les myonuclei des patients OPMD, les agrégats nucléaires de PABPN1 apparaissent délocalisés des structures nucléaires appelées speckles. Ils sont cependant à proximité mais non associés (Bengoechea et al., 2012). Les speckles sont des zones dans le noyau où se produit la régulation post-transcriptionnelle des ARNm et sont ainsi enrichis en facteurs de régulation des pré-ARNm, incluant les protéines appartenant à la classe des snRNP et des facteurs d'épissage de type SR comme SC35 (SRSF2) (Lamond, Spector, 2003). De façon

intéressante la protéine PABPN1 est retrouvée normalement chez les individus sains dans le nucléoplasme à l'exclusion du nucléole mais se concentrant principalement dans les speckles nucléaires (Krause et al., 1994) (Calado, Tomé, et al., 2000). La localisation de PABPN1 dans les speckles est dépendant du mécanisme de polyadénylation et nécessite la fixation à l'ARN poly(A). Ainsi des mutations ponctuelles dans le domaine RNP ou dans le domaine d'activation de la PAP conduisent à une localisation de PABPN1 diffuse dans le nucléoplasme (Messaed et al., 2007).

Nom	Notation	Autre dénomination	Première description	Taille (um)	Nombre/noyau	Détection	Composition (non exhaustif)	Localisation	fonction possibles	Modele de nucléation	Autre
nucléole			1835-1839	0,5 à 8	1 à 4	Nucleophosmine	Protéines de liaison à l'ADN et à l'ARN, Machinerie de l'ARN polymérase I, facteurs de transcription, chaperonnes, protéines ribosomales, Protéines de type "dead box"	Associés aux cluster géniques des ARN ribosomaux	Transcription et maturation des ARNr, assemblage des ribosomes, contrôle réponse de la cellule au stress, régulation du cycle cellulaire, modification et assemblage d'autres ARN et RNPs	ADN/ARN	Plus de 200 protéines identifiées, deux sous structures distinctes identifiées : CNoBs (CRM1-Nucleolar bodie) et INBs (Intranucleolar bodie)
cajal bodies	CBs	coiled bodies	1903	0.1 à 2	1 à 10	p80-coilin	Coilin, snRNP (U1,U3,U4,U5 et U6), petits ARN spécifiques des CB (scaRNAs = CB-specific RNAs), snoRNP (U3 et U8)	Associés aux locus des UsnARN et histones	Synthèse, maturation et recyclage des snRNPs et snoRNP, modification des snRNA et snoRNA, maturation ARNm histones, maintenance des télomères,	ADN/ARN	Très dynamique, répond aux changements dans le niveau de transcription, varie en nombre et en taille
Gems		Gemini of Cajal bodies	1996			SMN	SMN, Gemin2	A proximité des Cajal bodies	Assemblage et maturation snRNPs	ADN/ARN	Similaire aux Cajal bodies et très grand proximité physique
histone locus bodies	HLBs		Drosophile : 2006, mammifères : 2008	0,2 à 1,2	2 à 4	alpha-Lsm11	Protéines de régulation de la transcription (NPAT), FLASH (FLICE-associated huge protein), U7snRNP, protéines de maturation en 3' des ARN (Lsm10 et 11, SLBP (stem-loop binding protein)), p220, NELF (negative elongation factor), symplekin,	Associé avec les locus des gènes impliqués dans la réplication des histones	Transcription et maturation des pre-ARNm des histones	ADN/ARN	Parfois associé physiquement à x Cajal bodies
PML-nuclear bodies	PMLNBs		1960	0,3 à 1	10 à 30	Sumo1	Protéine PM, protéine de sumoylation (SUM, UBC9), régulateur de transcription (SP100) et répresseur de la transcription (DAXX). NB : la composition change beaucoup au cours du cycle	Associés aux télomères et aux sites chromatinens riches en gènes	Réponse au stress, défense face au virus, stabilité du génome et des protéines, transcription et réparation de l'ADN, maintenance de la longueur des télomères, régulation apoptose et de la sénescence	ADN/ARN	Plusieurs types de PML, sensibles au stress
nuclear speckles		interchromatin granule clusters	1910	0,8 à 1,8	25 à 50	SC35	LncARN Malat1, facteurs épissage (ex ASF/SF2, SC35), protéines kinases (Clk/STY, hPRP4, and PSKHI), ARN polymérase II, facteur de clivage des mammifères (CF Im), PABPN1	A proximité de sites de transcriptions	Stockage, assemblage et modification des facteurs d'épissage des pré-ARNm	ADN/ARN	Très dynamiques. Varie en nombre et en taille
paraspeckles			2002	0,5 à 1	5 à 20	alpha-Nono	LncARN (Neat 1), ARN polymérase II, facteur de transcription (SOX9, BCL11A), famille de protéines appartenant à DBHS = Drosophila Behavior Human Splicing (NONO, PSF, PSPC1), facteur de clivage des mammifères (CF Im), PSPC1 "Paraspeckle Protein 1"	A proximité des speckles	Régulation des ARNm, rétention nucléaire des ARNs, Edition des ARN (modification de type Adénosine Inositol)	ARN (Neat1)	Seulement mis en évidence dans cellules mammifères pour le moment
Compartiment périnucléolaire			1992	0,25 à 1	1 à 10	anticorps SH54 (reconnaît protéine PTB)	Petits ARN (Alu ARN, hY ARN, SRP ARN, Rnase P ARN, MRP ARN) et protéine de liaison à l'ARN (CUGBP, PTB, STAR, Raver 1/2), protéine de maturation à l'ARN et transcription de l'ADNr (Nucléoline)	Surface du nucléole	fonction encore mal connue: Régulation post transcriptionnelle d'ARN transcrit pas polIII, impliqué dans le développement du cancer	ARN	Observés presque exclusivement dans les cellules cancéreuses, quasi inexistant dans les cellules primaires, grande similarité avec les corps nucléaires SAM68
Corps de stress nucléaire	nSB	perichromatin granules	1989	1 à 2	2 à 6	HSF1	hnRNPs, protéines de choc thermique (HSF1, HSF2) HAP (hnRNP A1 interacting protein), facteurs épissage (ASF/SF2, srp30a), Sam68	Répétitions satellites de type III sur l'ADN	Remodelage de la chromatine, régulation de la transcription et de l'épissage en réponse à un choc thermique	ARN	Transitoire: juste pendant un stress

Tableau 2 : Principaux corps nucléaires retrouvés dans le noyau.

D'après (Andersen et al., 2002 ; Bernardi, Pandolfi, 2007 ; Biamonti, Vourc'h, 2010 ; Dundr, Misteli, 2010 ; Fox, Lamond, 2010 ; Huang, 2000 ; Mao et al., 2011 ; Nizami et al., 2010 ; Pederson, 2011 ; Pollock, Huang, 2010 ; Sleeman, Trinkle-Mulcahy, 2014 ; Spector, 2001 ; Spector, Lamond, 2011 ; Souquere et al., 2015)

3.7.3. Composition

Les agrégats retrouvés dans les biopsies de patients OPMD contiennent la protéine PABPN1 insoluble et de nombreuses autres protéines. Aucune étude exhaustive de leur composition n'a été réalisée. Les agrégats contiennent aussi des ARN polyadénylés et excluent l'ADN (Calado, Tomé, et al., 2000) (Figure 25). La surexpression de PABPN1 exogène dans des cellules eucaryotes conduit à la formation d'agrégats nucléaires similaires à ceux retrouvés chez les patients (*voir chapitre suivant*). Des immunofluorescences réalisées sur ces modèles d'agrégation *in vitro* n'ont pas mis en évidence de colocalisation avec les protéines, hnRNP-C, SC35, les protéines du complexe exon-jonction REF et DEK, ni avec la protéine d'export TAP et la protéine PABPC ou les protéines du complexe CPSF (CPSF-30, -70, -100 et -160) et Cstf (Cstf-50. Par contre la protéine PAP colocalise avec les agrégats de PABPN1 (Tavanez et al., 2005). La protéine promyelocytic leukemia (PML) (Abu-Baker et al., 2005), ainsi que les protéines chaperonnes HSP40 et HSP70, HSP40, hnRNP-A1 (Bao et al., 2004) (Fan et al., 2003), la protéine SKIP (Kim et al., 2001), l'ubiquitine et la sous unité 20S du protéasome (Calado, Tomé, et al., 2000) ont également été montrées comme étant contenues dans les agrégats de PABPN1 induit artificiellement *in vitro*. Une étude effectuée sur un modèle de surexpression de PABPN1 muté avec 13 alanines a détecté de nombreuses protéines présentes (8 protéines nucléaires : Srp20, CUGBP1, HMG2, PRC1, FKBP1A, HSP70, S100P et HNRNPA1) dans les agrégats. Cependant, sur coupe de patient OPMD homozygotes seules 4 protéines ont pour l'instant été retrouvées par immunomarquage: CUGBP1, SRSF3, FKBP1A et HSP70 (Abu-Baker et al., 2003 ; Corbeil-Girard et al., 2005).

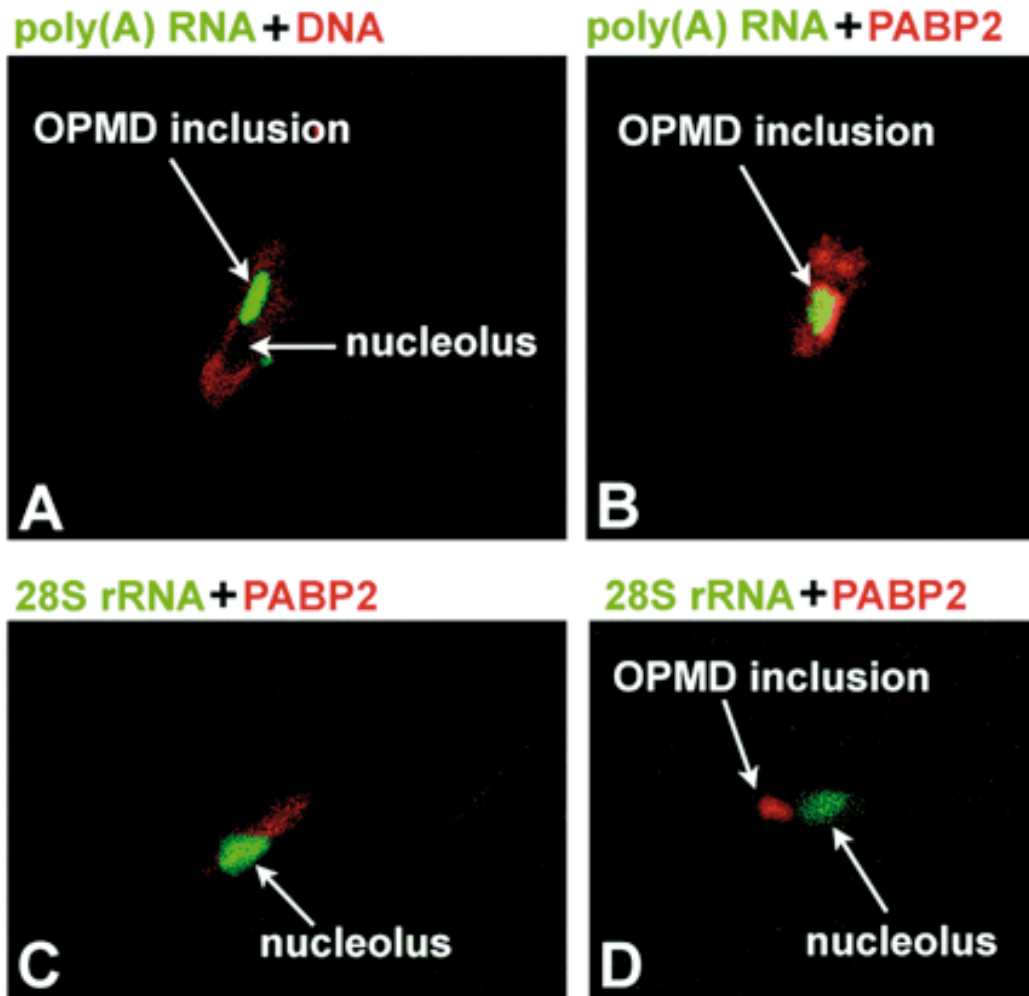


Figure 25: FISH sur une coupe issue d'un muscle de patient OPMD.

Sonde oligo(U) ciblant l'ARNm polyadénylé (A et B, marquage vert) ou sonde contre l'ARN 28s (C et D, marquage vert), avec soit une sonde détectant l'ADN (A) ou un anticorps détectant la protéine PABPN1 (PABP2) (B, C, D). L'ARN polyadénylé est présent dans les agrégats de PABPN1 (B, marquage jaune), alors que l'ARN 28s en est exclu (C-D) (Calado, Tomé, et al., 2000).

3.7.4. Formation des agrégats nucléaires

L'équipe de Guy Rouleau a mis en évidence que la présence d'un environnement nucléaire est nécessaire pour la formation d'agrégats : lorsque la protéine PABPN1 est déléetée de son NLS, elle se retrouve majoritairement dans le cytoplasme et dans ces conditions aucun agrégat cytoplasmique n'est observé tandis que le nombre d'agrégats nucléaires est diminué (Abu-Baker et al., 2005). L'expression exogène de PABPN1 mutée conduit à la formation d'agrégats nucléaires. PABPN1 est une protéine qui a naturellement une forte tendance à s'agréger et la surexpression de la forme sauvage conduit aussi à la formation d'agrégats

(Abu-Baker et al., 2005 ; Bao et al., 2002). Cependant, à un faible niveau d'expression, la protéine mutante a une propension beaucoup plus importante que la protéine sauvage à s'agréger (Bao et al., 2002). De façon intéressante, lorsque le nombre d'alanine est augmenté dans la protéine PABPN1 allant de 25 à 40 alanines, il n'y a pas de formation d'agrégats et PABPN1 colocalise avec les speckles nucléaires (Klein et al., 2008). PABPN1 possède deux domaines d'oligomérisation appelés OD1 (155-294) et OD2 (264-306) dont 2 segments en particulier semblent nécessaire pour la formation des agrégats : les régions aa :213-220 pour OD1 et aa :301-306 pour OD2 (Fan et al., 2001).

Les agrégats nucléaires formés *in vitro* par surexpression de PABPN1 ressemblent à ceux trouvés chez les patients et sont délocalisés des speckles (Abu-Baker et al., 2005 ; Calado, Carmo-Fonseca, 2000 ; Klein et al., 2008, p. 200) (Figure 26). Il a ainsi été montré *in vitro* qu'ils prennent naissance au niveau des speckles et grossissent progressivement tout en déplaçant la protéine PABPN1 qui s'y trouve normalement jusqu'à devenir des structures individuelles (Bengoechea et al., 2012 ; Tavanez et al., 2005). Des ARNs polyadénylés mis en évidence par des sondes oligo(U) se retrouvent aussi dans les agrégats nucléaires par un mécanisme similaire (Tavanez et al., 2005). Les agrégats résultant de la protéine PABPN1 mutée sont formés plus rapidement que ceux résultant de la protéine sauvage : des structures précurseurs sont visibles dès 8h d'expression pour la protéine mutée et 15h pour la protéine sauvage (Bengoechea et al., 2012).

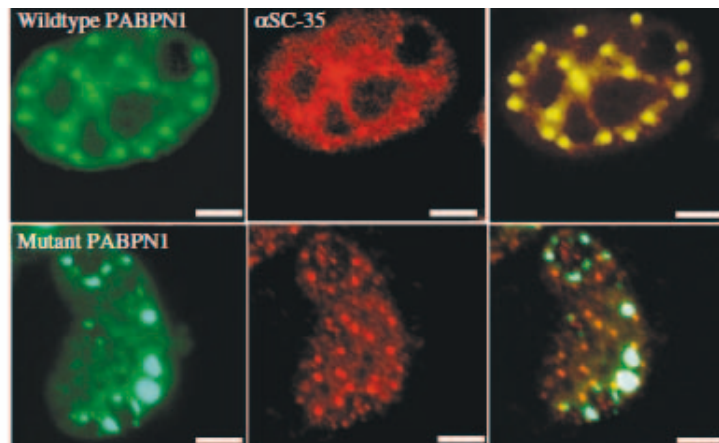


Figure 26: Immunofluorescence dans des cellules HeLa transfectées avec PABPN1 sauvage ou mutée tagués avec l'anticorps SC35.

PABPN1 est tagué avec la GFP (vert), SC35 (Rouge - reconnaît les speckles nucléaires). En condition sauvage PABPN1 colocalise avec les speckles, alors que les agrégats nucléaires sont délocalisés de ces structures (Abu-Baker et al., 2005).

Des expériences de redistribution de la fluorescence après photoblanchiment (fluorescence recovery after photobleaching = FRAP en Anglais) ont mis en évidence *in vitro* que la protéine PABPN1 n'est pas séquestrée de façon statique dans les agrégats nucléaires mais en constant échange avec le nucléoplasme (Figure 27). De plus, les agrégats nucléaires sont capables de se dissocier au cours de la mitose comme mis en évidence dans des expérimentations de surexpressions de la protéine mutée de PABPN1 (13 alanines). Certaines cellules (environ 80%) contiennent toujours des agrégats nucléaires pendant le processus de mitose (Marie-Josée Sasseville et al., 2006).

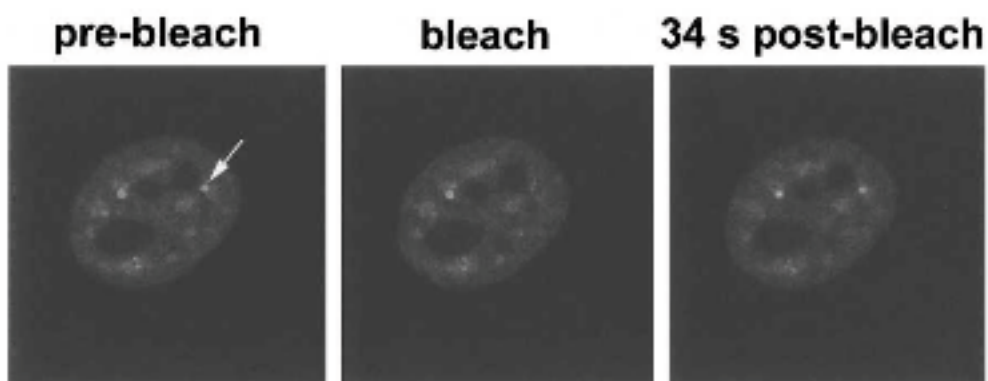


Figure 27: FRAP sur des cellules HeLa exprimant la protéine PABPN1 sauvage tagué GFP.

La formation des agrégats est dynamique. La flèche indique la zone photoblanchie. (Tavanez et al., 2005)

3.7.5. Implication des agrégats dans l'OPMD

Bien que découverts en 1980, encore aujourd'hui le rôle exact des agrégats de PABPN1 est mal connu dans l'OPMD. Comme c'est le cas pour de nombreuses maladies neurodégénératives (telles que Alzheimer, Parkinson, Huntington) où sont retrouvés des agrégats intracellulaires pathogènes et le dépôt de protéines toxiques, de nombreuses données suggèrent fortement un rôle toxique des agrégats de PABPN1. Ainsi chez les patients la fréquence des agrégats corrèle avec la sévérité de la maladie (Blumen et al., 1999). La formation d'agrégats nucléaires dans des modèles *in vitro* et *in vivo* est elle aussi associée à une toxicité cellulaire : la réduction du pourcentage d'agrégats (par le tréhalose, la doxycycline, des intrabodies) diminue la toxicité cellulaire (Abu-Baker et al., 2005, 2003 ; Bao et al., 2004 ; Davies, Rubinsztein, 2011 ; Fan et al., 2001). Cependant pour alimenter le débat sur le rôle des agrégats nucléaires dans la pathogenèse de la maladie ils sont présent à la

fois dans les muscles atteints et dans les muscles cliniquement non atteints à une fréquence similaire. Ainsi dans ces muscles et à ce stade d'évolution de la pathologie ces agrégats ne semblent avoir de rôle pathologique (Gidaro et al., 2013). Récemment il a été montré la présence de ces agrégats dans un muscle normalement non atteint de patient OPMD (*Vastus Lateralis*) avant même l'âge d'apparition normal des symptômes. (van der Sluijs et al., 2016). La présence de la protéine PABPN1 mutée sous forme soluble a aussi été montrée comme pathogénique (Messaed et al., 2007). La formation d'agrégats de PABPN1 serait donc un mécanisme de défense de la cellule. Cette hypothèse est confortée par une étude qui montre la formation de granules nucléaires en réponse à un stress induit par un traitement neurotoxique dans des ganglions sensitifs des nerfs spinaux chez le rat. Ces agrégats contiennent la protéine PABPN1 et de l'ARN polyadénylé (Casafont et al., 2010). Observés en microscopie optique et électronique il a été montré que ces agrégats sont localisés en contact direct avec les speckles et associées avec des structures nucléaires comme les Cajal Bodi et les clastosomes (corps nucléaires qui concentrent des composants du complexe ubiquitine-protéasome ainsi que le substrat protéasome). Ils sont entourés d'euchromatine ce qui pourrait indiquer qu'ils s'associent avec des régions où la transcription est active. De plus, leur nombre augmente au cours du développement post-natal des neurones et reflète la maturation des fonctions sécrétrices d'ocytocine des neurones alors que l'activation de la transcription suite à un stress osmotique conduit à diminuer leur nombre. Ces informations font que le rôle des agrégats de PABPN1 dans l'OPMD est toujours controversé. Dans le cas où ils auraient un rôle dans la pathogenèse, plusieurs hypothèses qui ne sont pas mutuellement exclusives ont été émises : un gain de fonction toxique entraînant une mort de la fibre ou la dysfonctionnement de l'homéostasie, la séquestration d'ARN essentiels pour la fibre musculaire, ou par un mécanisme de perte de fonction causé par la séquestration de PABPN1 et/ou d'autres protéines essentielles (Banerjee et al., 2013) .

3.8. Les modèles cellulaires et animaux de l'OPMD

Afin d'étudier les fonctions de PABPN1 et les mécanismes physiopathologiques conduisant à l'OPMD, différents modèles cellulaires et animaux ont été développés.

3.8.1. Modèles cellulaires

La plupart des modèles cellulaires de l'OPMD sont obtenus par surexpression ou sous-expression de la protéine PABPN1 mutée ou sauvage. Ces modèles permettent principalement d'étudier les fonctions de PABPN1 et des agrégats par des études de gain ou de perte de fonction. L'avantage de tels modèles est qu'ils sont faciles à créer et dans le cas de la surexpression ils miment la caractéristique pathologique principale de la maladie - la présence d'agrégats nucléaires – permettant ainsi d'étudier le rôle de ces structures et les mécanismes physiopathologiques liés. L'inconvénient des modèles existant est que pour la grande majorité les cellules sont non musculaires (Tableau 3)

Année	Type cellulaire	Transgène	Mode	Référence
2002	Singe (Cos-7)	GFP-hPABPN1-ala10, ala17	Transfection	Bao <i>et al</i>
2003	Humain et Singe (Hela, Cos-7)	PABPN1-ala10, ala17	Transfection	Abu-Baker <i>et al</i>
2004	Singe (Cos-7)	PABPN1-ala10, ala17	Transfection	Bao <i>et al</i>
2005	Humain (A59-tTA)	His-bPABPN1-ala 10, 13,17 GFP-hPABPN1-ala10, 13,17	Adénovirus (transgene inductible)	Corbeil-Girard <i>et al</i>
2005	Humain (Hela)	PABPN1 ala10,ala17	Transfection	Abu-Baker <i>et al</i>
2005	Humain et Souris (Hela et myoblastes C2C12)	GFP-hPABPN1-ala10	Transfection	Tavanez <i>et al</i>
2005	Humain (Hela)	GFP-hPABPN1-ala10, ala17	Transfection	Wang <i>et al</i>
2006	Humain et souris (Hela et Cos-1)	mPABPN1 ala17	Tranfection	Verheesen <i>et al</i>
2006	Singe (cos-7)	hPABPN1 ala10, ala17,	Transfection	Davies <i>et al</i>
2006	Humain (A59-tTA)	GFP-hPABPN1-ala10, ala13, ala17	Transduction (transgene inductible)	Sasseville <i>et al</i>
2007	Humain (Hela)	GFP-hPABPN1 ala10, ala18 GFP-hPABPN1-muté-ala10 et ala18	Transfection	Messead <i>et al</i>
2008	Singe (cos-7)	GFP-hPABPN1-ala10, ala17	Transfection	Catoire <i>et al</i>
2010	Souris (myoblastes primaires)	SiARN PABPN1	Transfection	Apponi <i>et al</i>
2010	Humain, Souris, Singe (HEK293, Cos-7, Myoblastes, C2C12)	PABPN1-ala17	Transfection	Davies <i>et al</i>
2011	Humain (UO2S-adénocarcinome)	hPABPN1 ala10, ala16	Transfection	Raz <i>et al</i>
2011	Souris (myoblastes immortalisés)	bPABPNA-ala10, ala17	Transduction	Raz <i>et al</i>
2011	Souris (C2C12)	YFP-PABPN1-ala16	Transfektion	Anvar <i>et al</i>
2012	Humain (Myoblastes primaires)	h1PABPN1 ala10 , ala17	Transfection	Bengoecha <i>et al</i>
2012	Humain (Hela et HEK293)	hPABPN1 ala10, ala17	Transfection	Battacharjee <i>et al</i>
2012	Humain (U2OS)	SiARN PABPN1, hPABPN1-ala17	Transfection	Jenal <i>et al</i>
2012	Humain (myoblastes immortalisés)	immortalisation cellules patients	Transduction	Mamchaoui <i>et al</i>

Tableau 3: Principaux modèles cellulaires dans l'OPMD

3.8.2. Modèle animaux

Plusieurs modèles animaux ont également été développés. Il s'agit de modèles transgéniques de souris, de ver (*c.elegans*) et de drosophile surexprimant la protéine PABPN1 mutée humaine ou bovine (Tableau 4). La plupart de ces modèles présentent des agrégats nucléaires de PABPN1 ce qui permet d'étudier le rôle physiopathologique de ces structures *in vivo*. Les modèles de souris et de drosophile présentent par ailleurs des caractéristiques pathologiques proches de celles retrouvées dans l'OPMD comme une dégénération musculaire progressive ou la dérégulation de certaines voies métaboliques (Trollet et al., 2010 ; Chartier et al., 2006). Parmi les modèles de souris, le plus utilisé est celui développée par Davies *et al.* Il s'agit du seul à présenter des symptômes uniquement musculaires. Ce modèle présente des agrégats uniquement retrouvés dans les myonucléi et une faiblesse musculaire progressive. Au cours de cette étude 5 lignées de souris de PABPN1 indépendante sur un fond génétique de souris FVB ont été créées par microinjection dans le pronucléi et recombinaison homologues : 2 lignées de souris surexprimant la forme mutée bovine de PABPN1 A17 (A17.1, A17.2) et 3 lignées de souris surexprimant la forme sauvage de PABPN1 (A10.1, A10.2, A10.3). Les souris issues de la lignée A17.1 présente un phénotype plus sévère qui corrèle avec une augmentation de l'expression du transgène comparé aux souris issues de la lignée A17-2. Il s'agit de la lignée la plus utilisée à l'heure actuelle. Concernant les souris portant le transgène A10 : les souris A10-2 sont indistinguables de la lignée contrôle, la souris A10-1 présentent une expression plus importante de PABPN1 que les souris A17 et n'ont aucun phénotype pathologique et les souris A10-3 n'expriment pas le transgène (Davies et al., 2005)

	Souris	Souris	Souris	Souris	Drosophile	Nématode
Référence	(Hino et al., 2004)	(Davies et al., 2005)	(Dion et al., 2005)	(Mankodi et al., 2012)	(Chartier et al., 2006)	(Catoire et al., 2008)
Transgène	hPABPN1 ala13	bPABPN1 ala17	hPABPN1 ala13	hPABPN1 ala16	bPABPN1 ala17	GFP-hPABPN1 ala13
Promoteur	CMV early enhancer/chick en beta actin-ubiquitaire	Human skeletal actin-Muscle spécifique	PABPN1-ubiquitaire	Inductible Mifepristone - ubiquitaire	Myosine heavy chain/Gal4 - Muscle spécifique	Myosine heavy chain -Muscle spécifique
Agrégats	Oui	Oui	Oui mais neurone seulement	Oui	Oui	Non
Histologie	Dégénérescence musculaire, fibrose et gras	Apoptose, régénération musculaire	Régénération musculaire	Myopathie progressive	Dégénérescence musculaire, apoptose, perte mitochondries	Perte cellules musculaires
Phénotype	Faiblesse musculaire progressive, survie diminuée, perte de poids	Faiblesse musculaire progressive, atrophie musculaire	Faiblesse musculaire, altération neurologique	Faiblesse musculaire, cardiomyopathie survie diminuée	Défaut positionnement aile	Défaut de motilité, dégénérescence
Age d'apparition des premiers symptômes	3 mois	6 mois	12 mois	10-12 semaines après induction	2 jours (durée de vie 25 jours)	5 jours (durée de vie 25 jours)

Tableau 4 : Modèles animaux dans l'OPMD

4. Dérégulations dans l'OPMD

La plupart des dérégulations physiopathologiques décrites dans l'OPMD ont été mise en évidence dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de surexpression de la protéine PABPN1 mutée. Pour certaines de ces dérégulations, la confirmation sur des échantillons humains de patients OPMD reste à être réalisée, peu d'études physiopathologiques ont en effet été effectuées directement sur de tels échantillons.

4.1. Complexe ubiquitine-protéasome

Parmi les mécanismes de contrôle qualité des protéines mis en place par la cellule, celui de la voie de l'ubiquitine-protéasome permet d'éviter l'accumulation de protéines non fonctionnelles et/ou potentiellement toxiques. Ce mécanisme catalyse la dégradation sélective de protéines non correctement formées dans le noyau ou le cytoplasme ce qui conduirait à des agrégats toxiques dans le cas contraire. Cette voie a été montrée comme dérégulée dans la dystrophie myotonique de type 1 (Vignaud et al., 2010), durant le processus d'atrophie

musculaire (Bodine et al., 2001) et le vieillissement musculaire (Combaret et al., 2009 ; Taillandier et al., 2004).

Il a été montré *in vitro* que l'accumulation d'agrégats de PABPN1 serait une conséquence d'un dysfonctionnement partiel du complexe ubiquitine-protéasome et des molécules chaperonnes. En effet, inhiber le complexe ubiquitine-protéasome conduit à une augmentation du nombre d'agrégats tandis que l'expression exogène des protéines HSP40 et HSP70 diminue le nombre d'agrégats et la toxicité cellulaire (Abu-Baker et al., 2003). Une analyse transcriptomique croisée effectuée sur des biopsies issues de patients OPMD et les modèles murin (A17.1) et de drosophile a montré que le système ubiquitine-protéasome est la voie la plus significativement dérégulée. Ainsi par exemple les ARN codants les protéines ligases-E3, de déubiquitination et le protéasome ont été montrés comme sous exprimés dans l'OPMD dans les 3 espèces (Anvar et al., 2011).

4.2. Apoptose

L'apoptose est l'un des deux mécanismes de la mort cellulaire responsable de la suppression des cellules de manière physiologique au travers d'un programme régulé de façon intrinsèque. Elle est par exemple fortement impliquée dans le développement embryonnaire (Bao et al., 2002). L'apoptose est également présente dans la pathogenèse de nombreuses maladies (Sandri, 1999). Dans le cas du muscle elle intervient aussi au cours de nombreux processus physiologiques et pathologiques tels que l'atrophie observée lors d'un dommage musculaire induit par l'exercice ou encore dans les dystrophies musculaires.

L'apoptose a été observée dans des modèles cellulaires OPMD de surexpression/sous expression de PABPN1 (Bao et al., 2004 ; Bhattacharjee, Bag, 2012 ; Bhattacharjee et al., 2012 ; Davies et al., 2006) et dans deux modèles de souris OPMD (Davies et al., 2005 ; Hino et al., 2004). L'utilisation de composés tels que la doxycycline (Davies et al., 2005), le tréhalose (Davies et al., 2006) et la cystamine (Davies et al., 2010) améliorent le phénotype de la souris A17.1 en diminuant le nombre d'agrégats nucléaires mais aussi par un effet anti-apoptotique. De même le croisement de la souris A17.1 avec la souris surexprimant la protéine BCL2 diminue l'apoptose et améliore le phénotype musculaire (Dominov et al., 2005). Chez la drosophile des résultats similaires sont retrouvés : l'expression de PABPN1 mutée conduit à une dégénération musculaire progressive impliquant les mécanismes d'apoptose (Chartier et al., 2006).

4.3. Atrophie musculaire

L'atrophie est définie comme la diminution de la taille d'une cellule, d'un tissu ou d'un organe due à la contraction du volume cellulaire. Cette diminution est causée par la perte d'organites, du volume du cytoplasme et des protéines. Ce mécanisme est contrôlé par 2 voies de dégradation responsables du renouvellement protéique: ubiquitine-protéasome et autophagie-lysosome. Dans le muscle la taille des fibres musculaires et les performances contractiles sont contrôlées par un réseau complexe de voies de signalisation et 4 voies majoritaires ont été montrées comme impliquées dans l'atrophie musculaire : IGF1-Akt-FoxO, myostatine, NFκB et glucocorticoides (Bonaldo, Sandri, 2013). Une étude histologique effectuée sur des biopsies de patients OPMD a mis en évidence une atrophie des fibres au niveau du muscle cricopharyngien, touchant plus particulièrement les fibres rapides oxydative de type MyHC IIa. Aucune atrophie n'a été observée dans les muscles cliniquement non atteints (quadriceps, SCM et deltoïdes) (Gidaro et al., 2013). Une étude similaire effectuée précédemment dans la souris modèle de l'OPMD A17.1 avait également mis en évidence une atrophie musculaire progressive touchant spécifiquement les fibres rapides avec une augmentation de l'atrogène Murf1 (Trollet et al., 2010).

4.4. Polyadénylation alternative (APA)

Deux études ont mis en évidence une dérégulation générale de la polyadénylation alternative dans des modèles de l'OPMD (cellules surexprimant PABPN1 mutée et la souris A17.1) (Jenal et al., 2012 ; de Klerk et al., 2012). Elle est caractérisée par un raccourcissement du 3'UTR consécutif à un usage non canonique des sites de polyadénylation proximaux ce qui conduit à une augmentation de l'expression de certains transcrits. Lorsque l'expression de la protéine est éteinte par RNAi la même dérégulation est retrouvée (Jenal et al., 2012), suggérant un mécanisme lié à une perte de fonction de PABPN1 dûe au piégeage de la protéine dans les agrégats nucléaires. Différentes hypothèses ont été émises pour expliquer ce défaut : 1) l'usage des sites proximaux de polyadénylation est favorisé en absence de PABPN1 car la protéine se fixe normalement sur ces sites prévenant ainsi leur usage, 2) le rôle de la stoechiométrie entre PABPN1, CPSF et la ARN polymérase II est responsable. En effet le complexe CPSF et la protéine PABPN1 fixent la RNA pol II lors de la transcription et le complexe CPSF se dissocie pour se fixer sur un site canonique de polyadénylation. Lorsque la stoechiométrie change suite à une diminution de niveau de PABPN1, le complexe CPSF se

dissocie prématurément conduisant à un usage des sites proximaux et à un raccourcissement du 3'UTR (Jenal et al., 2012 ; de Klerk et al., 2012).

4.5. Fibrose

La matrice extracellulaire (MEC) est une structure dynamique au sein des tissus qui joue un rôle dans la signalisation cellulaire, participe à l'homéostasie et la réparation tissulaire (Lieber, Ward, 2013). Dans le muscle strié squelettique la MEC participe à la maintenance de la structure du muscle et apporte un environnement nécessaire pour la contraction des fibres (Grounds et al., 2005) mais aussi participe à la biodisponibilité de certains facteurs tel que l'IGF-1. Cette MEC est constituée principalement de glycoprotéines structurelle et de protéines fibrillaires comme le collagène et les protéoglycannes (Frantz et al., 2010 ; Raghov, 1994). La fibrose, qui correspond à une accumulation excessive de MEC, est retrouvée dans un grand nombre de dystrophies musculaires : elle remplace progressivement le tissu musculaire lors des processus de réparation. Les muscles atteints de patients OPMD sont caractérisés par une fibrose excessive pouvant atteindre 40% du muscle (Bouazza et al., 2009 ; Gidaro et al., 2013). La fibrose a aussi été retrouvée dans les muscles de la souris modèle de l'OPMD A17.1 âgée (Trollet et al., 2010). Une étude récente rapporte une dérégulation de la MEC dans l'OPMD avec une diminution de la présence de la protéine procollagen C-endopeptidase enhancer 1, régulateur positif du dépôt de collagène, dans la MEC (Raz et al., 2013).

4.6. Vieillesse prématurée

Le vieillissement est un processus multifactoriel caractérisé dans le muscle squelettique par une diminution de la masse et de la force. Le métabolisme protéique est régulé par un réseau de mécanismes cellulaires qui contrôlent la concentration, le repliement, la localisation et l'interaction des protéines de leur synthèse à leur dégradation. La diminution de ce métabolisme est une caractéristique du vieillissement et s'accompagne d'une dérégulation du protéome qui peut, dans certains cas, conduire à la formation d'agrégats protéiques retrouvées dans des maladies liées à l'âge tel que la maladie d'Alzheimer ou de Huntington. Les complexe ubiquitine-protéasome et autophagie-lysosome servent à dégrader les protéines malformées, endommagées, agrégées et à réguler leur concentration protéique intracellulaire (Raz et al., 2014). Le protéasome est un cofacteur de nombreuses voies cellulaires impliquant

le contrôle qualité des protéines, la réponse au stress cellulaire, ou la régulation du cycle cellulaire et un dysfonctionnement de ce complexe est retrouvé de façon caractéristique au cours du vieillissement et des maladies neurodégénératives. La dégradation dépendante du protéasome est un mécanisme complexe. Les protéines sont d'abord ciblées par la machinerie de l'ubiquitination et sont ensuite reconnues et dégradées par le protéasome (Saez, Vilchez, 2014). Il a ainsi été montré que le niveau de PABPN1 diminue au cours du vieillissement musculaire par un mécanisme directement régulé par le complexe ubiquitine-protéasome (Raz et al., 2011) et par la protéine E3-ligase ARIH2. Au cours de cette étude il a été montré que dans les muscles de patients OPMD le niveau de *ARIH2* est plus faible comparé à des individus contrôles dont le niveau diminue de manière physiologique au cours du vieillissement. Ceci est exacerbé dans l'OPMD par une augmentation de l'usage d'un site de polyadénylation alternatif dans l'ARN de *ARIH2* dépendant de la diminution de PABPN1, la présence de la protéine dans les agrégats conduisant à une diminution de son niveau d'expression mais aussi à une perte fonctionnelle (Raz et al., 2014). *In vivo*, une réduction modérée du niveau de PABPN1 chez la souris par ARN interférence, qui mime une perte de fonction de PABPN1 dans l'OPMD causé par l'emprisonnement dans les agrégats, entraîne des caractéristiques histologiques similaires à celles du muscle âgé : atrophie, centro-nucléation, épaississement de la MEC, et un changement du typage des fibres (Riaz et al., 2016). L'OPMD présente donc des caractéristiques d'un vieillissement accéléré du muscle, et ceci est conforté par une étude montrant que le transcriptome issu de muscles de patients est similaire à celui de muscles sains mais issu de personnes de plus de 85 ans (Anvar et al., 2013).

4.7. Défauts mitochondriaux

Plusieurs études ont mis en évidence la présence de défauts mitochondriaux sur les muscles de patients OPMD. En 1974, Julien *et al* décrit le cas d'un patient présentant des inclusions pathologiques dans les mitochondries issus de muscle deltoïde de patients OPMD (Julien et al., 1974). Par la suite de nombreuses études de cas ont rapporté les mêmes observations (Pauzner et al., 1991 ; Pratt, Meyers, 1986 ; Schröder et al., 1995). Cependant toutes les études ne décrivent pas des structures exactement similaires, ce qui n'est pas en faveur d'une caractéristique phénotypique commune de la pathologie. Deux cas de délétion dans l'ADN mitochondrial dans des muscles de patients OPMD ont également été rapportés (Lezza et al.,

1997 ; Muqit et al., 2008). L'étude que nous avons réalisée sur les défauts mitochondriaux dans l'OPMD est présentée dans la partie « Résultats ».

5. Stratégies thérapeutiques dans l'OPMD

De nombreuses stratégies expérimentales ont été développées ou sont en cours de développement pour les DM, que ces approches soient pharmacologiques, géniques ou cellulaires (Masson, [sans date])

5.1. Traitements actuels pour l'OPMD

A l'heure actuelle aucun traitement curatif n'existe pour l'OPMD. Des interventions chirurgicales sont réalisées pour soulager les symptômes et améliorer la qualité de vie des patients. Elles consistent principalement en une chirurgie des paupières pour diminuer le ptosis et une chirurgie de pharynx pour limiter la dysphagie et améliorer la déglutition. Le ptosis est traité par deux techniques chirurgicales : la résection de l'aponévrose du muscle releveur des paupières et la suspension de la paupière supérieure au muscle frontal. Ces interventions sont proposées quand le ptosis devient gênant pour la vision (Harish et al., 2015). L'intervention chirurgicale pour améliorer la dysphagie est appelée myotomie cricopharyngienne extramuqueuse et consiste à réaliser une section au niveau du muscle cricopharyngien pour relâcher la tension musculaire (Duranceau et al., 1980) (St Guily et al., 1995). La déglutition est améliorée pendant quelques années mais une réapparition des symptômes a lieu dans la majorité des cas dans les 3 ans après l'intervention (Coiffier et al., 2006 ; Gidaro et al., 2013).

La chirurgie reste un traitement symptomatique, et n'est envisageable que lorsque les symptômes sont déjà bien établis. De nombreuses stratégies expérimentales sont donc en cours d'étude afin de développer un traitement plus pérenne pour l'OPMD.

5.2. Etudes expérimentales : stratégies anti-agrégation et anti-apoptose

La majorité des stratégies expérimentales développées pour l'OPMD consistent en approches pharmacologiques afin de diminuer le nombre d'agrégats nucléaires et/ou l'apoptose. De nombreuses études expérimentales ont montré le caractère toxique des agrégats de PABPN1 conduisant à une létalité cellulaire (Bao et al., 2002, 2004 ; Bhattacharjee, Bag, 2012 ; Bhattacharjee et al., 2012 ; Davies et al., 2006, 2005 ; Hino et al., 2004). *In vitro* l'utilisation

de molécules chimiques telles que des composés anti-amyloïdes (Congo-Red, doxycycline), ou des molécules chaperonnes comme les protéines de choc thermique HSP40, HSP70, HSP27, HSP105, HDJ-1 et des chaperonnes issues de la levure ou de bactéries conduisent à une diminution du nombre d'agrégats et à une amélioration de la mortalité cellulaire. Ces chaperonne solubilisent PABPN1 mutée et stabilisent sa conformation mais ne modifient par le niveau d'expression de la protéine (Abu-Baker et al., 2003 ; Bao et al., 2002, 2004 ; Wang, Bag, 2008). Un même effet est observé avec des molécules capables d'induire un stress cellulaire et l'expression de protéines de choc thermique et/ou leur relocalisation au niveau du noyau comme le ZnSO₄, le 8-hydroxyquinoline ou encore l'ibuprofène et l'indométhacine. Elles augmentent la solubilité de la protéine (Wang et al., 2005). Il semble que l'effet de ces molécules chaperonnes soit lié à leur capacité à reformer proprement la protéine PABPN1 avec l'induction d'un stress.

Ces données *in vitro* ont été complétées *in vivo*, avec l'utilisation de molécules capables de prévenir la formation d'agrégats : chez la souris OPMD A17.1, l'utilisation de tréhalose, disaccharide ayant montré son effet bénéfique dans d'autres maladies à agrégats, ajouté à l'eau de boisson diminue la faiblesse musculaire et l'apoptose. Le tréhalose conduit également à une dégradation de la protéine PABPN1 par le protéasome (Davies et al., 2006). Actuellement un essai clinique israélo-canadien (NCT02015481) utilisant le tréhalose en injection intraveineuse est en cours chez des patients OPMD. Dans de nombreuses études, il est difficile de distinguer un effet directement lié à la diminution de l'agrégation ou de l'apoptose, certains composés ayant en plus un effet anti-apoptotique propre. L'utilisation de molécules telles que la doxycycline ou la cystamine chez la souris a montré un effet bénéfique sur le phénotype musculaire en diminuant le nombre d'agrégats mais en agissant aussi directement sur l'apoptose (Davies et al., 2010, 2005). Une amélioration du phénotype musculaire est obtenu dans le modèle drosophile de l'OPMD avec les protéine chaperonnes HSP70 et la protéine anti-apoptotique p53 (Chartier et al., 2006). L'utilisation de Guanabenz et du 6-aminophenanthridine, deux drogues antiprion, réduisent également le nombre d'agrégats chez la mouche et améliorent le phénotype musculaire. Ces drogues semblent agir sur la large sous unité de l'ARN ribosomal (Barbezier et al., 2011).

Un autre outil en cours d'étude est l'utilisation d'« intrabodies », petits fragments d'anticorps d'environ 200 acides aminés ciblant une protéine intracellulaire. Ils contiennent la région variable Fv de l'anticorps qui contient la spécificité et l'affinité pour un épitope. Ils peuvent

être délivrés directement sous forme protéique ou sous forme d'une molécule d'ADN codant l' « intrabody ». Ces « intrabodies » ont déjà été testés dans des études expérimentales pour des pathologies neurodégénératives causées par des protéines malformées ou agrégées comme la maladie d'Alzheimer, de Huntington, ou de Parkinson (Harish et al., 2015). Dans l'OPMD une étude avec un « intrabody » ciblant la protéine PABPN1 dans des modèles cellulaires et de drosophile ont montré une diminution et une prévention de l'agrégation (Chartier et al., 2009 ; Verheesen, 2005).

5.3. Thérapie cellulaire

Dans le cas du muscle, la thérapie cellulaire peut être définie comme l'administration de cellules chez un patient afin de contribuer et d'améliorer à la régénération tissulaire. Dans ce cadre, deux stratégies peuvent être envisagées : (i) l'utilisation de cellules obtenues à partir d'un donneur non atteint (transplantation hétérologue) et (ii) l'utilisation de cellules obtenues à partir du patient (transplantation autologue) mais qui doivent être modifiées génétiquement *in vitro* afin de corriger le défaut génétique. Au niveau musculaire, la cellule satellite est la principale source physiologique de précurseurs myogéniques chez l'adulte. Après intégration dans le muscle du patient, les myoblastes sont capables de contribuer à la régénération musculaire et de produire la protéine manquante dans le muscle hôte. Dans le cas des dystrophies musculaires, la thérapie cellulaire présente des avantages mais aussi des inconvénients : le muscle squelettique est une cible idéale, les fibres musculaires étant post-mitotiques, avec un renouvellement faible et avec des cellules souches connues et caractérisées - les cellules satellites - (Negroni et al., 2016), cependant le tissu musculaire constitue 40% du corps humain, ce qui en fait une zone cible très importante à traiter et représente une limite sérieuse dans une perspective clinique dans le cas d'atteinte musculaire généralisée.

L'OPMD fait partie de ce qu'on appelle un cas d'école pour la mise en place d'une stratégie de thérapie cellulaire puisque les patients présentent à la fois des muscles atteints et non atteints permettant ainsi de réaliser une autogreffe sans risque de rejet du greffon : les myoblastes prélevés et amplifiés des muscles non atteints sont réinjectés dans les muscles atteints. De plus les muscles atteints sont restreints, de tailles limitées et accessibles. Enfin les cellules injectées peuvent présenter un comportement normal bien qu'elles portent la mutation. En effet on ne sait pas actuellement pas si ces cellules présenteront un défaut

fonctionnel dans un environnement atteint, ni au bout de combien de temps cet éventuel défaut pourrait se manifester

En collaboration avec le Pr. Jean Lacau St Guily et Pr. Sophie Périé (ORL, Hopital Tenon, Paris), le laboratoire a initié en 2004 un essai clinique de thérapie cellulaire autologue pour l'OPMD chez l'homme (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00773227). Il consiste à prélever des cellules musculaires dans un muscle non atteint d'un patient OPMD. Après une mise en culture, les cellules, dont l'équipe avait montré qu'elles ne présentaient pas les défauts de prolifération et de différenciation lorsqu'elles sont isolées du muscle (Périé et al., 2006), sont amplifiées et, après validation (prolifération, longueurs de télomères), réinjectées dans les muscles du pharynx après scarifications pour stimuler la régénération, le but étant de renforcer la motricité de ce groupe musculaire. Les premiers résultats sont positifs et encourageants : les résultats sur 12 premiers patients montrent un effet bénéfique après 3 ans, dépendant de la dose de cellules injectées, sans toxicité (Périé et al., 2013) et 16 nouveaux patients sont traités actuellement.

Malgré une amélioration de la déglutition chez les patients, les cellules greffées portent toujours la mutation responsable de l'OPMD. Le comportement de ces cellules isolées du muscles non atteints mais portant le gène muté et injectées dans cet environnement pathologique est difficilement prévisible. Il semble donc nécessaire de développer une stratégie pour corriger les cellules avant de les injecter ou pour traiter directement ces muscles par injection locale. Pour cela une stratégie de thérapie génique pour corriger la mutation est en cours de développement.

5.4. Thérapie génique

Les études expérimentales en cours d'étude résumées ci-dessus ont toute pour objectif de pallier aux conséquences physiologiques de la mutation de PABPN1 mais aucune d'entre elles ne vise directement à traiter la cause génétique c'est à dire l'expansion pathologique de triplets (GCN). Dans le cadre de ma thèse, nous avons développé en collaboration avec George Dickson à Londres une stratégie de thérapie génique basée sur l'extinction de PABPN1 par RNAi et le remplacement par une séquence d'ADN résistante au RNAi, en utilisant la dégénérescence du code génétique, qui est capable d'exprimer une protéine non mutée et fonctionnelle. La description spécifique de cette stratégie et les résultats obtenus sont décrits dans la partie « Résultats ».

5.4.1. Généralités

« L’American Society of Gene and Cell Therapy » définit la thérapie génique comme un ensemble de stratégies qui modifient l’expression d’un gène ou qui corrigent un gène anormal. Chaque stratégie implique l’utilisation d’une molécule d’ADN ou d’ARN spécifique à introduire au sein de cellules cibles afin de produire un effet physiologique désiré.

Ainsi différentes stratégies sont envisageables :

- Introduction d’un gène pour remplacer une protéine non fonctionnelle : elle consiste à insérer un gène exogène appelé transgène dans le noyau d’une cellule cible (généralement sous forme d’ADNc). Dans ce cas la cellule va exprimer la protéine saine afin de la substituer à la protéine dysfonctionnelle (thérapie de substitution) ou corriger un effet secondaire de la mutation (thérapie de compensation). Cette stratégie s’applique aux maladies monogéniques et à perte de fonction.

- Réparation d’un gène : il consiste à corriger un gène défectueux en remplaçant la séquence mutée par une séquence saine (genome editing en anglais). Ces dernières années ont vu apparaître l’utilisation de nouvelles techniques basées sur la recombinaison homologe et les nucléases de type Talen ou CRISPR/Cas9.

- Inhibition de l’expression d’un gène : La stratégie consiste à diminuer l’expression d’un gène en utilisant l’ARN interférence (RNAi), le blocage de la traduction par un oligonucléotide antisens (AON), ou encore des ribozymes (ARN qui possède une activité catalytique). Ces stratégies fonctionnent pour des maladies à gain de fonction.

- Corriger un épissage alternatif non correct ou générer une protéine tronquée, mais au moins partiellement fonctionnelle : Dans le cas où l’introduction d’un exon illégitime lors de l’épissage d’un gène rend la protéine dysfonctionnelle et responsable d’une maladie, il est possible d’utiliser la technique dite du « saut exon » qui permet de rétablir un épissage normal et de produire une protéine fonctionnelle. De même, pour des protéines présentant des domaines répétés et au moins partiellement dispensables, la même approche permet de supprimer une mutation (non-sens ou décalage du cadre de lecture) en retirant l’exon portant cette mutation dans l’ARNm mature. Le résultat est la production d’une protéine tronquée,

mais qui peut garder tout ou partie de ses fonctions (par exemple production de quasi-dystrophine pour la myopathie de Duchenne ou DMD).

Actuellement plus de 2000 essais cliniques de thérapie génique ont lieu dans le monde. La plupart impliquent l'addition d'un gène. Plus de 60% des essais sont réalisés pour le cancer mais la thérapie génique peut être utilisée dans le cas de nombreuses maladies acquises comme pour la maladie de Parkinson, ou dans le cas d'infection pour modifier les cellules du système immunitaire, l'expression d'anticorps ou encore la modification de récepteurs aux pathogènes. Dans le cas de pathologies musculaires, il a été obtenu récemment des résultats très encourageants à la fois dans un modèle de souris et de chien de myopathie myotubulaire, pathologie causée par une perte de fonction dans le gène de la myotubularine et conduisant à une atteinte généralisée du tissu musculaire. L'injection systémique d'un AAV (*voir partie vecteur viraux*) exprimant le gène de la myotubularine a permis une correction de la pathologie dans les deux modèles et la prolongation de leur espérance de vie (Childers et al., 2014).

En 1971, le journal Science publie un éditorial sur la thérapie génique et ce bien avant le décryptage du génome humain (Fox, Littlefield, 1971). A l'époque les auteurs, plutôt pessimistes sur l'utilisation de la thérapie génique pour soigner des pathologies humaines pointent du doigt les défis à surpasser : possibilité de traiter seulement des maladies récessives, difficulté de traiter l'ensemble des cellules d'un organisme entier, mutagenèse possible liée à l'insertion d'un transgène, difficulté de trouver le vecteur idéal et dangerosité d'utiliser des virus. A l'heure actuelle malgré les énormes progrès réalisés dans le domaine de la biologie moléculaire la plupart de ces défis restent toujours d'actualité. Concernant la vectorisation de la molécule thérapeutique, deux grandes catégories existent à l'heure actuelle, basées sur des méthodes non virales ou virales. Dans le premier cas l'acide nucléique thérapeutique (ADN, oligonucléotide antisens, siARN) est introduit directement sous sa forme nue ou vectorisée par des molécules chimiques (liposomes ou polymères cationiques généralement) ou par l'intermédiaire de méthodes physiques (électroporation ou injection hydrodynamique par exemple) au sein de la cellule cible. Dans le deuxième cas, la propriété naturelle des virus d'infecter des cellules est utilisée pour un transfert de gène dans les cellules cibles. Les virus les plus utilisés dans le cadre de la thérapie génique sont les

suivants : lentivirus (Lv), adénovirus (ad), adéno-associated virus (AAV), herpes simplex virus et gamma-retrovirus (Tableau 5) (Nayerossadat et al., 2012).

Type de virus	Génome	Tropisme	Particularités	Avantages	Inconvénient
Gamma-retrovirus	Virus à ARN	Cellules quiescentes	Insertionnel	Jusqu'à 8 kb ADN hétérologue, large tropisme, faiblement immunogène, titres élevés.	Expression courte, faible efficacité de transfection, instable, risque de mutation insertionnelle élevée.
Lentivirus	Virus à ARN	Cellules répliquatives et quiescentes	Insertionnel	Longue expression, faiblement immunogène, jusqu'à 9kb ADN hétérologue, Possibilité de faire des vecteurs défectifs pour l'intégration	Possible mutation insertionnelle, Faible tropisme pour muscle et foie, expression transitoire pour les vecteurs défectifs pour l'intégration
Herpes simplexe virus	Virus à ADN	Cellules répliquatives et quiescentes	Episomal	Possibilité de cloner de larges gènes et aussi d'encapsider plusieurs gènes. Fort tropisme pour les neurones	Expression transitoire, inflammatoire, immunogène
Adénovirus	Virus à ADN	Cellules répliquatives et quiescentes	Episomal	Jusqu'à 8kbp ADN hétérologue, niveau d'expression transgène élevé, titres élevés	Réponse immunitaire inflammatoire à cause de la capsid, expression transitoire du transgène,
Virus associé à l'adénovirus (AAV)	Virus à ADN simple brin	Cellules répliquatives et quiescentes	Episomal	Non pathogène, large tropisme, stable, efficace.	Capacité encapsidation limitée

Tableau 5 : Vecteurs viraux utilisés en Thérapie génique

Ils sont modifiés génétiquement pour remplacer les séquences pathogènes du virus responsables de leur réplication par le gène thérapeutique, avec une capacité variable selon les types de virus, mais toujours limitées. Les particules virales contenant le transgène sont ensuite purifiées et pourront servir à traiter des cellules, un organe, ou un organisme (Wang, Gao, [sans date]) (Figure 28).

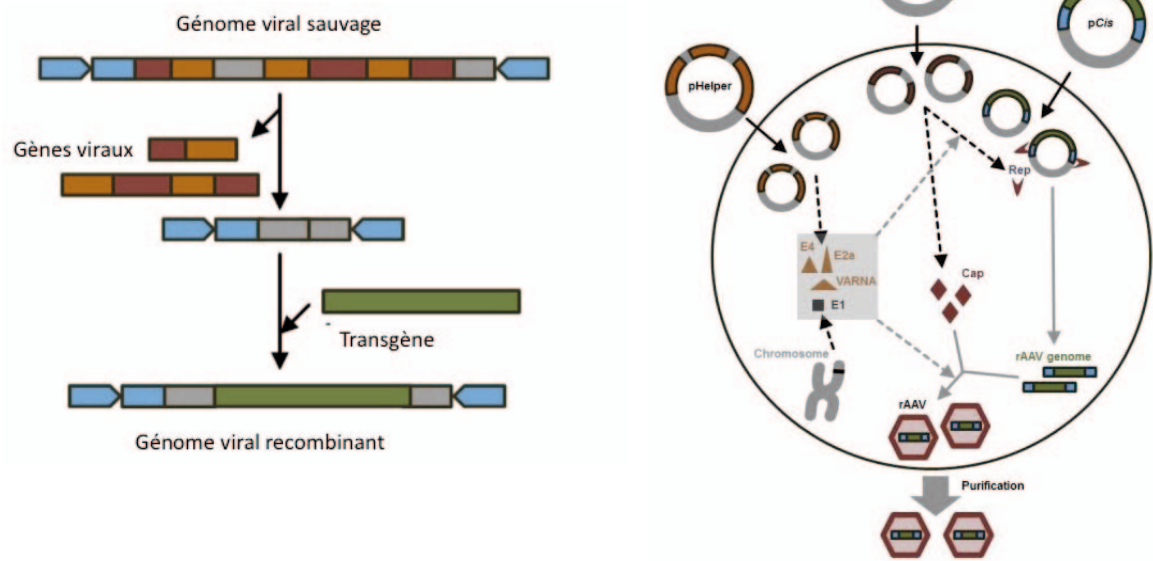


Figure 28 : Gauche - Modification génétique des vecteurs de thérapie génique viraux. Droite - Exemple de production d'un vecteur de thérapie génique viral de type AAV recombinant.

Gauche : Un virus sauvage contient des séquences virales représentées en orange, rouge et gris et des séquences nécessaires pour l'assemblage des particules virales. La plupart des séquences sont enlevées pour introduire le transgène et empêcher sa réplication. Droite : Pour produire un vecteur viral AAV qui sera utilisé dans le cadre de la thérapie génique, quatre éléments sont essentiels : (1) un plasmide portant le génome viral contenant le transgène d'intérêt et les séquences d'assemblage, (2) un plasmide contenant les gènes codant les protéines virales de capsid, (3) et de réplication, et aussi (4) un plasmide dit helper contenant des gènes provenant de virus types adénovirus. La cotransfection des plasmides dans une lignée cellulaire conduit à la production de particules virales contenant le transgène qui seront purifiées par la suite (Wang, Gao, [sans date]).

Le vecteur de thérapie génique idéal doit pouvoir être produit à faible coût et facilement, faiblement immunogène, non toxique, avec la possibilité d'apporter une séquence ADN relativement longue. Il doit avoir la capacité d'infecter les cellules quiescentes et répliquatives, protéger le transgène des nucléases intracellulaires, transporter le transgène jusqu'au noyau, ne pas être source de mutation et présenter une expression à long terme (Valsalakumari et al.,

2013). L'ensemble de ces caractéristiques n'est actuellement pas réuni par un type de vecteur viral en particulier

5.4.2. Thérapie génique pour OPMD

Dans le cas de l'OPMD, il n'est pas possible de cibler spécifiquement l'allèle muté de PABPN1. La stratégie que nous développons consiste à éteindre par RNAi l'expression de PABPN1 (mutée et sauvage) et d'exprimer une forme fonctionnelle de PABPN1. Pour cela, la redondance du code génétique est mise à profit pour créer un gène qui n'est pas ciblé par les outils d'interférence (shARN et siARN) mais dont la séquence protéique sera la même que celle de PABPN1 sauvage. Cette stratégie de thérapie génique de remplacement est développée pour à la fois traiter les muscles atteints *in vivo* en utilisant un AAV, ou traiter des cellules provenant d'un muscle non atteint cliniquement (mais portant la mutation) *ex vivo* en utilisant un lentivirus avant de les réinjecter chez les patients.

5.4.3. Interférence à ARN

Le mécanisme de l'interférence à l'ARN (RNAi) a été découvert chez le ver *C. elegans* sous la forme d'un petit ARN non codant capable d'inhiber l'expression des gènes. Il s'agit d'un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle de résistance aux parasites endogènes et aux acides nucléiques exogènes, mais qui régule aussi l'extinction des gènes codant des protéines, et qui est présent chez la plupart des eucaryotes. Ce mécanisme permet d'inhiber l'expression d'un gène en dégradant l'ARNm complémentaire ou en empêchant sa traduction par l'intermédiaire d'un petit ARN double brin non codant long de 21 à 22 nucléotides appelé siARN pour petit ARN interférent (small interférent RNA) caractérisé par 2 nucléotides en 3' non appariés. Il est pris en charge par la machinerie de la voie de l'RNAi. Ces siARNs sont générés à partir d'ARN double brin (ARNdb) précurseurs par l'endoribonucléase III appelée Dicer. La voie de l'interférence à l'ARN passe par la dégradation d'un ARN cible et nécessite un complexe nucléase. Dans le cas des miARN et siARN le complexe RISC est l'effecteur. Ce complexe ribonucléique comprend des protéines de la famille Argonautes dont Ago-2 qui possède le domaine catalytique pour le clivage. Ainsi les siARN sont pris en charge par le complexe RISC et Ago-2 clive et libère un des deux brins. Le complexe RISC est activé et l'ARN simple brin sert de guide et conduit la spécificité par une reconnaissance de l'ARNm

cible basée par l'appariement de base (Kim, Rossi, 2008). Les miARN quand à eux sont des duplexes endogènes qui régulent l'expression des gènes post-transcriptionnellement en utilisant le complexe RISC. Ils se fixent au niveau du 3'UTR des ARNm cibles. Ces duplexes ont un appariement de bases incomplets (2 à 8 nt) et le mécanisme de base est la répression de la traduction, même si la dégradation de l'ARN peut se produire dans le cas d'une complémentarité parfaite. Ces miARNs sont endogènes au génome et appartiennent à la fraction non codante. Ils sont exprimés comme de longs transcrits appelés pri-miARNs, métabolisés dans le noyau en boucle de 60-70 nt par le complexe protéique Drosha/DCRG8 en pré-miARN, qui seront eux-mêmes maturés par le complexe Dicer dans le cytoplasme après avoir été exporté par le transporteur Exp5. Un des brins est ensuite incorporé au complexe RISC.

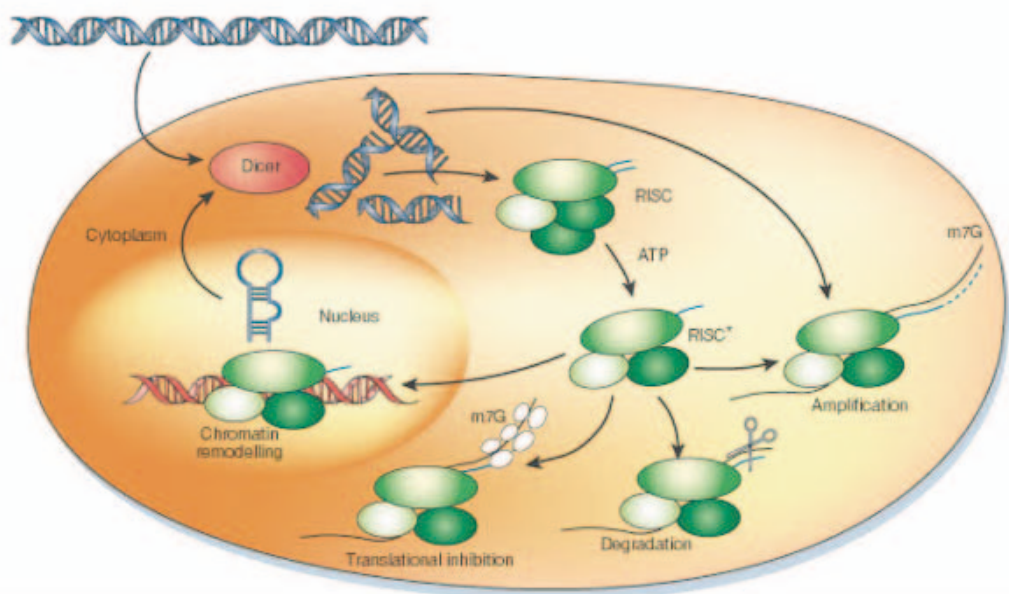


Figure 29: Mécanisme moléculaire de l'interférence à l'ARN.

Des ARN double brin provenant d'ARN synthétiques, de virus ou transcrits par le génome nucléaire sont reconnus et maturés par Dicer en siARN. Le siARN est lui-même maturé par le complexe RISC qui devient actif en libérant un des fragments du duplexe. Le complexe RISC actif régule l'expression des gènes en inhibant la traduction ou dégradant l'ARN correspondant. Dans certains cas les complexes peuvent aussi remodeler la chromatine (Hannon, 2002)

L'utilisation de l'RNAi comme outil thérapeutique est développée dans de nombreuses stratégies expérimentales et a montré son efficacité dans le cas du traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge et l'infection liée au virus syncytial respiratoire, pour lesquels des essais cliniques sont en cours. Des études précliniques existent pour des maladies

tel que certains cancer, des maladies auto-immunes, génétiques dominantes ou des infections virales (Kim, Rossi, 2007). Ces études sont développées selon deux stratégies: 1) utilisation d'une molécule siARN double brin synthétique de 21 bases apportée directement dans les cellules une fois complexée par des liposomes cationiques ou 2) l'utilisation d'ADN double brin (plasmide ou intégré dans un vecteur viral) qui produit un siARN final mais après expression par l'ARN polymérase III et maturation d'un ARN plus long en forme de boucle (shARN pour short hairpin ARN) dans le noyau. Le shARN est transporté dans le cytoplasme par la voie d'export des microARN et maturés en siARN par Dicer. L'utilisation directe d'un siARN est simple et généralement efficace mais son effet est transitoire, alors que l'utilisation de l'*RNAi* basée sur l'utilisation d'une molécule d'ADN (shARN) est plus stable et peut être envisagée dans le cas de thérapie génique.

Résultats

Article n°1

Mitochondrial Dysfunction Reveals the Role of mRNA Poly(A) Tail Regulation in Oculopharyngeal Muscular Dystrophy Pathogenesis

*Aymeric Chartier‡, Pierre Klein‡, Stéphanie Pierson, Nicolas Barbezier,
Teresa Gidaro, François Casas, Steven Carberry, Paul Dowling, Laurie Maynadier,
Maëlle Bellec, Martine Oloko, Claude Jardel, Bodo Moritz, George Dickson,
Vincent Mouly, Kay Ohlendieck, Gillian Butler-Browne, Capucine Trollet‡,
Martine Simonelig‡*

‡ AC and PK contributed equally to this work. CT and MS also contributed equally to this work.

PLoS Genet. 2015 Mar 27;11(3):e1005092.

Contexte de l'étude

Dans cette étude nous avons mis en évidence des défauts mitochondriaux dans les muscles de patients OPMD et nous nous sommes intéressés en collaboration avec l'équipe de Martine Simonelig, aux mécanismes moléculaires sous-jacents.

Les mitochondries sont des organites cytoplasmiques présents dans toutes les cellules du corps humain à l'exception des érythrocytes. Héritées de la mère, elles peuvent être de quelques centaines à plusieurs milliers en fonctions du type cellulaire. Elles possèdent de nombreuses fonctions essentielles aux cellules comme la biosynthèse des acides aminés et des stéroïdes, l'oxydation des acides gras et la participation aux mécanismes d'apoptose, mais leur principal rôle est celui de la genèse d'énergie pour la cellule sous forme de molécules d'ATP. Le complexe enzymatique de la chaîne respiratoire est un ensemble de plusieurs complexes protéiques (complexes I, II, III et IV) reliés ensemble par deux pompes à protons (ubiquinon/coenzyme Q et cytochrome C). Ce complexe enzymatique utilise l'apport externe à la cellule pour générer un gradient de protons au travers de la membrane protéique et l'énergie de ce gradient conduit à la synthèse d'ATP par l'ATP synthase (complexe V) (Schon, Przedborski, 2011) (Figure 27). Ce complexe protéique est codé conjointement par le génome nucléaire et le génome mitochondrial.

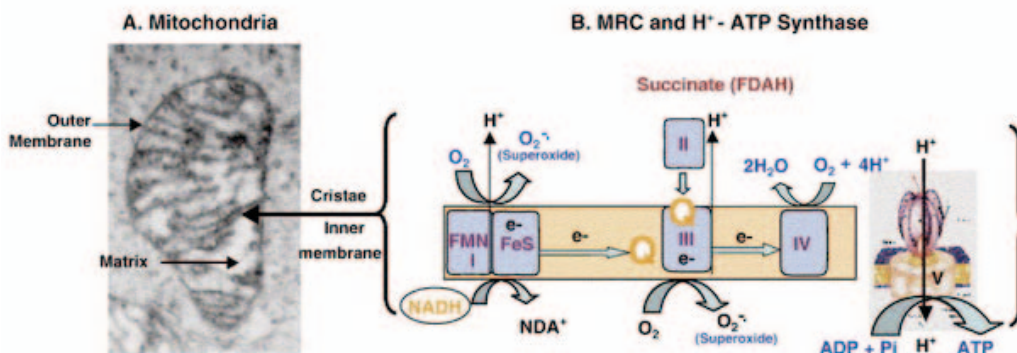


Figure 30: Structure de la mitochondrie.

A) Observation en microscopie électronique d'une mitochondrie. Les membranes internes et externes ainsi que l'espace entre les deux sont visualisés par des flèches. B) Représentation schématisée de la chaîne respiratoire mitochondriale avec les différents complexes et l'ATP synthase localisés au niveau de la membrane interne (Chen et al., 2005).

Résultats

Nous avons réalisé une analyse protéomique (en collaboration avec Kay Ohlendieck, Maynooth University) sur des muscles sternocleidomastoïdiens issus de patients OPMD comparé à des muscles issus d'individus contrôles. Cette analyse a mis en évidence 70 protéines dérégulées (21 sur-exprimées ; 49 sous-exprimées) et parmi les protéines sous exprimées, 78% d'entre elles sont des protéines mitochondriales. Des défauts dans la structure des mitochondries ont déjà été observés lors de précédentes études histologiques sur des coupes de muscles OPMD (*voir chapitre défauts mitochondriaux*). Nous avons recherché les causes moléculaires conduisant à cette dérégulation de l'expression des protéines mitochondriales.

Après confirmation de la sous-expression des protéines mitochondriales par western-blot sur des échantillons de patients, nous avons montré qu'une même diminution est observée au niveau de l'ARNm indiquant une dérégulation transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle plutôt que traductionnelle. De façon intéressante, une précédente analyse transcriptomique effectuée sur les modèles de souris et de drosophile OPMD (Anvar et al., 2011) avait mis en évidence une dérégulation de l'expression des gènes nucléaires codant des protéines mitochondriales, et ceci à un temps précoce avant même l'apparition des symptômes. Ces dérégulations sont corrélées avec une diminution de l'activité enzymatique des complexes de la chaîne respiratoire (complexe I chez la souris, majoritairement les complexes I et V chez l'homme) et une augmentation du stress oxydatif. Chez la drosophile OPMD l'expression de PABPN1 mutée dans les muscles des ailes se traduit au niveau phénotypique par une posture anormale. Nous avons cherché les protéines impliquées dans la dérégulation post-transcriptionnelle observée via un crible de mouches hétérozygotes mutantes pour diverses protéines de liaison à l'ARN ainsi que des protéines participant à la régulation de la queue poly(A) des ARNm. De façon intéressante lorsque les protéines impliquées dans la régulation de la queue poly(A) comme les protéines du complexe de déadénylation CCR4/NOT ou encore ses cofacteurs sont mutées, une amélioration du phénotype musculaire est observée dans la mouche OPMD. Nous avons ainsi analysé la taille de la queue poly(A) des ARN codant des protéines mitochondriales et nous avons mis en évidence un raccourcissement progressif à la fois chez la drosophile et chez la souris OPMD alors que les ARN codant des protéines non mitochondriales ne présentaient pas de modification de la taille de leur queue poly(A). Ce raccourcissement est visible à des temps précoces alors que le phénotype musculaire de l'OPMD n'est pas encore observable. La dérégulation de la déadénylation est

la diminution de la quantité d'ARNm codant des protéines mitochondriales : les drosophiles mutantes pour les protéines du complexe CCR4/NOT ont une expression des ARNm codant des protéines mitochondriales similaire à celle d'une drosophile contrôle. Cependant le complexe CCR4/NOT qui normalement coordonne la déadénylation n'a pas de spécificité pour des ARN particuliers, par contre certains de ses cofacteurs sont spécifiques et recrutent le complexe par des interactions directes. Parmi les cofacteurs analysés, la mutation de la protéine Smaug chez la drosophile améliore le phénotype musculaire et rétablit l'expression des ARN mitochondriaux à un niveau normal. La protéine Smaug forme des granules cytoplasmiques impliqués dans la déadénylation et la régulation de la traduction et nous avons montré que ces granules augmentent en nombre et en taille dans le modèle drosophile OPMD. De plus les ARN mitochondriaux dérégulés chez la souris et la drosophile OPMD sont ceux naturellement enrichis en séquence de reconnaissance de la protéine Smaug comparé à des transcrit pris aléatoirement. Nous avons confirmé la fixation de la protéine Smaug sur ces ARN mitochondriaux par immunoprécipitation. Enfin au cours de cette étude nous avons aussi mis en évidence un dysfonctionnement nucléaire dans l'étape de clivage du 3'UTR des pré-ARNm (étape précédant la polyadénylation). Ainsi à un instant t le ratio des ARNm non clivés par rapport aux ARN clivés dans la condition OPMD est supérieur à celui de la condition contrôle. Ce défaut touche tous les ARNm sans spécificité et n'a pas d'impact sur leur niveau d'expression.

Conclusion

Notre étude a permis de mettre en évidence que Smaug est un régulateur des ARN nucléaires codant des protéines mitochondriales. Dans le cas de l'OPMD, l'expansion pathologique de PABPN1 conduit à un dysfonctionnement de l'étape de clivage et de polyadénylation des ARNs et les ARN mitochondriaux sont activement déadénylés dans des granules cytoplasmiques contenant la protéine Smaug conduisant à leur déstabilisation et à la diminution de leur expression en ARN et en protéine. Ceci entraîne un dysfonctionnement des mitochondries, une augmentation du stress oxydatif et une diminution de l'activité des enzymes de la chaîne respiratoire. Ce mécanisme est observable à des stades précoces, avant l'apparition des symptômes.

Discussion

Au cours de cette étude nous avons décrypté le mécanisme moléculaire conduisant à des défauts mitochondriaux dans l'OPMD : une dérégulation de l'étape de clivage des ARNm qui combinée à une plus grande susceptibilité des ARN mitochondriaux impliquant Smaug entraîne une déadénylation active de ces derniers et donc à leur sous-expression.

La sous-expression des ARN mitochondriaux est retrouvée conservée entre les patients OPMD, les modèles de souris et de drosophile de la maladie. Ceci renforce la pertinence de ces modèles dans lesquels a déjà été mis en évidence des dysfonctionnements retrouvés chez les patients, tels qu'une dérégulation du complexe ubiquitine/protéasome, une atrophie, une augmentation de la fibrose et la présence d'agrégats nucléaires. Ces modèles animaux sont transgéniques et co-expriment donc la protéine PABPN1 endogène et une forme exogène mutée de la protéine. Ainsi la surexpression de PABPN1 mutée permet de reproduire le phénotype pathologique. A l'heure actuelle aucun consensus clair n'est établi concernant l'effet de la mutation de PABPN1 dans l'OPMD : un gain de fonction toxique, une perte de fonction ou les deux. La dérégulation de la déadénylation des ARNm mitochondriaux retrouvée dans notre étude est similaire au défaut retrouvé dans un modèle de drosophile de perte de fonction totale pour la protéine PABPN1 (Benoit et al., 2005). Cependant au cours du crible que nous avons effectué lors de cette étude, la diminution de l'expression de PABPN1 dans le modèle de drosophile OPMD conduit à une amélioration des défauts musculaire. Ceci suggère aussi un gain de fonction toxique de la protéine dans l'OPMD. La protéine PABPN1 participe à de nombreux mécanismes de régulation post-transcriptionnels des ARNm et parmi ceux-ci le seule ayant été montré dérégulé concerne l'APA (Jenal et al., 2012). Pour la première fois nous avons mis en évidence un défaut dans la première étape de régulation 3' des ARNm : l'étape de clivage dans le modèle de drosophile de l'OPMD. Ce mécanisme nécessite aussi d'être investigué chez la souris A17.1 et dans les biopsies de patients. Cette étape fait intervenir un complexe multiprotéique et bien que des études biochimiques *in vitro* ont montré que PABPN1 semble dispensable dans ce mécanisme (Zhao et al., 1999b), il se pourrait qu'elle y participe au moins dans le muscle comme cofacteur, ou même être seulement présente lors de cette étape comme senseur de son bon déroulement avant la suivante. Dans le cas de l'OPMD, l'évènement initial serait donc le dysfonctionnement dans ce mécanisme. Bien que n'entraînant pas de diminution de l'expression des gènes et touchant virtuellement tous les transcrits, ce défaut pourrait être générateur d'un stress entraînant une

cascade d'évènements conduisant à une dérégulation plus spécifique des ARN mitochondriaux.

L'étude protéomique a été effectuée sur les muscles sternocléidomastoïdiens qui sont cliniquement non atteints (même s'ils présentent des signes pathologiques tels que la présence d'agrégats, des vacuoles bordées, des noyaux internalisés). La maladie étant progressive, ils peuvent être considérés comme pré-symptomatiques au moment de l'étude. Les défauts mitochondriaux sont aussi retrouvés chez la souris et la mouche OPMD avant l'apparition d'un phénotype musculaire. Ainsi, cette dérégulation des ARN mitochondriaux est un événement précoce faisant partie des phases initiales de la pathologie et pourrait participer à initier d'autres dérégulations dans la pathologie. Les mitochondries jouent un rôle central dans les mécanismes d'apoptose, et une diminution dans le flux de protons au travers de la membrane des mitochondries suite à une dérégulation dans la chaîne respiratoire conduit à une augmentation du mécanisme (Kwong et al., 2007). Notre étude révèle que les ARNm mitochondriaux présentent une sensibilité plus importante que les d'autres types d'ARNm à une dérégulation. Ainsi cette sensibilité pourrait être expliquée par le fait que ces ARN servent de senseur aux défauts de l'homéostasie de la cellule. Leur sensibilité accrue dans le cas d'une toxicité cellulaire permettrait de déclencher les mécanismes d'apoptose et l'élimination des cellules non viables. Un défaut primaire entraînant un stress cellulaire et conduisant à un défaut de polyadénylation et à une diminution de l'activité des mitochondries pour éliminer seulement les cellules dysfonctionnelles et permettre la survie de l'organisme.

Il reste aussi à étudier si une telle dérégulation transcriptionnelle pourrait expliquer plus généralement des défauts mitochondriaux retrouvés fréquemment dans d'autres pathologies ou d'autres conditions, telles que les maladies neurodégénératives liées à l'âge comme la maladie d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington ou encore la sclérose latérale amyotrophique. Des interactions spécifiques entre les protéines mutées à l'origine de ces maladies et les mitochondries ont généralement été observées mais tous les mécanismes ne sont pas compris. Tous les organes peuvent être atteints par des défaut mitochondriaux, mais ceux comme le cerveau, le muscle, le cœur et le foie où la demande énergétique est élevée, sont plus fréquemment impactés (Magner et al., 2015) et ils ont ainsi également été rapportés dans de nombreuses pathologies musculaires tel que la dystrophie musculaire de Duchenne, les myopathies mitochondriales, la dystrophie musculaire congénitale de type Ullrich ou encore la myosite à inclusion (IBM), cette dernière étant la maladie musculaire la plus fréquente chez les personnes de plus de 50 ans (Magner et al., 2015). Une altération des

mitochondries est aussi observée au cours du vieillissement avec un déclin de leurs fonctions, des changements morphologiques, une réduction de leur nombre et de la capacité enzymatique de leur chaîne respiratoire. Ces dysfonctionnements conduisent entre autre à la formation de radicaux libre qui sembleraient jouer un rôle prépondérant dans le processus de vieillissement en entraînant des dommages cellulaires (Bratic, Larsson, 2013). Le métabolisme mitochondrial étant contrôlé à de multiples niveaux (génome nucléaire et mitochondrial, hormones, voies de signalisation), il est aujourd'hui difficile d'identifier la cause exacte du dysfonctionnement des mitochondries dans ces conditions. Plus particulièrement dans le cas du muscle strié squelettique le métabolisme mitochondrial est également dérégulé au cours du vieillissement et cela se caractérise par une diminution de l'expression de nombreux gènes codant des protéines mitochondriales, de la synthèse d'ATP et une augmentation de stress oxydatif (Su et al., 2015). Tous les mécanismes ne sont pas encore connus pour expliquer ces dysfonctionnements mitochondriaux mais la formation de stress et l'augmentation du nombre de mutations dans l'ADNmt semblent y jouer un rôle essentiel (Lin, Beal, 2006). Pour rajouter à la complexité du processus il est envisageable que les protéines composant la chaîne respiratoire puissent être diminuées suite à une déadénylation plus active de leurs ARNm par l'intermédiaire de Smaug, un cofacteur du complexe CCR4/NOT. Cette protéine est retrouvée dans des granules cytoplasmiques qui sont associés à des granules de stress. Ainsi une boucle de stress pourrait se mettre en place et entretenir la dérégulation, les conséquences étant visibles à des stades plus tardifs par un dysfonctionnement musculaire. Il sera donc intéressant de vérifier la longueur des queues poly(A) de ces ARNm et les granules cytoplasmiques de Smaug au cours du vieillissement ou dans d'autres pathologies. Les granules de Smaug sont impliquées dans la déadénylation et la répression de la transcription et sont en relation avec des structures appelées granules de stress (GS) et « processing body » (P bodies = PB) impliquées dans les mécanismes de dégradation de l'ARN et le contrôle de la traduction. La protéine Smaug est aussi retrouvée dans les GS et les PB. Les GS ne sont pas visibles en condition normale mais apparaissent au cours d'un stress cellulaire. Les PB augmentent en nombre et en taille au cours d'un stress cellulaire (Anderson, Kedersha, 2006). Ces structures servent en autre à réprimer la traduction pour permettre à la cellule de ne traduire que les protéines essentielles à sa survie. Des ARNm non traduits, mais aussi des facteurs de traduction y sont retrouvés. Ces mécanismes de dégradation des ARN en cas de stress cellulaire sont essentiels pour l'adaptation de la cellule à son environnement et elles ont été impliquées dans la pathogenèse de nombreuses maladies

neurodégénératives telle que l'ALS. Dans cette maladie, les GS interagissent avec les protéines de liaison à l'ARN FUS et TDP-43, dont des mutations dans ces protéines causent la pathologie (10). De façon intéressante, il a récemment été montré que PABPN1 interagit avec TDP-43 et participe à l'amélioration de la pathogenèse de l'ALS par l'élimination des agrégats pathologiques. Cette interaction conduit à une amélioration des défauts retrouvés dans la pathologie dans la formation des GS. Il est possible que les GS et les PB soient dérégulés dans l'OPMD : nous avons en effet montré que les granules de Smaug augmentent en nombre et en taille ainsi les GS et les PB, pourraient avoir une modification de leur structure participant à la pathogenèse de l'OPMD comme dans le cas de l'ALS.

RESEARCH ARTICLE

Mitochondrial Dysfunction Reveals the Role of mRNA Poly(A) Tail Regulation in Oculopharyngeal Muscular Dystrophy Pathogenesis

Aymeric Chartier^{1‡}, Pierre Klein^{2‡}, Stéphanie Pierson¹, Nicolas Barbezier¹, Teresa Gidaro², François Casas³, Steven Carberry⁴, Paul Dowling⁴, Laurie Maynadier¹, Maëlle Bellec¹, Martine Oloko², Claude Jardel⁵, Bodo Moritz⁶, George Dickson⁷, Vincent Mouly², Kay Ohlendieck⁴, Gillian Butler-Browne², Capucine Trollet^{2‡}, Martine Simonelig^{1‡*}

1 mRNA Regulation and Development, Institut de Génétique Humaine, CNRS UPR1142, Montpellier, France, **2** Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR76, INSERM UMRS974, CNRS FRE3617, Center for Research in Myology, Paris, France, **3** INRA, UMR 866 Différenciation cellulaire et croissance, Montpellier, France, **4** Department of Biology, National University of Ireland, Maynooth, Ireland, **5** Service de Biochimie Métabolique et Centre de Génétique moléculaire et chromosomique, INSERM U1016, Institut Cochin, CNRS UMR 8104, AP-HP, GHU Pitié-Salpêtrière, Paris, France, **6** Institute of Biochemistry and Biotechnology, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Halle, Germany, **7** School of Biological Sciences, Royal Holloway - University of London, Egham, Surrey, United Kingdom

‡ AC and PK contributed equally to this work. CT and MS also contributed equally to this work.

* Martine.Simonelig@igh.cnrs.fr



 OPEN ACCESS

Citation: Chartier A, Klein P, Pierson S, Barbezier N, Gidaro T, Casas F, et al. (2015) Mitochondrial Dysfunction Reveals the Role of mRNA Poly(A) Tail Regulation in Oculopharyngeal Muscular Dystrophy Pathogenesis. *PLoS Genet* 11(3): e1005092. doi:10.1371/journal.pgen.1005092

Editor: Bingwei Lu, Stanford University School of Medicine, UNITED STATES

Received: September 17, 2014

Accepted: February 23, 2015

Published: March 27, 2015

Copyright: © 2015 Chartier et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files except the microarray datasets, which can be found at GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) under the numbers GSE26604 and GSE64094.

Funding: This work was funded by: Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UPR1142, the Agence Nationale pour la Recherche Genopat (ANR-09-GENO-025-01 from GIS-Maladies Rares and Association Française contre les Myopathies (AFM)), the Fondation pour la Recherche Médicale ("Equipe FRM 2007 DEQ20071210560", "Equipe FRM 2013

Abstract

Oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD), a late-onset disorder characterized by progressive degeneration of specific muscles, results from the extension of a polyalanine tract in poly(A) binding protein nuclear 1 (PABPN1). While the roles of PABPN1 in nuclear polyadenylation and regulation of alternative poly(A) site choice are established, the molecular mechanisms behind OPMD remain undetermined. Here, we show, using *Drosophila* and mouse models, that OPMD pathogenesis depends on affected poly(A) tail lengths of specific mRNAs. We identify a set of mRNAs encoding mitochondrial proteins that are down-regulated starting at the earliest stages of OPMD progression. The down-regulation of these mRNAs correlates with their shortened poly(A) tails and partial rescue of their levels when deadenylation is genetically reduced improves muscle function. Genetic analysis of candidate genes encoding RNA binding proteins using the *Drosophila* OPMD model uncovers a potential role of a number of them. We focus on the deadenylation regulator Smaug and show that it is expressed in adult muscles and specifically binds to the down-regulated mRNAs. In addition, the first step of the cleavage and polyadenylation reaction, mRNA cleavage, is affected in muscles expressing alanine-expanded PABPN1. We propose that impaired cleavage during nuclear cleavage/polyadenylation is an early defect in OPMD. This defect followed by active deadenylation of specific mRNAs, involving Smaug and the CCR4-NOT deadenylation complex, leads to their destabilization and mitochondrial dysfunction. These results broaden our understanding of the role of mRNA regulation in

DEQ20130326534" and "Projets Innovants ING20101221078"), the European Commission (EC: PolyALA LSHM-CT-2005-018675), and the AFM-TELETHON (Research Programs 15123 and 17110) to MS; the University Paris VI Pierre et Marie Curie, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the CNRS, the Fondation de l'avenir (project ET1-622) and the AFM-TELETHON (Research Programs 15123 and 17110) to CT; and the Muscular Dystrophy Ireland, a Hume scholarship from the National University of Ireland, Maynooth, and a Ulysses travel grant from Enterprise Ireland to KO. NB held a salary from the EC (PolyALA LSHM-CT-2005-018675) and ANR-Maladies Rares, LM from the AFM (15123) and SP from the FRM (Projets Innovants). PK held a salary from the Ministère de l'Éducation Nationale de la Recherche et de la Technologie. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

pathologies and might help to understand the molecular mechanisms underlying neurodegenerative disorders that involve mitochondrial dysfunction.

Author Summary

Oculopharyngeal muscular dystrophy is a genetic disease characterized by progressive degeneration of specific muscles, leading to ptosis (eyelid drooping), dysphagia (swallowing difficulties) and proximal limb weakness. The disease results from mutations in a nuclear protein called poly(A) binding protein nuclear 1 that is involved in polyadenylation of messenger RNAs (mRNAs) and poly(A) site selection. To address the molecular mechanisms involved in the disease, we have used two animal models (*Drosophila* and mouse) that recapitulate the features of this disorder. We show that oculopharyngeal muscular dystrophy pathogenesis depends on defects in poly(A) tail length regulation of specific mRNAs. Because poly(A) tails play an essential role in mRNA stability, these defects result in accelerated decay of these mRNAs. The affected mRNAs encode mitochondrial proteins, and mitochondrial activity is impaired in diseased muscles. These findings have important implications for the development of potential therapies for oculopharyngeal muscular dystrophy, and might be relevant to decipher the molecular mechanisms underlying other disorders that involve mitochondrial dysfunction.

Introduction

Many neurodegenerative disorders are due to expansions of trinucleotide repeats in the associated genes. In many cases, the pathology is thought to involve protein misfolding and accumulation in insoluble aggregates [1]. However, more recent data have also implicated RNA toxicity and RNA granules in several neurodegenerative diseases [2,3]. RNA repeats can induce the formation of RNA aggregates and interact with RNA binding proteins, thus interfering with RNA metabolism.

Oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) is another triplet expansion disease which results from short expansions of a GCN repeat in the gene encoding poly(A) binding protein nuclear 1 (PABPN1) [4]. OPMD is an autosomal dominant muscular dystrophy, which has a late onset and is characterised by progressive weakness and degeneration of specific muscles [5,6]. Triplet expansion in *PABPN1* leads to extension of a polyalanine tract from 10 alanines in the normal protein to a maximum of 17 alanines at the N-terminus of the protein. Nuclear aggregates in muscle fibres are a pathological hallmark of OPMD [7]. These aggregates contain mutant insoluble PABPN1, ubiquitin, subunits of the proteasome, as well as poly(A) RNA [8]. Polyalanine expansions in *PABPN1* are thought to induce misfolding and formation of aggregates, which are targeted to the ubiquitin-proteasome degradation pathway [9,10]. However, it is still unknown whether these nuclear aggregates have a pathological function, a protective role, or are a consequence of a cellular defence mechanism.

Despite recent progress in OPMD pathophysiology showing important deregulation of the ubiquitin-proteasome system in the disease [9] and a role of apoptosis [11], the molecular mechanisms leading to muscle dysfunction remain undetermined.

PABPN1 plays a role in nuclear polyadenylation, an mRNA processing reaction leading to the formation of the poly(A) tail at the 3' end of mRNAs [12]. PABPN1 binds to nascent poly(A) tails during this reaction and acts in stimulating poly(A) polymerase (the enzyme that

synthesizes the poly(A) tail) and controlling poly(A) tail length [13–15]. Consistent with this function, *in vivo* data using mutants of *Pabp2*, the *PABPN1* homologue in *Drosophila* [16], and knock-down of PABPN1 in cultured mouse myoblasts [17] have shown shorter mRNA poly(A) tail lengths upon depletion of PABPN1. Other functions of PABPN1 have been described more recently in i) a nuclear surveillance mechanism leading to hyperadenylation and decay of RNAs retained in the nucleus [18], ii) polyadenylation and turnover of long non-coding RNAs [19], and iii) regulation of poly(A) site usage whereby PABPN1 prevents the utilization of proximal weak poly(A) sites [20]. Any of these functions might be relevant to OPMD, and indeed a general shift in the utilization of proximal poly(A) sites was described in a mouse model of OPMD and correlated with some upregulation of the shorter form of mRNAs generated following this shift [20,21]. However, whether and how this upregulation might underlie OPMD was not addressed.

Here we use a *Drosophila* model of OPMD to investigate the molecular defects leading to OPMD. This model is generated by the expression of alanine expanded mammalian PABPN1 (PABPN1-17ala) specifically in muscles; it reproduces the disease characteristics, namely progressive muscle weakness and degeneration resulting in wing position defects, and formation of nuclear aggregates containing mutant PABPN1 in affected muscles [22,23]. Using complementary transcriptomic and genetic approaches we show that an early defect during OPMD progression is the down-regulation of mRNAs encoding mitochondrial proteins, which depends on their active deadenylation and leads to mitochondrial dysfunction. We find that the cleavage step during the nuclear cleavage/polyadenylation reaction is affected in the *Drosophila* model of OPMD. However, this defect is general and the specific mRNA down-regulation depends on active deadenylation involving the CCR4-NOT deadenylation complex and Smaug (Smg), an RNA binding protein known to recruit the CCR4-NOT complex to specific mRNAs [24,25]. Reducing the dosage of genes involved in deadenylation partially rescues the levels of mRNAs encoding mitochondrial proteins leading to improvement of muscle function. Importantly, these early defects are conserved in a mouse model of OPMD and mitochondrial protein levels are also decreased in muscle biopsies from OPMD patients. Down-regulated mRNAs involved in mitochondrial function are enriched in Smg recognition elements (SREs) in both *Drosophila* and mouse. We propose a model in which the first molecular defect in OPMD concerns PABPN1 nuclear function in cleavage/polyadenylation. Some mRNAs are specifically sensitive to this defect because they are actively deadenylated by Smg and the CCR4-NOT deadenylation complex in the cytoplasm. A subset of these mRNAs encodes mitochondrial proteins and the molecular defect results in a deficit of mitochondrial activity, which in turn affects muscle function.

Results

Genes encoding mitochondrial proteins are down-regulated in *Drosophila* muscles expressing PABPN1-17ala

To gain insight into the molecular and physiological defects in OPMD we performed a transcriptomic analysis in *Drosophila* muscles expressing PABPN1-17ala. Using microarrays, thorax gene expression was compared between control flies (*Mhc-Gal4/+*) and flies expressing PABPN1-17ala in thoracic muscles (*UAS-PABPN1-17ala/+; Mhc-Gal4/+*), at three time points (days 2, 6 and 11) [26]. We used two-way ANOVA with genotype and time as the first and second variables, respectively, to identify deregulated genes. Up- and down-regulated genes were found at all time points after expression of PABPN1-17ala (Fig. 1A) [26]. We reported the identification of the ubiquitin-proteasome system as a prominent pathway deregulated in OPMD [9]. Importantly, this pathway was identified using the comparison of transcriptomic

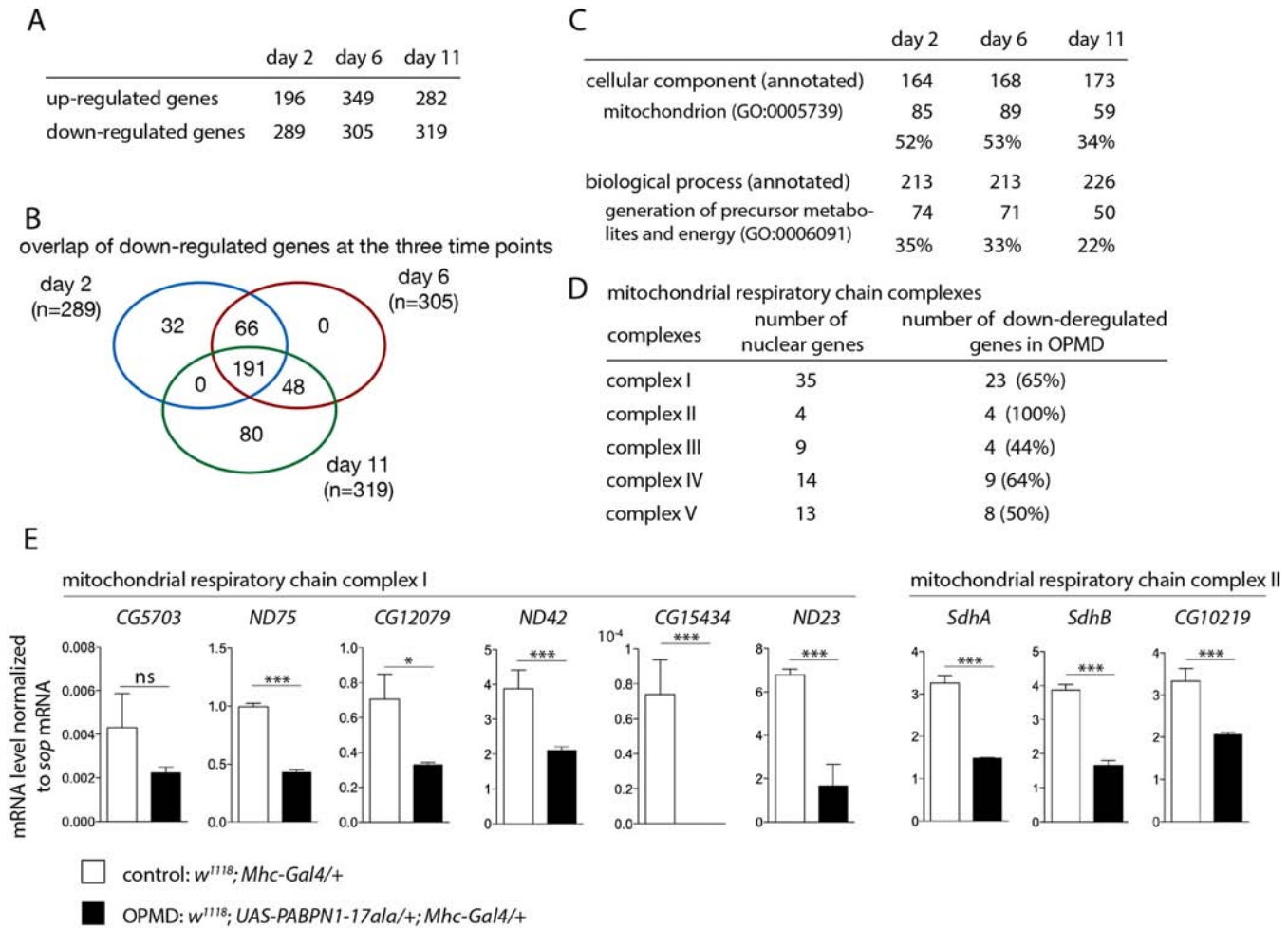


Fig 1. Deregulation of the mitochondrial pathway in the OPMD *Drosophila* model. A) Number of deregulated genes in the transcriptome of PABPN1-17ala-expressing muscles using microarrays. B) Venn's diagram of overlapping down-regulated genes at days 2, 6 and 11. C) GO term enrichment in down-regulated genes in PABPN1-17ala-expressing muscles. D) Number of nuclear genes encoding mitochondrial respiratory chain complex subunits down-regulated in PABPN1-17ala-expressing muscles. E) Quantification of levels of mRNAs encoding mitochondrial respiratory chain subunits of complexes I and II in control and PABPN1-17ala-expressing muscles at day 2, using RT-qPCR. mRNA levels were normalized to *sop* mRNA. Similar results were obtained when normalization was with *Cpr100A* mRNA which is expressed in thorax cuticle. Means are from three biological replicates, error bars represent standard deviation. * p -value < 0.05 , *** p -value < 0.001 , ns: not significant, using the Student's t-Test.

doi:10.1371/journal.pgen.1005092.g001

analyses from the *Drosophila* and mouse models of OPMD and from patient biopsies, demonstrating the relevance of the *Drosophila* and mouse models. In *Drosophila* muscles expressing PABPN1-17ala, genes involved in the ubiquitin-proteasome system were mostly up-regulated at day 6 [9]. Here we focused on deregulated genes at the earliest stage, with the aim of identifying early defects during OPMD progression. At day 2, the most prominent deregulated pathway corresponded to mitochondrial function (see below), and genes involved in this pathway were down-regulated. In total, 289 genes were found to be down-regulated at day 2, among which 191 genes were down-regulated at the three time points (Fig. 1B, S1 Table).

Gene ontology (GO) term enrichment was analysed using FlyMine (<http://www.flymine.org>) [27] with a p -value < 0.05 (Bonferroni corrected). Among annotated genes, the term "mitochondrion" in "cellular component" was identified with the strongest p -value ($1.34E-46$ at day 2, $1.85E-41$ at day 6 and $2.78E-19$ at day 11). Up to 53% of annotated genes were annotated with this term (Fig. 1C). In particular, a large proportion of nuclear genes involved in oxidative

phosphorylation (subunits of the respiratory chain complexes) were found to be down-regulated in *Drosophila* muscles expressing PABPN1-17ala (Fig. 1D).

We used RT-qPCR to validate gene down-regulation observed with microarrays. Nineteen genes were analysed, among which 16 (84% validation) were found to be significantly down-regulated in muscles expressing PABPN1-17ala (Fig. 1E, S1A, B Fig). In addition, five additional genes encoding subunits of the respiratory chain complexes (*Ucrh*, *RFeSP*, *Oscp*, *CG1746* and *ATPsyn-b*) were analysed using RT-qPCR and found to be down-regulated (S1A Fig), although they were not detected to be affected using microarrays, indicating the underestimation of the number of deregulated genes. Four other genes (*RpS6*, *RpL32*, *Vha16-1* and *CG1031*), which are not involved in mitochondrial function and were not deregulated in microarrays, served as negative controls and were found to be unaffected using RT-qPCR (S1C Fig).

In summary, the major pathway down-regulated in *Drosophila* muscles expressing PABPN1-17ala corresponded to nuclear genes encoding mitochondrial proteins. This down-regulation started at the earliest time point (day 2), before the onset of muscle degeneration [23], indicating that it is an early defect, that is maintained at later time points.

Defects in mitochondrial function play an important role in OPMD pathophysiology in the *Drosophila* model

Because down-regulation of mitochondrial components is prominent at the earliest time point, we checked whether mitochondrial biogenesis or mass were affected in muscles expressing PABPN1-17ala. Mitochondrial abundance was analysed by quantifying mitochondrial DNA using qPCR. Mitochondrial DNA levels normalized to nuclear DNA were unaffected in *Drosophila* muscles expressing PABPN1-17ala, suggesting that mitochondrial mass was similar to that in control muscles (Fig. 2A).

Mitochondria generate energy from nutrients through oxidative phosphorylation using the combined action of five enzyme complexes. We assessed the activity of four of these complexes in *Drosophila* muscles, as well as that of citrate synthase which correlates with mitochondrial mass [28]. The activity of citrate synthase was only slightly decreased (83%, 80% and 91% of the control muscle activity at day 2, 6 and 11, respectively), consistent with mitochondrial DNA levels being unaffected in muscles expressing PABPN1-17ala. In contrast, the activities of the four mitochondrial respiratory chain complexes (complex I: NADH dehydrogenase; complex II: succinate dehydrogenase; complex III: cytochrome bc₁; and complex IV: cytochrome c oxidase) were significantly decreased in muscles expressing PABPN1-17ala (Fig. 2B). These results indicate a mitochondrial dysfunction in the OPMD *Drosophila* model. As another assay to confirm this defect, we used the *GstD1-GFP* transgene as a marker of oxidative stress [29]. Mitochondrial dysfunction leads to oxidative stress [30] which in turn activates the expression of the detoxification enzyme *GstD1*. Expression of the *GstD1-GFP* transgene was specifically induced in muscles expressing PABPN1-17ala, starting at day 2 (S2 Fig).

Both the generation of oxidative stress and the defect in energy production resulting from decreased mitochondrial respiratory chain activity could participate in the dysfunction of muscles. To functionally address whether mitochondrial activity defects play a role in the dysfunction of muscles expressing PABPN1-17ala, we tested if OPMD phenotypes of defective wing posture could be rescued by increasing the expression of genes involved in mitochondrial function.

Mitochondrial biogenesis and activity are controlled by cellular pathways allowing crosstalk between mitochondria and the cell nucleus. The transcription factors nuclear respiratory factor-1 and -2 (NRF-1 and NRF-2) and oestrogen-related receptor- α (ERR α), as well as the co-activator PPAR γ coactivator 1 (PGC-1) are known to co-regulate a large number of genes involved in mitochondrial function, including those encoding subunits of the respiratory chain

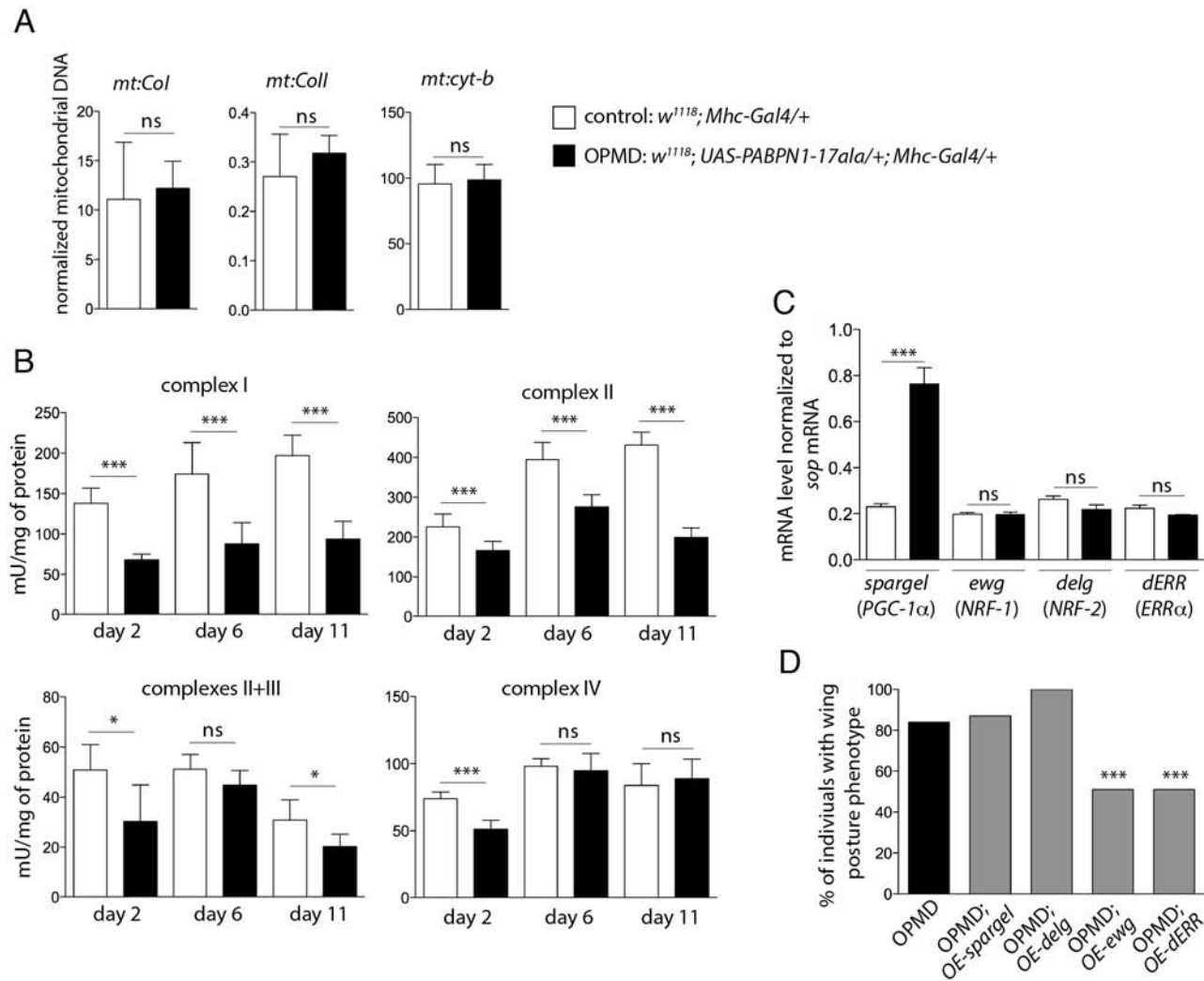


Fig 2. Reduced mitochondrial activity in muscles expressing PABPN1-17ala. A) Quantification of mitochondrial DNA (mtDNA) content in control and PABPN1-17ala-expressing thoraxes at day 2, using qPCR. Three mitochondrial genes (*mt:Col*, *mt:Coll* and *mt:cyt-b*) were analysed. Mitochondrial DNA levels were normalized to *RpL32* DNA. Means are from three biological replicates, error bars represent standard deviation. ns: not significant, using the Student's t-Test. B) Activities of mitochondrial respiratory chain complexes were analysed by spectrophotometry from control and PABPN1-17ala-expressing thoraxes (genotypes as in A). Means are from five biological replicates, error bars represent standard deviation. * p -value < 0.05 , *** p -value < 0.001 , ns: not significant, using the Student's t-Test. C) Quantification of mRNA levels of transcription factors regulating mitochondrial function in control and PABPN1-17ala-expressing thoraxes at day 2, using RT-qPCR (genotypes as in A). mRNA levels were normalized to *sop* mRNA. Means are from two biological replicates quantified three times, error bars represent standard deviation. *** p -value < 0.001 , ns: not significant, using the Student's t-Test. D) Overexpression of *ewg* and *dERR* genes reduces the wing posture phenotypes of flies expressing PABPN1-17ala. Wing posture phenotypes were scored at day 6, at 18°C from OPMD ($w^{1118}; UAS-PABPN1-17ala/+; Mhc-Gal4/+$), OPMD; OE-*spargel* ($w^{1118}; UAS-PABPN1-17ala/+; Mhc-Gal4/spargel^{EY05931}$), OPMD; OE-*delg* ($w^{1118}; UAS-PABPN1-17ala, UAS-delg-HA/+; Mhc-Gal4/+$), OPMD; OE-*ewg* ($w, ewg^{EY05137}/Y; UAS-PABPN1-17ala/+; Mhc-Gal4/+$) and OPMD; OE-*dERR* ($w^{1118}; UAS-PABPN1-17ala/+; Mhc-Gal4/dERR^{G4389}$) flies ($n > 130$). *** p -value < 0.001 , using the χ^2 test.

doi:10.1371/journal.pgen.1005092.g002

complexes [31–33]. *NRF-1*, *NRF-2* and *PGC-1* genes are conserved in *Drosophila* (*erect wing* (*ewg*), *delg* and *spargel*, respectively), as well as their function in the control of mitochondrial mass and activity [34–36]. A potential role of *Drosophila* ERR (*dERR*) in mitochondrial function has also been proposed during adult stages [37]. We first checked that the reduced respiratory chain complex activities did not result from decreased expression of these transcription activators in *Drosophila* muscles expressing PABPN1-17ala, using RT-qPCR. The levels of *ewg*, *delg* and *dERR* mRNAs were unaffected in these muscles and *spargel* expression was found to

be increased (Fig. 2C). While overexpression of *spargel* or *delg* in muscles was not able to rescue wing posture defects, overexpression of *ewg* or *dERR* significantly reduced these defects (Fig. 2D).

Together, these results show a deficit in mitochondrial respiratory chain activity in *Drosophila* muscles expressing PABPN1-17ala and strongly suggest that this deficit has a key role in muscle defects since overexpression of general regulators of mitochondrial biogenesis and function improved muscle function.

Role of mRNA poly(A) tail length regulation in the defects induced by PABPN1-17ala expression

We have shown previously that the RNA binding activity of PABPN1 plays a role in OPMD pathogenesis suggesting that the disease process involves mRNA metabolism [23]. To test this hypothesis, we performed a small screen using heterozygous mutants of genes encoding RNA binding proteins and proteins involved in poly(A) tail length regulation (polyadenylation and deadenylation). We generated a new transgene *Act88F-PABPN1-17ala* which allows constitutive expression of PABPN1-17ala in adult indirect flight muscles [38]. Expression of this transgene led to 40 to 50% of flies showing abnormal wing posture, thus allowing to screen for a decrease or an enhancement of this phenotype (Fig. 3A, B). The CCR4-NOT deadenylation complex is composed of eight subunits in *Drosophila*, including two deadenylases CCR4 and POP2, and is involved in shortening mRNA poly(A) tails [39–41]. Strikingly, we found that all available mutations in the complex subunits decreased the number of *Act88F-PABPN1-17ala/+* flies with wing position defects (Fig. 3A, B). In contrast, mutants of the *hiiragi* gene which encodes the nuclear poly(A) polymerase involved in polyadenylation [42,43] enhanced the wing position defects (Fig. 3B). Reduced dosage of *Pabp2* (*Drosophila* PABPN1) decreased the number of flies with abnormal wing posture, suggesting that part of these phenotypes resulted from a gain-of-function of PABPN1. Several suppressors encoded RNA binding proteins indicating their potential implication in OPMD (Fig. 3B). This is consistent with the important role of mRNA regulation in OPMD and suggests an involvement of multiple RNA-dependent pathways. Among suppressors, *pumilio* (*pum*) and *smg* encode translational repressors that directly interact with the CCR4-NOT deadenylation complex [24,25,44,45].

Deadenylation is the first step of mRNA destabilization, we therefore measured poly(A) tail lengths of a number of mRNAs that were down-regulated in PABPN1-17ala-expressing muscles, namely mRNAs encoding subunits of the mitochondrial respiratory chain complexes, using Poly(A) test assays (PAT assays). These mRNAs had shorter poly(A) tails in muscles expressing PABPN1-17ala starting at day 2 (Fig. 3C, S3 Fig). In contrast, poly(A) tail lengths of control mRNAs encoding myofibril-specific or ribosomal proteins (Actin 88F (Act88F), Troponin C at 41C (TpnC41C) and Sop) were unaffected in muscles expressing PABPN1-17ala, consistent with their unchanged levels in microarrays (Fig. 3D, S3 Fig).

These genetic data indicate that the regulation of mRNA poly(A) tail length plays an essential role in OPMD pathogenesis in the *Drosophila* model; specific mRNAs have shorter poly(A) tail lengths, which leads to their destabilization.

Affected nuclear cleavage/polyadenylation in the *Drosophila* model of OPMD

PABPN1 is mostly nuclear and involved in polyadenylation and in the prevention of weak proximal poly(A) site utilization in cases of several tandem poly(A) sites. This last function indicates a role of PABPN1 during the cleavage step of the cleavage/polyadenylation reaction at weak poly(A) sites, and we asked whether cleavage might be generally impaired in OPMD. We

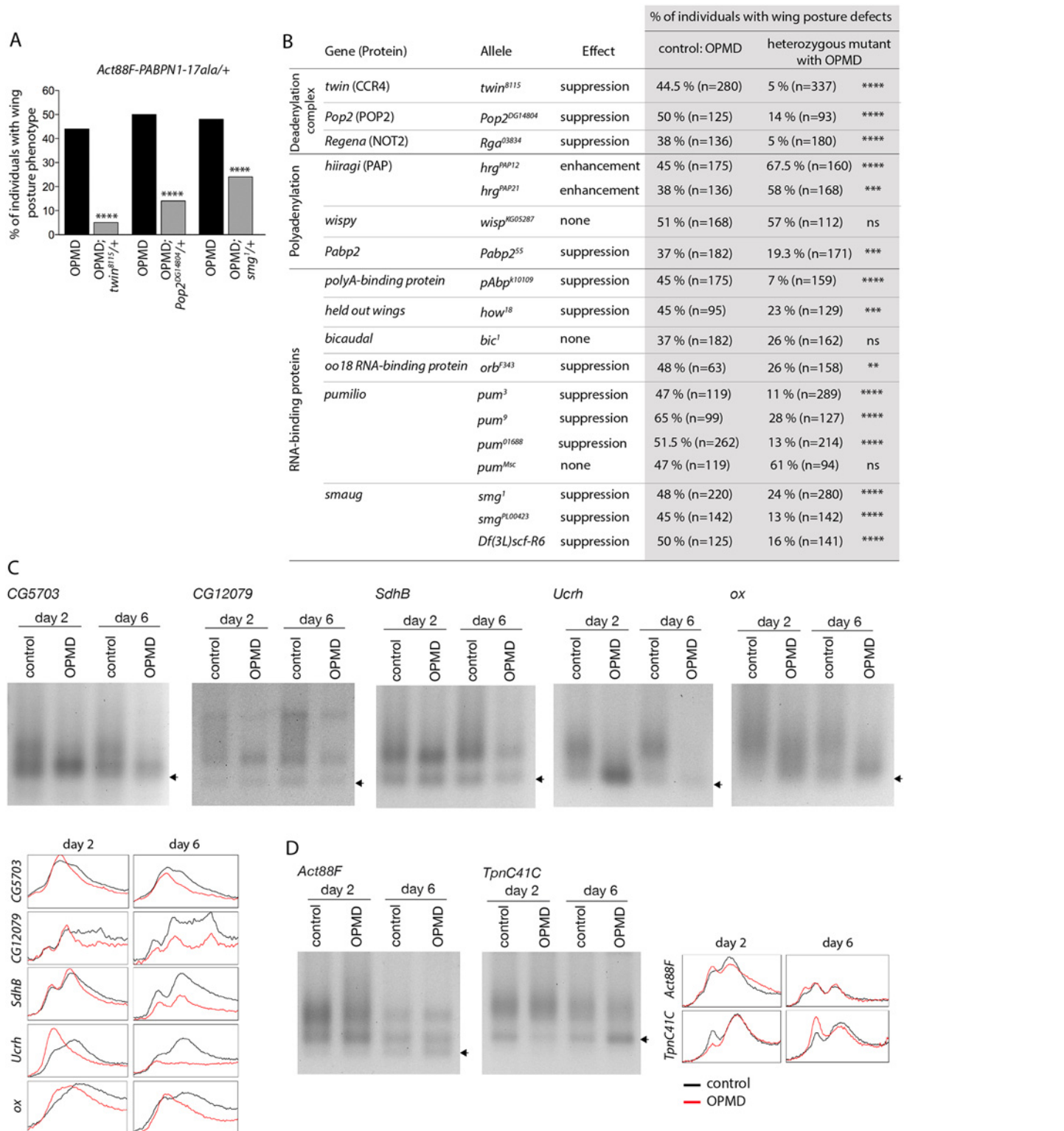


Fig 3. Poly(A) tail length regulation plays a major role in the OPMD *Drosophila* model. A) Genetic rescue of wing position phenotypes with genes involved in poly(A) tail regulation. Percentage of wing posture defects in the presence or absence of heterozygous mutants, scored at day 6. OPMD flies were *w*¹¹¹⁸; *Act88F-PABPN1-17ala/+* raised at 25°C. Note that OPMD phenotypes (affected wing posture) are not visible at day 2 with this transgene. **** *p*-value < 0.0001, using the χ^2 test. B) Genetic screen with heterozygous mutants. Wing posture defects were scored at day 6. OPMD flies were *w*¹¹¹⁸; *Act88F-PABPN1-17ala/+* raised at 25°C. *wispy* encodes a cytoplasmic poly(A) polymerase expressed in the female germline [42]. **** *p*-value < 0.0001,

*** p -value <0.001, ** p -value <0.01, ns: not significant, using the χ^2 test. C-D) PAT assays in control ($w^{1118}; Mhc-Gal4/+$) and OPMD ($w^{1118}; UAS-PABPN1-17ala/+; Mhc-Gal4/+$) adult thoraxes from flies raised at 18°C, at days 2 and 6. C) mRNAs encoding subunits of mitochondrial respiratory chain complexes. D) mRNAs encoding muscle sarcomeric proteins. Arrows indicate poly(A) tails of 12A. Profiles of PAT assays using the ImageJ software are shown.

doi:10.1371/journal.pgen.1005092.g003

analysed pre-mRNA cleavage at poly(A) sites by quantifying the levels of uncleaved pre-mRNA using RT-qPCR (Fig. 4A). We found that the cleavage at poly(A) sites was less efficient in muscles expressing PABPN1-17ala than in control muscles (Fig. 4B). This defect was not restricted to genes that were down-regulated in muscles expressing PABPN1-17ala (i.e. genes encoding mitochondrial proteins) but also occurred in genes encoding either ribosomal (RpS6, RpL32) or muscle specific (Myosin heavy chain (Mhc), Act88F) proteins, that were not down-regulated.

A general defect in pre-mRNA cleavage during the cleavage/polyadenylation reaction had not been associated previously with *PABPN1* loss-of-function, we therefore tested whether this step of the reaction was affected in *Pabp2* mutants. The null allele *Pabp2⁵⁵* is lethal at first instar larval stage [16], we used first instar *Pabp2⁵⁵/Df(2R)CA53* larvae before they died to quantify the levels of uncleaved pre-mRNA by RT-qPCR. Similarly to what was found in muscles expressing PABPN1-17ala, we observed a decreased efficiency in the cleavage of several pre-mRNAs (Fig. 4C), suggesting that PABP2 plays a general role in the cleavage step of the cleavage/polyadenylation reaction.

These results reveal that in the OPMD *Drosophila* model, the first defect is nuclear and corresponds to a decreased efficiency of cleavage at poly(A) sites. This defect does not systematically lead to reduced steady-state levels of mature mRNAs.

Smg regulates mRNAs down-regulated in muscles expressing PABPN1-17ala

The cleavage defect in PABPN1-17ala-expressing muscles appears to be general, yet the poly(A) tail shortening and destabilization occur on specific mRNAs. This indicates that the specificity of mRNA destabilization would not depend on the first defect in pre-mRNA cleavage, but on a downstream process. This process might correspond to deadenylation which can be activated on specific mRNAs through the recruitment of the CCR4-NOT deadenylation complex to these mRNAs by specific RNA binding proteins. In this model, OPMD would result from an altered function of PABPN1 leading to a reduced efficiency of nuclear cleavage/polyadenylation, then followed by normal active deadenylation of specific mRNAs. The reduced efficiency in nuclear cleavage would only affect the steady-state levels of mRNAs that are actively deadenylated. To test this model, we analysed the potential rescue of the levels of mRNAs that were decreased in *Drosophila* muscles expressing PABPN1-17ala, by *twin* heterozygous mutation (*twin* encodes the CCR4 deadenylase). Among the 20 mRNAs that we analysed using RT-qPCR, 18 showed higher expression levels in muscles expressing PABPN1-17ala in the presence of the *twin* mutant (Fig. 5A, S4A, B Fig).

The CCR4-NOT deadenylation complex itself has no specificity for particular mRNAs. The specificity instead depends on RNA binding proteins which interact with pools of mRNAs and recruit the deadenylation complex through direct protein interactions. Smg and Pum that were identified as suppressors of wing posture defects (Fig. 3B) are such RNA binding proteins. We tested the rescue of mRNA levels by RT-qPCR in muscles expressing PABPN1-17ala, in the presence of *pum* or *smg* heterozygous mutations. No rescue was observed with the *pum* mutant (*Act88F-PABPN1-17ala/pum³*) (n = 19 mRNAs), suggesting that the phenotypic rescue of wing posture with this mutant did not involve the stabilization of these mRNAs, and might

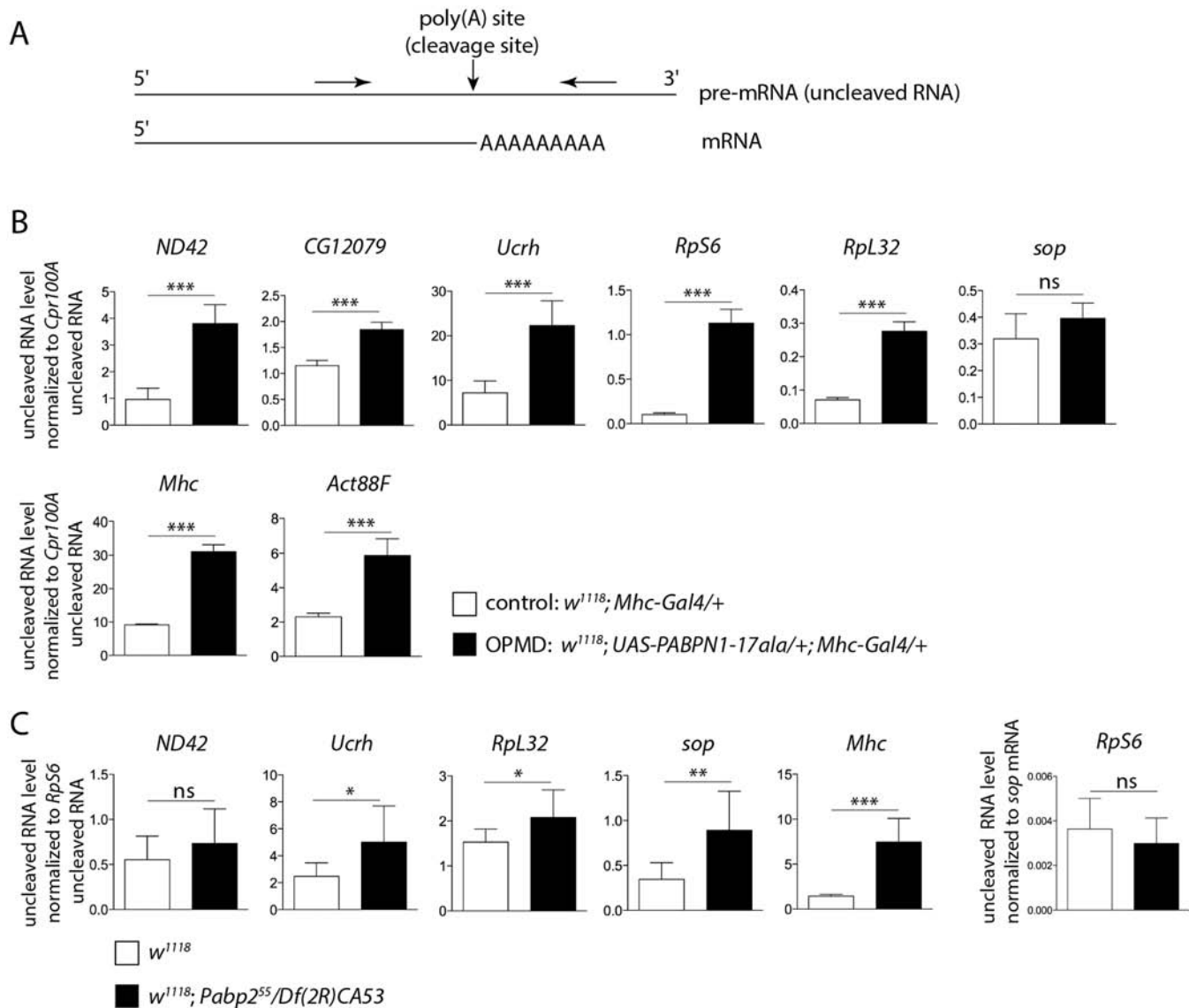


Fig 4. Defective cleavage at poly(A) sites in muscles expressing PABPN1-17ala and in the *Pabp2* mutant. A) Schematic representation of primers (arrows) used to quantify uncleaved pre-mRNA. B) Quantification of uncleaved pre-mRNAs in control and PABPN1-17ala-expressing thoraxes at day 2, using RT-qPCR. Uncleaved RNAs were normalized to *Cpr100A* uncleaved RNA. *Cpr100A* is expressed in the cuticle and its expression remains unaffected by expression of PABPN1-17ala in muscles. Means of three biological replicates quantified three times. For (B) and (C), error bars represent standard deviation. * *p*-value <0.05, ** *p*-value <0.01, *** *p*-value <0.001, ns: not significant, using the Student's t-Test. C) Quantification of uncleaved pre-mRNAs in control (*w¹¹¹⁸*) and *Pabp2* (*Pabp2⁵⁵/Df(2R)CA53*) mutant first instar larvae, using RT-qPCR. Uncleaved RNAs were normalized to *RpS6* uncleaved RNA. The levels of *RpS6* uncleaved RNA normalized to *sop* mRNA were unaffected in *Pabp2* mutant larvae (right panel). Means of three biological replicates quantified three times.

doi:10.1371/journal.pgen.1005092.g004

potentially involve their localization or translational regulation. Indeed, Puf3p, a yeast Pum homologue specifically binds to mRNAs encoding mitochondrial proteins and regulate their deadenylation or localization to mitochondria, coupled to translation [46–48].

In contrast, the levels of 14 mRNAs out of 20 analysed were increased in the presence of the heterozygous *smg¹* mutation (Fig. 5A, S4A, B Fig). This suggests that Smg plays a role in the specific deadenylation and destabilization of mRNAs encoding mitochondrial proteins. We

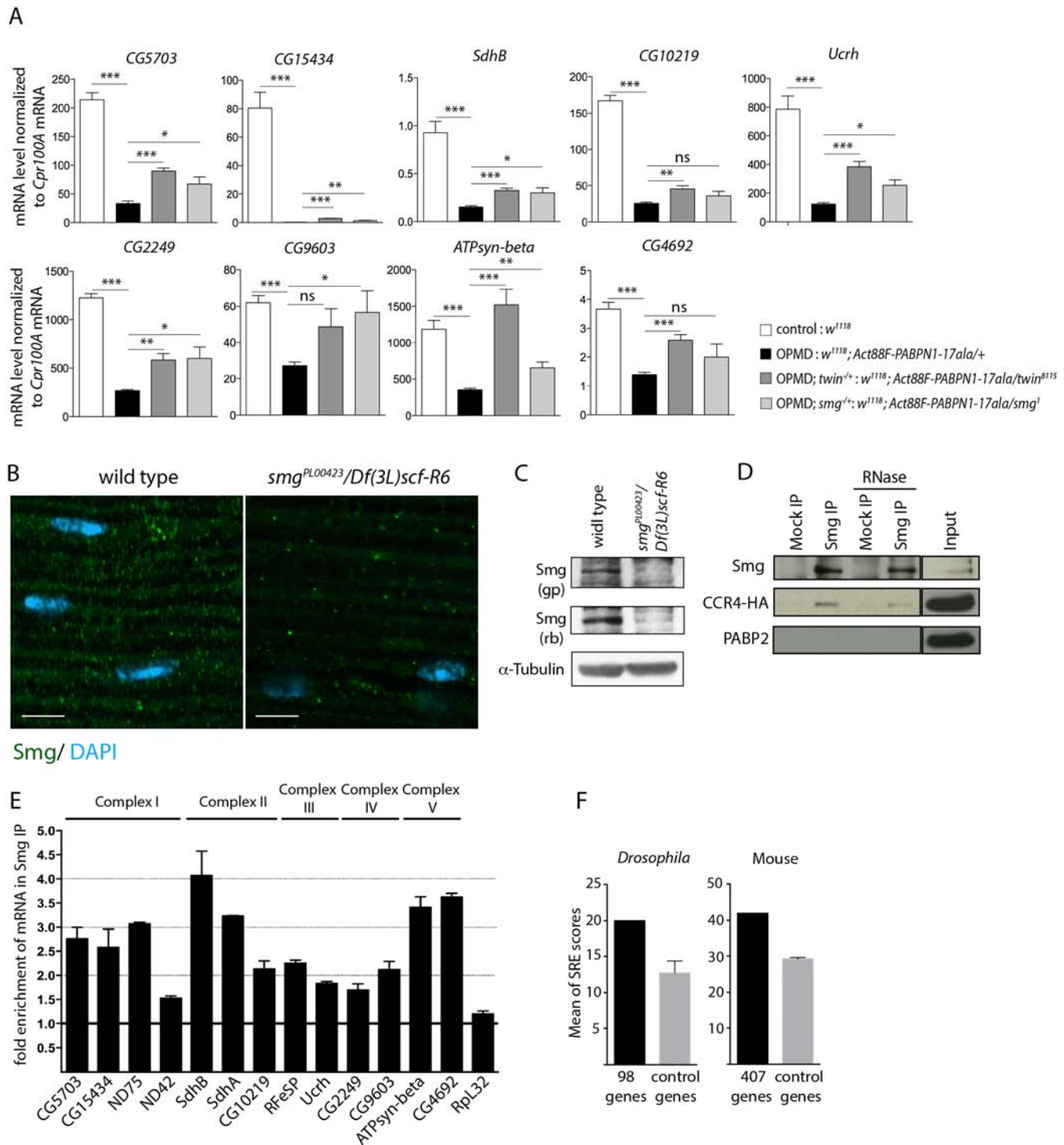


Fig 5. Smg binds to mRNAs encoding mitochondrial proteins and is involved in mRNA down-regulation due to PABPN1-17ala expression. A) Quantification of mRNA levels in control and PABPN1-17ala-expressing thoraxes in the presence or absence of heterozygous *twi* or *smg* mutations at day 6, using RT-qPCR. mRNA levels were normalized to *Cpr100A* mRNA. Means of two biological replicates quantified three times. Error bars represent standard deviation. * *p*-value < 0.05, ** *p*-value < 0.01, *** *p*-value < 0.001, ns: not significant, using the Student's t-Test. B) Confocal images of immunostaining of indirect flight muscles from wild type and *smg^{PL00423}/Df(3L)scf-R6* adult flies with anti-Smg (green). DNA was visualized with DAPI (blue). Smg protein levels were strongly reduced in *smg^{PL00423}/Df(3L)scf-R6* muscles compared to wild-type muscles. Scale bars: 5 μ m. C) Western blots of protein extracts from wild-type and *smg* mutant thoraxes revealed with guinea pig (gp) and rabbit (rb) anti-Smg, showing the presence of Smg and its lower level in *smg* mutant. α -Tubulin was used as a loading control. D) Smg immunoprecipitations (IP) in *UASp-CCR4-HA/Mhc-Gal4* adult thoraxes, either in

the presence or the absence of RNase A. Mock IP was with rabbit IgG. Input is the protein extract prior to immunoprecipitation. Western blots revealed with anti-Smg, anti-HA and anti-PABP2, showing CCR4-HA co-precipitation and the lack of PABP2 co-precipitation. E) Quantification of mRNA enrichment in Smg IP using RT-qPCR. The ratio of mRNA/control mRNA was set to 1 in the mock IP (black line). Normalization was with *sop* mRNA. *Rpl32* mRNA is a negative control, which is not enriched in Smg IP. Means are from two independent IP quantified three times. Error bars represent standard error to the mean. F) Means of SRE scores of mRNAs down-regulated in PABPN1-17ala-expressing muscles and annotated with the term "mitochondrion" compared to those of control mRNAs, in *Drosophila* (left panel) and mouse (right panel). Twenty times 98 *Drosophila* and 10 times 407 mouse control genes were used. Error bars represent standard deviation.

doi:10.1371/journal.pgen.1005092.g005

checked that the phenotypic rescue with *twin* and *smg* mutants did not involve the reduction of PABPN1-17ala levels (S4C, D Fig).

We analysed Smg expression in adult muscles. Smg is expressed in early embryos where it is cytoplasmic and accumulates in discrete foci that have been linked to deadenylation and/or translational repression [25,49], and it was recently shown to be present in larval muscles [50]. Using immunostaining and western blots, we validated the presence of Smg in cytoplasmic foci in adult thoracic muscles (Fig. 5B, C). The specificity of the antibody was verified using a *smg* mutant background. In addition, Smg was able to co-precipitate the CCR4 deadenylase in adult muscles (Fig. 5D). The co-precipitation was maintained in the presence of RNase A, indicating that Smg and CCR4 could form a complex independently of RNA. In contrast, PABP2 which accumulates in the nucleus was not co-precipitated with Smg (Fig. 5D).

We then performed Smg immunoprecipitation experiments in muscles and quantified mRNA enrichment using RT-qPCR, to address whether Smg could be in complex with mRNAs down-regulated in muscles expressing PABPN1-17ala. A number of these mRNAs encoding mitochondrial proteins were found to be enriched in Smg immunoprecipitations (Fig. 5E, S4E Fig). Smg binds to stem-loop structures, the SREs in which the consensus motif in the loop is CNGGN₀₋₄ [51]. We analyzed potential SRE enrichment in genes down-regulated in muscles expressing PABPN1-17ala that were annotated with the term "mitochondrion" (98 genes, S2 Table), by calculating SRE scores in their mRNAs [51]. SRE sequences were enriched in these mRNAs compared to in control mRNAs (Fig. 5F).

These results suggest a direct association of mRNAs encoding mitochondrial proteins with Smg, leading to their CCR4-mediated deadenylation and destabilization.

Rescue of PABPN1-17ala-induced phenotypes by reducing deadenylation does not involve decreased PABPN1 aggregation

The formation of nuclear PABPN1 aggregates is a hallmark of OPMD, although the presence of nuclear aggregates and muscle defects can be uncoupled in animal models [23,52]. Hitherto, components that were identified as decreasing muscle degeneration in the *Drosophila* model also reduced PABPN1 aggregation, since these components either directly interacted with PABPN1 (anti-PABPN1 intrabody), or with protein aggregation [22,26]. We asked whether the rescue of PABPN1-17ala-induced phenotypes by affecting poly(A) tail length regulation might interfere with PABPN1 aggregate formation. Nuclear aggregates have been monitored previously in *UAS-PABPN1-17ala/+; Mhc-Gal4/+ Drosophila* muscles [22,23], we therefore checked that a *twin* heterozygous mutant decreased the wing posture defects in such flies (Fig. 6A). PABPN1 nuclear aggregates were then quantified and their surface was measured in thoracic muscles of flies expressing PABPN1-17ala, in the presence or absence of *twin* heterozygous mutation. Strikingly, although the surface of the aggregates was not significantly different in both conditions, the number of nuclei containing an aggregate increased in the presence of *twin* heterozygous mutant (Fig. 6B, C). Therefore, in contrast to previously described conditions of rescued muscle function in PABPN1-17ala-expressing muscles, here improvement of muscle function did not correlate with reduced PABPN1 aggregation.

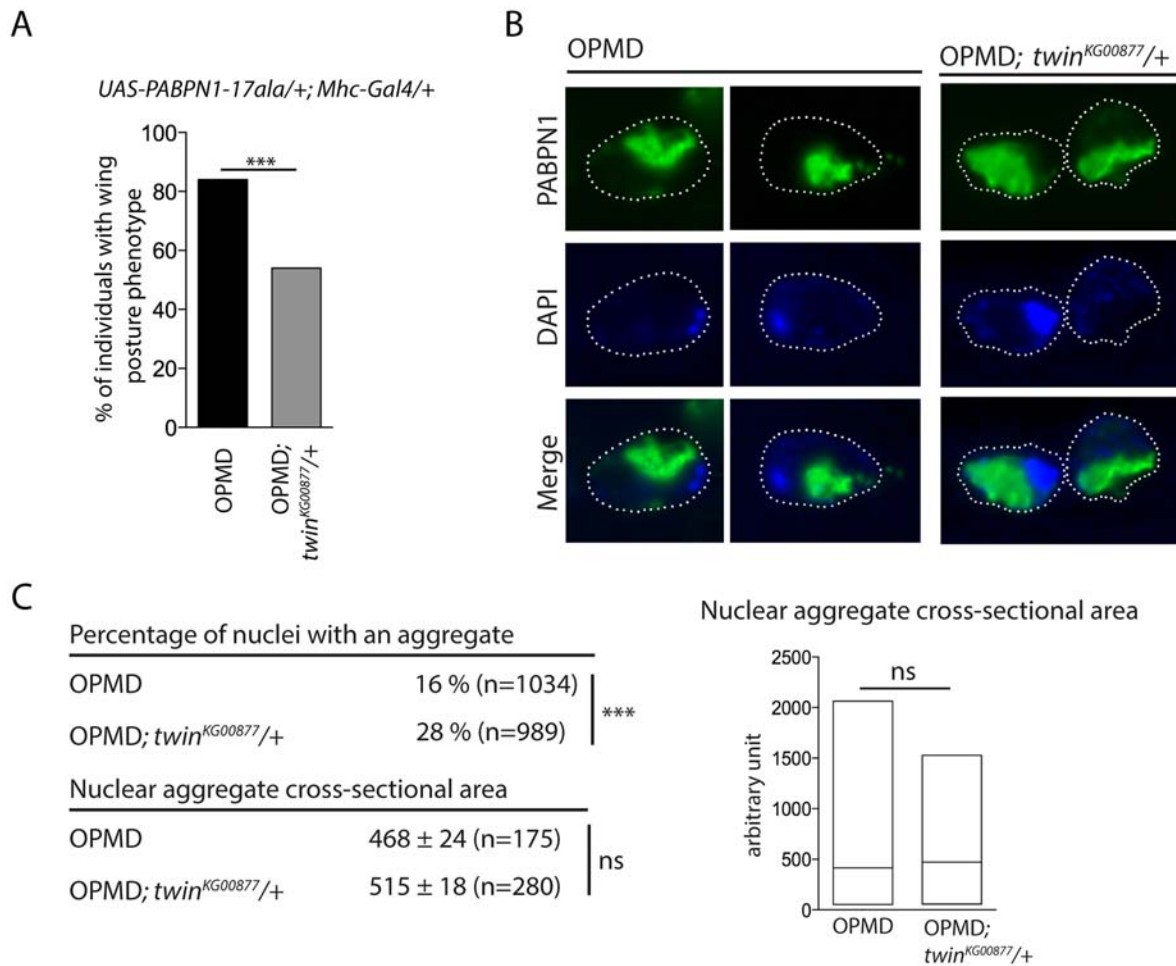


Fig 6. Nuclear PABPN1 aggregates in the OPMD *Drosophila* model. A) Genetic rescue of wing position phenotypes with *twin*^{KG00877} heterozygous mutant. Percentage of wing posture defects in the presence or absence of *twin*^{KG00877}/+, scored at day 6. OPMD flies were *w*¹¹¹⁸; *UAS-PABPN1-17ala/+*; *Mhc-Gal4/+* raised at 18°C. *** *p*-value < 0.0001, using the χ^2 test. B) Immunostaining of indirect flight muscles from OPMD (*w*¹¹¹⁸; *UAS-PABPN1-17ala/+*; *Mhc-Gal4/+*) and OPMD; *twin*^{KG00877}/+ (*w*¹¹¹⁸; *UAS-PABPN1-17ala/+*; *Mhc-Gal4/twin*^{KG00877}) adult flies at day 6 with anti-PABPN1 (green), showing nuclear aggregates. DNA was visualized with DAPI (blue). Nuclei are outlined with a dotted line. C) Quantification of PABPN1 nuclear aggregates. (Top) Percentages of nuclei with a nuclear PABPN1 aggregate in OPMD and OPMD; *twin*^{KG00877}/+ indirect flight muscles (genotypes as in B) *** *p*-value < 0.0001, using the χ^2 test. (Bottom) Quantification of nuclear aggregate areas. Each nuclear aggregate was delimited in a focal plan and the surface was calculated using ImageJ. Mean values of the areas with standard errors of the mean are indicated in arbitrary units. Distribution of cross-sectional areas is shown as box plots (right), the median is indicated as an horizontal line within the box. ns: not significant, using the Student's *t*-Test. Thoracic muscles were stained with anti-PABPN1 and DAPI and nuclear aggregates were visualized and scored using both staining. Quantification was from three independent experiments.

doi:10.1371/journal.pgen.1005092.g006

These results are consistent with other data reporting the dissociation between the presence of PABPN1 nuclear aggregates and muscle defects, and suggest that PABPN1 aggregates are not always causative of muscle defects.

Early down-regulation of mRNAs encoding mitochondrial proteins is conserved in the OPMD mouse model

To extend our study to a mammalian model, quadriceps gene expression using microarrays was compared between control mouse (FvB) and A17.1 mouse which expresses PABPN1-17ala in skeletal muscle [53], at three time points (T1, 6 weeks; T2, 18 weeks; and T3, 26 weeks) [54]. Up- and down-regulated genes were found at all time points (Fig. 7A), with the ubiquitin-

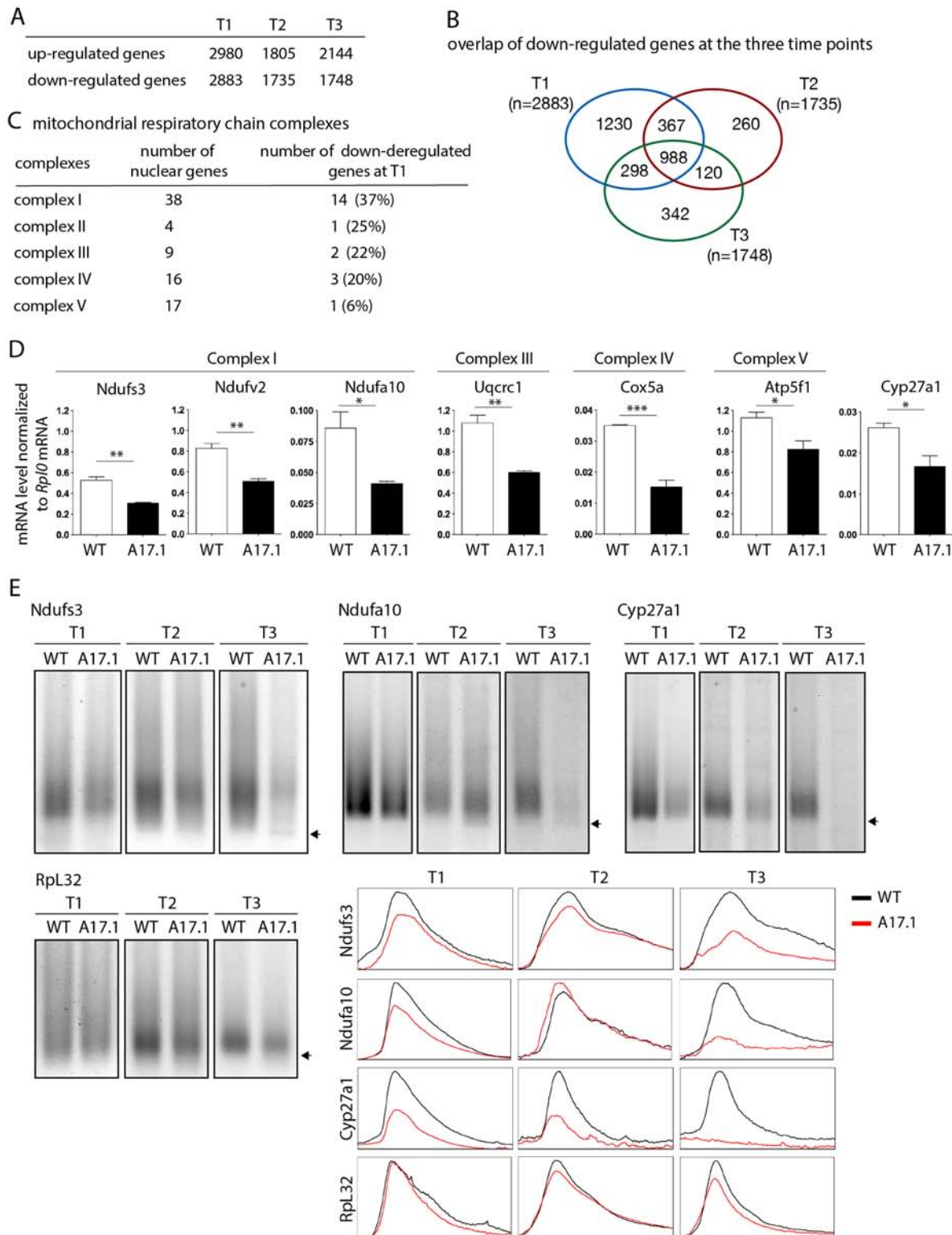


Fig 7. Deregulation of the mitochondrial pathway in the OPMD mouse model. A) Number of deregulated genes in A17.1 mouse skeletal muscles using microarrays. T1, 6 weeks; T2, 18 weeks; T3, 26 weeks. B) Venn diagram of overlapping down-regulated genes at T1, T2 and T3. C) Number of nuclear genes encoding mitochondrial respiratory chain complex subunits down-regulated in A17.1 mouse muscles. D) Quantification of levels of mRNAs encoding mitochondrial respiratory chain subunits in control (WT) and A17.1 quadriceps skeletal muscle at T1, using RT-qPCR. Normalization was with *Rplp0* mRNA. Means are from three biological replicates, error bars represent standard deviation. * p -value < 0.05 , ** p -value < 0.01 , *** p -value < 0.001 , using the

Student's t-Test. E) ePAT assays of mRNAs encoding mitochondrial proteins in control (WT) and A17.1 quadriceps skeletal muscles. Arrows indicate poly(A) tails of 12A. Accumulation of 12A poly(A) tails was visible in A17.1 muscles at T2 and/or T3. *Rpl32* is a negative control mRNA encoding a ribosomal protein. Profiles of ePAT assays using the ImageJ software are shown.

doi:10.1371/journal.pgen.1005092.g007

proteasome system being highly deregulated [9]. Annotation clustering enrichment analysis using DAVID [55] revealed that down-regulated genes common to all three time points were mostly enriched in genes encoding mitochondrial proteins (GO:0005739 "mitochondrion", Fold enrichment 14.8, p -value 5.88E-23), and we identified several nuclear genes involved in oxidative phosphorylation that were down-regulated, starting at the earliest time point (Fig. 7B, C, S3 Table). RT-qPCR confirmed the down-regulation observed with microarrays at T1 (Fig. 7D). These data obtained on pre-symptomatic muscles, for which no muscle weakness was evidenced [53], further confirmed the down-regulation of mRNAs encoding mitochondrial proteins as an early defect in OPMD. Using ePAT (extension PAT) assays, we found that the down-regulation of these mRNAs correlated with the accumulation of shorter poly(A) tails (Fig. 7E).

SREs are conserved from yeast to mammals [56,57]. We searched for the presence of potential SREs in the genes down-regulated at T1 that were annotated with the term "mitochondrion" (407 genes, S4 Table) [51]. SRE scores were higher in these down-regulated mRNAs than in control mRNAs (Fig. 5F) indicating an enrichment of SREs in mRNAs down-regulated in muscles from the A17.1 mouse.

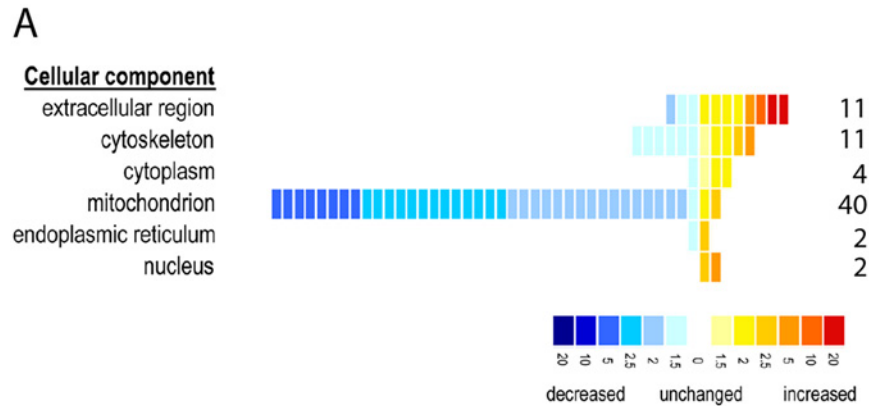
In order to validate the role of SREs in the regulation of mRNAs that were down-regulated in PABPN1-17ala expressing muscles, we selected *Ndufa10* mRNA which contains a potential SRE in its 3'UTR (S5A Fig). We took advantage of the HEK293T human cell line which we found expressing SAMD4A, the human homologue of *Smg*, using RT-PCR, western blot and immunostaining (S5B, C Fig). Reporter constructs containing *Ndufa10* 3'UTR either with the potential SRE or with a mutant form of this element were used for transfection, and mRNA levels produced from these constructs were quantified using RT-qPCR. Mutation of the SRE resulted in higher levels of mRNA (S5A Fig), consistent with the role of the SRE in mRNA destabilization.

We conclude that the down-regulation of mRNAs encoding mitochondrial proteins in pre-symptomatic muscles expressing PABPN1-17ala is conserved in mouse. This down-regulation correlates with accumulation of shorter poly(A) tail lengths of these mRNAs and with their enrichment in SREs.

Mitochondrial protein levels are decreased in OPMD patient muscles

To further validate a defect in mitochondrial components in OPMD patients, we used a proteomic approach on control and OPMD patient sternocleidomastoid muscle biopsies. This muscle, which is clinically unaffected [58] was used as a surrogate for pre-symptomatic samples. Strikingly, among the 70 proteins that were found significantly deregulated, 49 were down-regulated and 78% of them were mitochondrial proteins ($n = 38$) (Fig. 8A, B, S5 Table). Moreover, 53% ($n = 20$) and 39% ($n = 15$) of these proteins were orthologous to mitochondrial proteins encoded by down-regulated mRNAs in the *Drosophila* and mouse models, respectively. We verified by RT-qPCR that the corresponding mRNAs were down-regulated in OPMD patient biopsies (Fig. 8C), whereas the amount of mitochondrial DNA remained unchanged (Fig. 8D).

These results confirm the molecular data obtained in both animal models, showing the down-regulation of mRNAs encoding mitochondrial proteins as an early defect in OPMD. They further show the down-regulation of mitochondrial proteins and are consistent with mitochondrial dysfunction playing an important role in early stages of OPMD progression.



B mitochondrial respiratory chain complexes

complexes	number of nuclear genes	number of down-deregulated proteins in OPMD
complex I	38	14 (37%)
complex II	4	0 (0%)
complex III	9	1 (11%)
complex IV	16	1 (6%)
complex V	17	9 (52%)

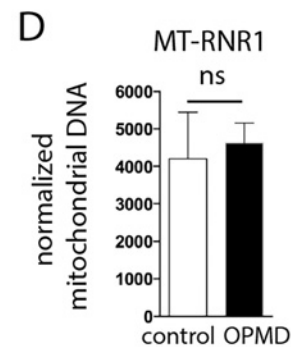
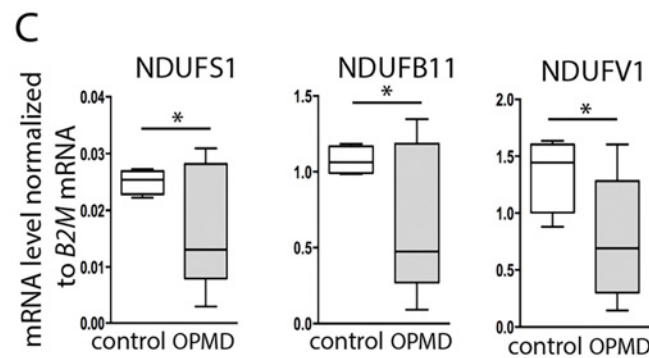


Fig 8. Decrease of mitochondrial protein levels in human OPMD muscle biopsies. A) Distribution of differentially expressed proteins from OPMD and control human muscle samples, following a quantitative label-free LC-MS profiling proteomic analysis. Proteins are sorted according to their GO terms in "cellular component" using DAVID. Each square represents a protein. The value of the fold change is color-coded. Yellow to red, over-expressed in OPMD samples (maximum 20-fold); blue, under-expressed in OPMD

samples (minimum -20-fold). B) Number of subunits of the mitochondrial respiratory chain complexes down-regulated in OPMD patient muscle biopsies. C) Quantification of levels of mRNAs encoding mitochondrial respiratory chain subunits in control and OPMD patient muscle biopsies, using RT-qPCR. Normalization was with B2M (Beta-2 microglobulin) mRNA. Box plots are from 4–7 muscle biopsies, the median is indicated as an horizontal line within the box. * p -value <0.05 using the Student's t-Test. For ATP5B and ATP5F1, the median is lower in OPMD than in control biopsies, although the difference is not recorded as significant. D) Quantification of mitochondrial DNA on muscle biopsies, using qPCR. The MT-RNR1 mitochondrial gene was quantified. Normalization was with B2M nuclear DNA. Means are from four biological replicates, error bars represent standard deviation. ns: not significant, using the Student's t-Test.

doi:10.1371/journal.pgen.1005092.g008

Discussion

The molecular defects underlying OPMD pathology remain largely undetermined, although recent advances have implicated apoptosis [11] and a general deregulation of the ubiquitin-proteasome system [9]. However, these are downstream events in the pathogenesis. Here, we further investigate the molecular mechanisms involved by analysing early defects in the disease. We show that specific mRNAs encoding proteins involved in mitochondrial activity are present at lower levels in pre-symptomatic OPMD muscles; this reduced expression results from the shortening of their poly(A) tails which leads to their destabilization. Poly(A) tail length regulation plays a key role in OPMD since muscle function is improved when deadenylation is decreased using mutants. We further show that nuclear cleavage/polyadenylation of pre-mRNAs is inefficient in PABPN1-17ala-expressing muscles (Fig. 9). This defect occurs both on genes which are and on those which are not down-regulated, indicating that it does not *per se* systematically lead to reduced steady-state mRNA levels. The decreased levels of specific mRNAs result from their active deadenylation, itself dependent, at least in part, on the specific interaction of these mRNAs with the Smg RNA binding protein and the recruitment by Smg of the CCR4-NOT deadenylation complex (Fig. 9). In addition, our genetic data revealing the potential involvement of other RNA binding proteins suggest that OPMD pathogenesis is complex and probably involves additional mechanisms of RNA regulation.

The function of PABPN1 during cleavage/polyadenylation has been documented. Nuclear polyadenylation occurs in two steps: first, cleavage of the pre-mRNA at the poly(A) site, which is co-transcriptional, and second, polyadenylation which potentially occurs after dissociation of the RNA from the RNA polymerase II. PABPN1 was shown to be involved in the second step, polyadenylation, for the control of poly(A) tail lengths [14,15]. More recent data have also implicated PABPN1 in the cleavage step for the regulation of weak poly(A) sites [20]. Here we show impaired cleavage at poly(A) sites in the *Pabp2* loss-of-function mutant, revealing a more general role of PABP2/PABPN1 in this step of the reaction. In the regulation of weak poly(A) sites, PABPN1 binds to non-canonical polyadenylation signals and prevents the binding of CPSF (Cleavage and polyadenylation specificity factor) required for cleavage [20]. A general function of PABPN1 in cleavage would require other interactions, for example with proteins required for cleavage, such as the poly(A) polymerase known to associate with PABPN1 [14]. Although a global shift to proximal poly(A) sites has been reported in the mouse model of OPMD [20,21], the down-regulation and poly(A) tail shortening of specific mRNAs that we functionally show to participate in OPMD pathogenesis are independent of alternative poly(A) site utilization.

The molecular defects observed in PABPN1-17ala-expressing muscles, reduction of mRNA poly(A) tail length and decreased efficiency of cleavage at poly(A) sites are similar to those observed in *Pabp2* loss-of-function mutants ([16], this study). This suggests that part of the defects in OPMD could result from partial *PABPN1* loss-of-function. However, the genetic suppression of wing posture phenotypes by reducing the dosage of *Pabp2* does not favour a simple loss-of-function model. It has been proposed for polyglutamine diseases that the pathogenesis could

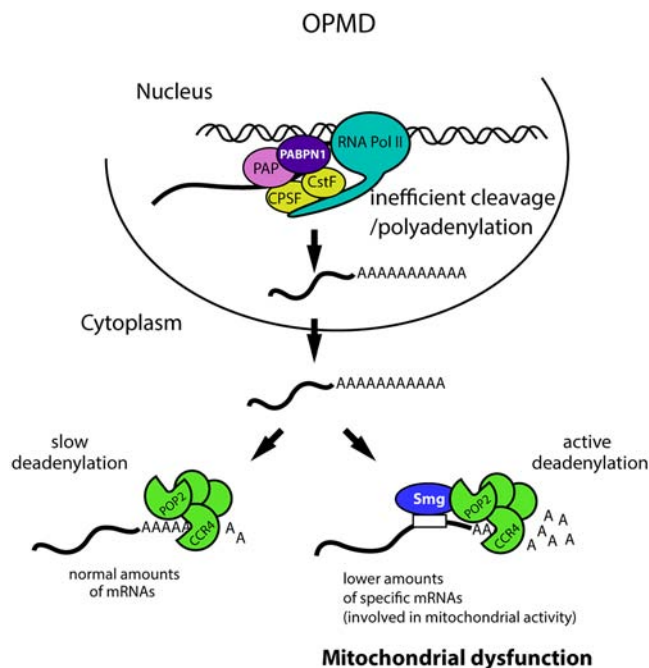


Fig 9. Molecular model of OPMD. The first molecular defect in OPMD would be a general decrease in the cleavage/polyadenylation reaction resulting from affected PABPN1 function. This would not lead to a reduction of mRNA levels at steady-state for most mRNAs, but would lead to such a decrease for mRNAs actively deadenylated by Smg/CCR4-NOT, among which mRNAs involved in mitochondrial function. This would result in mitochondrial dysfunction and in turn affected muscle function. Additional mechanisms of mRNA regulation occurring downstream of the first defect in cleavage/polyadenylation are also expected to be involved. CPSF, Cleavage and polyadenylation specificity factor; CstF, Cleavage stimulation factor; PAP, poly(A) polymerase.

doi:10.1371/journal.pgen.1005092.g009

result from both the gain-of-function and the loss-of-function of the same protein [59]. The protein responsible for the disease would exist in two different conformations with two different yet normal functions. Extension of the polyglutamine tract would favour one conformer resulting in increased amounts of this conformer and the partial loss-of-function of the other conformer; the pathology would result from both these effects. In this model, the mutant protein would have the same function as the normal protein but would have the ability to alter the balance between both protein forms. Several properties of PABPN1 are consistent with this model for OPMD. We have shown previously that the normal function of PABPN1 and more specifically its RNA binding activity is required for OPMD-like defects in the *Drosophila* model [23]. In addition, PABPN1-17ala half-life was reported to be longer than that of PABPN1 in cell models, leading to higher accumulation of PABPN1-17ala and protein aggregation [60]. Thus, expansion of the polyalanine tract results in protein "overexpression" which contributes to the pathology. Given this data, overexpression of the normal protein might be expected to induce similar defects as expression of the mutant protein, as it is the case in *Drosophila* models for other disorders [61]. Consistent with this, we previously reported that PABPN1 expression in *Drosophila* muscles induced wing posture defects, although at lower levels than PABPN1-17ala expression [23]. Finally, normal PABPN1 is also known to form oligomers during nuclear polyadenylation and can form nuclear aggregates that recruit ubiquitin and proteasomes under specific physiological conditions [52,62].

Because the presence of nuclear aggregates and muscle defects can to some extent be uncoupled, we have previously proposed that nuclear aggregates are not always pathological [23].

This is consistent with results concerning polyglutamine diseases where aggregates can have a protective role [63]. We find that the improvement of muscle function when deadenylation is genetically reduced correlates with an increased number of PABPN1 aggregates, again strengthening the notion that the aggregates are not always causative of muscle defects. In that case, muscle protection that results from the reduction of molecular defects could allow the formation of more PABPN1 aggregates. Thus, these aggregates might not always be pathological, in particular during early stages of the disease, although they might become so at later stages, when their increased size could interfere with nuclear function.

A major conclusion from our study is that the specificity of the defect in OPMD does not depend *per se* on PABPN1 defect in pre-mRNA cleavage, but on Smg-dependent regulation occurring in the cytoplasm. Because of the shift to proximal poly(A) sites that correlated with mRNA up-regulation, described in the OPMD mouse model [20], we asked whether a similar mechanism could lead to increased Smg levels in *Drosophila* muscles expressing PABPN1-17ala and underlie increased deadenylation. However, the same poly(A) site was used in normal and PABPN1-17ala-expressing muscles, and we failed to detect major deregulation of *smg* mRNA and protein levels in PABPN1-17ala-expressing muscles (S6A-C Fig). We propose that normal Smg-dependent deadenylation, following inefficient pre-mRNA cleavage, could lead to the reduced levels of specific mRNAs that we observe (Fig. 9). In addition, other processes such as mRNP remodelling could contribute to enhanced mRNA decay in the course of the disease progression. Indeed, Smg forms cytoplasmic foci which are distinct, but related to other cytoplasmic RNA granules such as processing (P) bodies or stress granules, in which mRNAs are degraded or translationally repressed, and the regulation of which affects mRNA regulation [25,64].

A recent study also revealed the implication of Smg/SAMD4A in Myotonic Dystrophy Type 1 (DM1). In that case, Smg mechanism of action appeared to be different, since overexpression of Smg decreased DM1 muscle defects by reducing unproductive CUGBP1-eIF2 α translational complexes [50].

Mitochondrial dysfunction has been shown to play a major role in most neurodegenerative diseases including Parkinson's, Alzheimer's, Huntington's and other polyglutamine diseases [65]. More recent data have uncovered that aside mitochondrial function in energy production, mitochondrial dynamics including trafficking and quality control is instrumental in pathogenesis [65–67]. Mitochondria also have a key role in muscle function. *Drosophila* mutants of *pink1* and *parkin*, mutations of which cause Parkinson's disease in man, lead to mitochondrial dysfunction and flight muscle degeneration [68,69]. We show that mitochondrial dysfunction is also an important component of OPMD: Muscle function is improved when mitochondrial biogenesis and activity are genetically increased; in addition, mitochondrial proteins are down-regulated in OPMD muscle biopsies from patients. We identify the molecular defects leading to early mitochondrial dysfunction in OPMD: mRNAs encoding mitochondrial proteins are down-regulated due to their Smg-dependent deadenylation. Therefore, our data reveal Smg as a regulator of mRNAs involved in mitochondrial function. This finding might have important implications on the role of Smg in several neurodegenerative diseases that involve mitochondrial dysfunction and/or RNA toxicity.

Materials and Methods

Ethics statement

Experimental animal studies were conducted under approval of both the RHUL Animal Research Ethics Committee, and the UK Home Office, and with a UK Home Office license (PPL 70/7008) under the UK Animals (Scientific Procedures) Act 1986. Animal were euthanized by

an approved schedule 1 procedure under these statutory regulations. All human muscle biopsies were obtained during surgical procedure after informed consent in accordance with the French legislation on ethical rules.

RNA, DNA, quantitative PCR and Poly(A) test assays

Total RNA was prepared from 10 *Drosophila* thoraxes, mouse quadriceps, human muscle frozen biopsies or HEK293T cells, using Trizol (Invitrogen) as recommended by the manufacturer. DNA was digested using TURBO DNase (Ambion) or DNase RNase free (Qiagen). Total RNA concentration was determined with nanodrop ND-1000 spectrophotometer. For RT-qPCR, 0.1–1 µg of total RNA was reverse transcribed with SuperScript III (Invitrogen). Random hexamers (Roche) were used for reverse transcription following Smg immunoprecipitations and for pre-mRNA cleavage analysis. Oligo-d(T)₁₂₋₁₈ primers (Invitrogen) were used in RT-qPCR comparing mRNA levels in *Drosophila* thoraxes of different genotypes; we verified that utilization of random hexamers for these RT-qPCR reproduced the deregulation observed with oligo-d(T)₁₂₋₁₈ primers (S1B Fig). A mix of oligo-d(T)₁₂₋₁₈ primers and random hexamers was used for reverse transcription performed on mouse and human RNAs. RNA levels were calculated using the LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche) on the LightCycler 480 Instrument (Roche), and normalized with *Drosophila sop* and/or *Cpr100A* mRNAs, mouse *Rplp0* and human B2M. *sop* and *Rplp0* encode ribosomal proteins, β2-microglobulin (B2M) encodes a component of MHC class I molecules, and *Cpr100A* encodes a cuticular protein present in thorax cuticle but not expressed in muscles. Poly(A) test (PAT) assays were performed with 1 µg of total RNA using either regular PAT [70] (Fig. 3C), or ePAT [71] (Fig. 7E, S3, S6 Fig) methods. Briefly, for the PAT reaction, mRNA poly(A) tails were coated with oligo-d(T)₁₂₋₁₈ primers which were then ligated; this reaction was followed by annealing of the d(T)-anchor primer to the overhanging remaining As at 12°C and its subsequent ligation, then by reverse transcription from this ligated primer, and PCR using d(T)-anchor and a gene specific primer [70]. For ePAT, the d(T)-anchor primer was annealed to mRNA poly(A) tails at 25°C and used as template for mRNA extension with Klenow polymerase (see S6A Fig, ePAT); this reaction was then switched to 55°C to dissociate annealings that had not been extended by Klenow polymerase, and followed by reverse transcription and PCR using d(T)-anchor and a gene specific primer [71]. PCR fragments were visualized on 2% agarose gel. RNase H digestion was performed on 3 µg RNA with 5 Units RNase H (Biolabs) in the presence or not of 1 µg oligo-d(T)₁₂₋₁₈. Mitochondrial DNA (mtDNA) was extracted using a standard DNA extraction method. mtDNA was isolated from 5 thoraxes per genotype for *Drosophila*, and from 100 5 µm-thick cryosections for human muscle biopsies. Total DNA concentration was quantified with the nanodrop ND-1000 spectrophotometer and 0.4 ng of total DNA was used for qPCR. *Drosophila* mtDNA content was quantified using *mt:CoI*, *mt:CoII*, and *mt:cyt-b* genes, and normalized with *RpL32* genomic DNA. mtDNA content in human muscle biopsies was quantified using the MT-RNR1 gene and normalized using B2M nuclear genomic DNA. Primers used are indicated in S1 Text.

Enzymatic activities of mitochondrial complexes

Enzymatic activities were measured from homogenates of 10 thoraxes prepared at 4°C in 700 µl of phosphate buffer (50 mM; pH 7). Enzymatic activities for each complex were measured from five independent homogenates per genotype. Activities of complexes I, II, II+III and IV, as well as citrate synthase activity were determined spectrophotometrically from the supernatant fraction as described previously [72]. Protein concentrations were measured using the Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad).

Antibodies, western blots, immunostaining and immunoprecipitations

Anti-Smg antibody was raised in rabbit against amino acids 571 to 771 of the Smg protein (SAM domain). Briefly, this fragment was expressed in *E. coli* as a His6-SUMO fusion protein. After metal affinity chromatography, the N-terminal SUMO domain was cleaved with ULP protease, the two protein fragments were separated by a second metal affinity column, and the SAM domain of Smg was finally purified by Superdex75 gel filtration. The antibody was produced at Eurogentec, using four injections of 100 µg of Smg SAM domain. Protein extracts were obtained from 5 or 10 thoraxes per genotype. Western blots were performed as described [73]. Immunostaining of thoracic muscles were performed as described previously [23]. Antibodies used for western blots, immunostaining and Smg immunoprecipitation procedures are indicated in Supporting Materials and Methods.

Calculation of SRE scores

SRE scores were determined as reported [51] using 98 *Drosophila* and 407 mouse genes down-regulated in OPMD muscles and annotated with the term "mitochondrion". Control gene lists were generated by random selection within *Drosophila* genes found not to be enriched in Smg immunoprecipitations, with a fold change ≤ 1 [51] (98 genes, 20 times), and all mouse genes (*Mus musculus*, Ensembl) (407 genes, 10 times), respectively. Genes present in the tested lists were removed from the control lists. SRE scores were determined for all potential transcripts of each gene and the highest score only was considered per gene.

Supporting Information

S1 Text. Supporting materials and methods.

(PDF)

S1 Fig. Quantification of mRNAs encoding mitochondrial respiratory chain subunits and of negative control mRNAs. A) Quantification of mRNA levels in control and PABPN1-17ala-expressing adult thoraxes at day 2, using RT-qPCR. mRNA levels were normalized to *sop* mRNA. Means are from three biological replicates, error bars represent standard deviation. * *p*-value <0.05, ** *p*-value <0.01, *** *p*-value <0.001, ns: not significant, using the Student's t-Test. Genotypes are indicated for (A-C). B) Quantification of mRNA levels at day 2, using RT-qPCR, with reverse transcription performed with random hexamers, showing down-regulation in PABPN1-17ala-expressing thoraxes compared to control. mRNA levels were normalized to *sop* mRNA. Means are from two biological replicates quantified three times, error bars represent standard deviation. ** *p*-value <0.01, *** *p*-value <0.001, using the Student's t-Test. C) Quantification of negative control mRNAs which were found unaffected in microarray analysis, using RT-qPCR. mRNA levels were normalized to *sop* mRNA. Means are from two biological replicates quantified three times, error bars represent standard deviation. ns: not significant, using the Student's t-Test.

(PDF)

S2 Fig. *GstD1-GFP* expression in OPMD muscles. A) GFP expression in indirect flight muscles of control (*GstD1-GFP/+; Mhc-Gal4/+*) and OPMD (*UAS-PABPN1-17ala, GstD1-GFP/+; Mhc-Gal4/+*) flies at day 2. Expression of the *GstD1-GFP* transgene was visualized by direct fluorescence and captured with the same settings for both genotypes. B) Western blots of control (*GstD1-GFP/+; Mhc-Gal4/+*) and OPMD (*UAS-PABPN1-17ala, GstD1-GFP/+; Mhc-Gal4/+*) adult thoraxes at day 6 to quantify *GstD1-GFP* protein. Protein extracts were from 0.25 thoraxes of flies raised at 18°C. α -Tubulin was used as loading control.

(PDF)

S3 Fig. Affected mRNA poly(A) tails in the OPMD *Drosophila* model. A) ePAT (extension PAT) assays of mRNAs encoding mitochondrial proteins in control (w^{1118}) and OPMD (*Act88F-PABPN1-17ala/+*) adult thoraxes at day 6. *sop* mRNA was used as a negative control. Arrows indicate poly(A) tails of 12A. B) Profiles of ePAT assays shown in A, using ImageJ software.
(PDF)

S4 Fig. Role of *Smg* in the OPMD *Drosophila* model. A) Quantification of mRNA levels in control and PABPN1-17ala-expressing thoraxes in the presence or absence of heterozygous *twin* or *smg* mutations at day 6, using RT-qPCR. mRNA levels were normalized to *Cpr100A* mRNA. Means of two biological replicates quantified three times. Error bars represent standard deviation. * *p*-value < 0.05, ** *p*-value < 0.01, *** *p*-value < 0.001, ns: not significant, using the Student's t-Test. Genotypes are indicated for (A-D). B) Quantification of negative control mRNAs which were unaffected in PABPN1-17ala-expressing muscles in the microarray analysis, using RT-qPCR. mRNA levels were normalized to *sop* mRNA. *RpS6* mRNA levels remained unaffected in the different genotypes. The upregulation of *RpL32* mRNA in the *twin*^{-/+} condition can be explained by its reduced deadenylation, since the CCR4-NOT complex can act without specificity. Means are from two biological replicates quantified three times, error bars represent standard deviation. *** *p*-value < 0.001, ns: not significant, using the Student's t-Test. C) Quantification of *PABPN1-17ala* mRNA in thoraxes at day 6 using RT-qPCR, either in the absence (w^{1118} ; *Act88F-PABPN1-17ala/+*) or the presence of *twin* (w^{1118} ; *Act88F-PABPN1-17ala/twin*⁸¹¹⁵) or *smg* (w^{1118} ; *Act88F-PABPN1-17ala/smg*¹) mutations. mRNA levels were normalized to *sop* mRNA. Mean quantifications are from two biological replicates quantified three times. Error bars represent standard deviation. ns: not significant using the Student's t-Test. D) PABPN1-17ala protein levels determined by western blots. Protein extracts were from 0.25 thoraxes at day 6. α -Tubulin was used as a loading control. E) Western blot validating *Smg* immunoprecipitation from thoraxes in the conditions used for RNA co-precipitations shown in Fig. 5E. The western blot was revealed with rabbit (rb) anti-*Smg* antibody.
(PDF)

S5 Fig. SRE-dependent mRNA regulation in human cells. A) Quantification of mRNAs produced from SRE+ and SRE- reporter constructs transfected in HEK293T cells. (Top) Schematic representation of the 3'UTR of the *Ndufa10* gene containing the SRE sequence (black circle, SRE+) or mutated in the SRE (open circle, SRE-), downstream of the Renilla Luciferase gene. Sequences of the SRE region are shown. Nucleotides in the SRE loop (CTGG) are in bold, those in the stem are underlined. The SRE mutation (SRE-) was designed to create a *Hpa1* restriction site (red). (Bottom) HEK293T cells were co-transfected with either pRLTK-Luc-SRE+ or pRLTK-Luc-SRE-, and PGK-eGFP constructs. mRNA levels were quantified using RT-qPCR, normalized to B2M or GFP mRNA levels. The levels of GFP mRNA normalized to B2M mRNA were similar in both types of transfection (right panel). Means are from eight quantifications performed in three independent transfections, error bars represent standard deviation. * *p*-value < 0.05, using the Student's t-Test. B) RT-PCR (left) and western blot (right) showing that HEK293T cells express SAMD4A at the mRNA and protein levels. For RT-PCR, negative controls in which the reverse transcriptase was omitted (-RT) are shown. The western blot was revealed with anti-human SAMD4A. C) Confocal images of SAMD4A immunostaining in HEK293T cells with anti-human SAMD4A (red) showing accumulation of SAMD4A in foci. DNA was revealed with Hoechst (blue).
(PDF)

S6 Fig. *smg* mRNA is not deregulated in PABPN1-17ala-expressing *Drosophila* muscles. A-B) Poly(A) site utilization in control and PABPN1-17ala-expressing muscles. A) Scheme of the experiment. RNAs were treated with RNase H either in the presence or the absence of oligo-d(T)₁₂₋₁₈ to degrade the poly(A) tail (1), and then subjected to ePAT (2). Black arrows indicate the primers used in the ePAT reaction. The oligo(A) remaining of the poly(A) tail after RNase H digestion allows to produce a discrete band in PCR amplification which indicates the site used for polyadenylation. B) Results of the experiment described in (A). The same poly(A) site was used in both control and PABPN1-17ala-expressing muscles (arrow). Genotypes are indicated in (C). C) Quantification of *smg* mRNA and protein levels in control and PABPN1-17ala expressing muscles at day 6. Quantification of *smg* mRNA using RT-qPCR. mRNA levels were normalized to *sop* mRNA (left). Means are from two biological replicates quantified three times, error bars represent standard deviation. ns: not significant, using the Student's t-Test. Western blot of control and PABPN1-17ala-expressing thoraxes revealed with rabbit anti-Smg (right). Protein extracts were from 5 thoraxes. α -Tubulin was used as a loading control. (PDF)

S1 Table. Down-regulated genes in *Drosophila* muscles expressing PABPN1-17ala. K-means clustering is from microarray analysis previously described [26]. (XLS)

S2 Table. Down-regulated genes in *Drosophila* muscles expressing PABPN1-17ala, annotated with the GO term "mitochondrion". (XLSX)

S3 Table. Functional annotation clustering of common down-regulated genes in A17.1 mouse muscles, from microarray analysis previously described [54]. (XLSX)

S4 Table. Down-regulated genes in A17.1 mouse muscles at T1, annotated with the GO term "mitochondrion". (XLSX)

S5 Table. Differentially expressed proteins in muscle biopsies from OPMD patients. (XLSX)

Acknowledgments

We are grateful to G.L. Boccaccio, D. Bohmann, R. Lehmann, C. Smibert, H. Stocker and R. Wharton for their gifts of *Drosophila* stocks or antibodies. The authors acknowledge the clinicians Pr. Perie and Pr. Lacau St Guily for human muscle biopsies and the patients for their collaboration. We thank Sestina Falcone, Isabelle Lemière and Sandrine Filaut for technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AC KO CT MS. Performed the experiments: AC PK NB SP TG SC PD FC LM MB MO CJ. Analyzed the data: AC PK SP SC PD KO CT MS. Contributed reagents/materials/analysis tools: BM GD VM GBB. Wrote the paper: AC PK CT MS.

References

1. Taylor JP, Hardy J, Fischbeck KH (2002) Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science* 296: 1991–1995. PMID: [12065827](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12065827/)

2. Ramaswami M, Taylor JP, Parker R (2013) Altered ribostasis: RNA-protein granules in degenerative disorders. *Cell* 154: 727–736. doi: [10.1016/j.cell.2013.07.038](https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.038) PMID: [23953108](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23953108/)
3. Todd PK, Paulson HL (2010) RNA-mediated neurodegeneration in repeat expansion disorders. *Annals of neurology* 67: 291–300. doi: [10.1002/ana.21948](https://doi.org/10.1002/ana.21948) PMID: [20373340](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20373340/)
4. Brais B, Bouchard J-P, Xie Y-G, Rochefort DL, Chrétien N, et al. (1998) Short GCG expansions in the *PABP2* gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nature Genetics* 18: 164–167. PMID: [9462747](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9462747/)
5. Abu-Baker A, Rouleau GA (2007) Oculopharyngeal muscular dystrophy: recent advances in the understanding of the molecular pathogenic mechanisms and treatment strategies. *Biochim Biophys Acta* 1772: 173–185. PMID: [17110089](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17110089/)
6. Davies JE, Berger Z, Rubinsztein DC (2006) Oculopharyngeal muscular dystrophy: potential therapies for an aggregate-associated disorder. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 1457–1462. PMID: [16530457](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16530457/)
7. Tome FM, Fardeau M (1980) Nuclear inclusions in oculopharyngeal dystrophy. *Acta Neuropathol (Berl)* 49: 85–87. PMID: [6243839](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6243839/)
8. Calado A, Tome FM, Brais B, Rouleau GA, Kuhn U, et al. (2000) Nuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy consist of poly(A) binding protein II aggregates which sequester poly(A) RNA. *Hum Mol Genet* 9: 2321–2328. PMID: [11001936](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11001936/)
9. Anvar SY, t Hoen PA, Venema A, van der Sluijs B, van Engelen B, et al. (2011) Deregulation of the ubiquitin-proteasome system is the predominant molecular pathology in OPMD animal models and patients. *Skeletal muscle* 1: 15. doi: [10.1186/2044-5040-1-15](https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-15) PMID: [21798095](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21798095/)
10. Raz V, Buijze H, Raz Y, Verwey N, Anvar SY, et al. (2014) A Novel Feed-Forward Loop between ARIH2 E3-Ligase and PABPN1 Regulates Aging-Associated Muscle Degeneration. *The American journal of pathology* 184: 1119–1131. doi: [10.1016/j.ajpath.2013.12.011](https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.12.011) PMID: [24486325](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24486325/)
11. Davies JE, Rubinsztein DC (2011) Over-expression of BCL2 rescues muscle weakness in a mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Human molecular genetics* 20: 1154–1163. doi: [10.1093/hmg/ddq559](https://doi.org/10.1093/hmg/ddq559) PMID: [21199860](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21199860/)
12. Wahle E (1991) A novel poly(A)-Binding protein acts as a specificity factor in the second phase of messenger RNA polyadenylation. *Cell* 66: 759–768. PMID: [1878970](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1878970/)
13. Bienroth S, Keller W, Wahle E (1993) Assembly of a processive mRNA polyadenylation complex. *EMBO J* 12: 585–594. PMID: [8440247](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8440247/)
14. Kerwitz Y, Kuhn U, Lilie H, Knoth A, Scheuermann T, et al. (2003) Stimulation of poly(A) polymerase through a direct interaction with the nuclear poly(A) binding protein allosterically regulated by RNA. *The EMBO journal* 22: 3705–3714. PMID: [12853485](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12853485/)
15. Kuhn U, Gundel M, Knoth A, Kerwitz Y, Rudel S, et al. (2009) Poly(A) tail length is controlled by the nuclear poly(A)-binding protein regulating the interaction between poly(A) polymerase and the cleavage and polyadenylation specificity factor. *The Journal of biological chemistry* 284: 22803–22814. doi: [10.1074/jbc.M109.018226](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.018226) PMID: [19509282](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19509282/)
16. Benoit B, Mitou G, Chartier A, Temme C, Zaessinger S, et al. (2005) An essential cytoplasmic function for the nuclear poly(A) binding protein, PABP2, in poly(A) tail length control and early development in *Drosophila*. *Dev Cell* 9: 511–522. PMID: [16198293](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16198293/)
17. Apponi LH, Leung SW, Williams KR, Valentini SR, Corbett AH, et al. (2010) Loss of nuclear poly(A)-binding protein 1 causes defects in myogenesis and mRNA biogenesis. *Human molecular genetics* 19: 1058–1065. doi: [10.1093/hmg/ddp569](https://doi.org/10.1093/hmg/ddp569) PMID: [20035013](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20035013/)
18. Bresson SM, Conrad NK (2013) The human nuclear poly(a)-binding protein promotes RNA hyperadenylation and decay. *PLoS genetics* 9: e1003893. doi: [10.1371/journal.pgen.1003893](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003893) PMID: [24146636](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24146636/)
19. Beaulieu YB, Kleinman CL, Landry-Voyer AM, Majewski J, Bachand F (2012) Polyadenylation-dependent control of long noncoding RNA expression by the poly(A)-binding protein nuclear 1. *PLoS genetics* 8: e1003078. doi: [10.1371/journal.pgen.1003078](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003078) PMID: [23166521](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23166521/)
20. Jenal M, Elkon R, Loayza-Puch F, van Haften G, Kuhn U, et al. (2012) The poly(A)-binding protein nuclear 1 suppresses alternative cleavage and polyadenylation sites. *Cell* 149: 538–553. doi: [10.1016/j.cell.2012.03.022](https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.022) PMID: [22502866](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22502866/)
21. de Klerk E, Venema A, Anvar SY, Goeman JJ, Hu O, et al. (2012) Poly(A) binding protein nuclear 1 levels affect alternative polyadenylation. *Nucleic acids research* 40: 9089–9101. doi: [10.1093/nar/gks655](https://doi.org/10.1093/nar/gks655) PMID: [22772983](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22772983/)
22. Barbezier N, Chartier A, Bidet Y, Buttstedt A, Voisset C, et al. (2011) Antiprion drugs 6-aminophenanthridine and guanabenz reduce PABPN1 toxicity and aggregation in oculopharyngeal muscular dystrophy. *EMBO molecular medicine* 3: 35–49. doi: [10.1002/emmm.201000109](https://doi.org/10.1002/emmm.201000109) PMID: [21204267](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21204267/)

23. Chartier A, Benoit B, Simonelig M (2006) A Drosophila model of oculopharyngeal muscular dystrophy reveals intrinsic toxicity of PABPN1. *Embo J* 25: 2253–2262. PMID: [16642034](#)
24. Semotok JL, Cooperstock RL, Pinder BD, Vari HK, Lipshitz HD, et al. (2005) Smaug recruits the CCR4/POP2/NOT deadenylase complex to trigger maternal transcript localization in the early Drosophila embryo. *Curr Biol* 15: 284–294. PMID: [15723788](#)
25. Zaessinger S, Busseau I, Simonelig M (2006) Oskar allows nanos mRNA translation in Drosophila embryos by preventing its deadenylation by Smaug/CCR4. *Development* 133: 4573–4583. PMID: [17050620](#)
26. Chartier A, Raz V, Sterrenburg E, Verrips CT, van der Maarel SM, et al. (2009) Prevention of oculopharyngeal muscular dystrophy by muscular expression of Llama single-chain intrabodies in vivo. *Hum Mol Genet* 18: 1849–1859. doi: [10.1093/hmg/ddp101](#) PMID: [19258344](#)
27. Lyne R, Smith R, Rutherford K, Wakeling M, Varley A, et al. (2007) FlyMine: an integrated database for Drosophila and Anopheles genomics. *Genome biology* 8: R129. PMID: [17615057](#)
28. Chen J, Shi X, Padmanabhan R, Wang Q, Wu Z, et al. (2008) Identification of novel modulators of mitochondrial function by a genome-wide RNAi screen in Drosophila melanogaster. *Genome research* 18: 123–136. PMID: [18042644](#)
29. Sykietis GP, Bohmann D (2008) Keap1/Nrf2 signaling regulates oxidative stress tolerance and lifespan in Drosophila. *Developmental cell* 14: 76–85. doi: [10.1016/j.devcel.2007.12.002](#) PMID: [18194654](#)
30. Fariss MW, Chan CB, Patel M, Van Houten B, Orrenius S (2005) Role of mitochondria in toxic oxidative stress. *Molecular interventions* 5: 94–111. PMID: [15821158](#)
31. Kelly DP, Scarpulla RC (2004) Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes & development* 18: 357–368.
32. Puigserver P, Spiegelman BM (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocrine reviews* 24: 78–90. PMID: [12588810](#)
33. Scarpulla RC (2008) Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiological reviews* 88: 611–638. doi: [10.1152/physrev.00025.2007](#) PMID: [18391175](#)
34. Baltzer C, Tiefenbock SK, Marti M, Frei C (2009) Nutrition controls mitochondrial biogenesis in the Drosophila adipose tissue through Delg and cyclin D/Cdk4. *PLoS One* 4: e6935. doi: [10.1371/journal.pone.0006935](#) PMID: [19742324](#)
35. Herzig RP, Andersson U, Scarpulla RC (2000) Dynein light chain interacts with NRF-1 and EWG, structurally and functionally related transcription factors from humans and drosophila. *Journal of cell science* 113 Pt 23: 4263–4273. PMID: [11069771](#)
36. Tiefenbock SK, Baltzer C, Egli NA, Frei C (2010) The Drosophila PGC-1 homologue Spargel coordinates mitochondrial activity to insulin signalling. *The EMBO journal* 29: 171–183. doi: [10.1038/emboj.2009.330](#) PMID: [19910925](#)
37. Tennesen JM, Baker KD, Lam G, Evans J, Thummel CS (2011) The Drosophila estrogen-related receptor directs a metabolic switch that supports developmental growth. *Cell metabolism* 13: 139–148. doi: [10.1016/j.cmet.2011.01.005](#) PMID: [21284981](#)
38. Barthmaier P, Fyrberg E (1995) Monitoring development and pathology of Drosophila indirect flight muscles using green fluorescent protein. *Developmental biology* 169: 770–774. PMID: [7781915](#)
39. Temme C, Simonelig M, Wahle E (2014) Deadenylation of mRNA by the CCR4-NOT complex in Drosophila: molecular and developmental aspects. *Frontiers in Genetics* 5: 143. doi: [10.3389/fgene.2014.00143](#) PMID: [24904643](#)
40. Temme C, Zaessinger S, Meyer S, Simonelig M, Wahle E (2004) A complex containing the CCR4 and CAF1 proteins is involved in mRNA deadenylation in Drosophila. *EMBO J* 23: 2862–2871. PMID: [15215893](#)
41. Temme C, Zhang L, Kremmer E, Ihling C, Chartier A, et al. (2010) Subunits of the Drosophila CCR4-NOT complex and their roles in mRNA deadenylation. *Rna* 16: 1356–1370. doi: [10.1261/ma.2145110](#) PMID: [20504953](#)
42. Benoit P, Papin C, Kwak JE, Wickens M, Simonelig M (2008) PAP- and GLD-2-type poly(A) polymerases are required sequentially in cytoplasmic polyadenylation and oogenesis in Drosophila. *Development* 135: 1969–1979. doi: [10.1242/dev.021444](#) PMID: [18434412](#)
43. Juge F, Zaessinger S, Temme C, Wahle E, Simonelig M (2002) Control of poly(A) polymerase level is essential to cytoplasmic polyadenylation and early development in Drosophila. *EMBO J* 21: 6603–6613. PMID: [12456666](#)
44. Goldstrohm AC, Hook BA, Seay DJ, Wickens M (2006) PUF proteins bind Pop2p to regulate messenger RNAs. *Nat Struct Mol Biol* 13: 533–539. PMID: [16715093](#)

45. Kadyrova LY, Habara Y, Lee TH, Wharton RP (2007) Translational control of maternal Cyclin B mRNA by Nanos in the *Drosophila* germline. *Development* 134: 1519–1527. PMID: [17360772](#)
46. Garcia-Rodriguez LJ, Gay AC, Pon LA (2007) Puf3p, a Pumilio family RNA binding protein, localizes to mitochondria and regulates mitochondrial biogenesis and motility in budding yeast. *J Cell Biol* 176: 197–207. PMID: [17210948](#)
47. Gerber AP, Herschlag D, Brown PO (2004) Extensive association of functionally and cytotopically related mRNAs with Puf family RNA-binding proteins in yeast. *PLoS Biol* 2: E79. PMID: [15024427](#)
48. Saint-Georges Y, Garcia M, Delaveau T, Jourden L, Le Crom S, et al. (2008) Yeast mitochondrial biogenesis: a role for the PUF RNA-binding protein Puf3p in mRNA localization. *PLoS One* 3: e2293. doi: [10.1371/journal.pone.0002293](#) PMID: [18523582](#)
49. Rouget C, Papin C, Boureux A, Meunier AC, Franco B, et al. (2010) Maternal mRNA deadenylation and decay by the piRNA pathway in the early *Drosophila* embryo. *Nature* 467: 1128–1132. doi: [10.1038/nature09465](#) PMID: [20953170](#)
50. de Haro M, Al-Ramahi I, Jones KR, Holth JK, Timchenko LT, et al. (2013) Smaug/SAMD4A restores translational activity of CUGBP1 and suppresses CUG-induced myopathy. *PLoS genetics* 9: e1003445. doi: [10.1371/journal.pgen.1003445](#) PMID: [23637619](#)
51. Chen L, Dumelie JG, Li X, Cheng MH, Yang Z, et al. (2014) Global regulation of mRNA translation and stability in the early *Drosophila* embryo by the Smaug RNA-binding protein. *Genome biology* 15: R4. doi: [10.1186/gb-2014-15-1-r4](#) PMID: [24393533](#)
52. Berciano MT, Villagra NT, Ojeda JL, Navascues J, Gomes A, et al. (2004) Oculopharyngeal muscular dystrophy-like nuclear inclusions are present in normal magnocellular neurosecretory neurons of the hypothalamus. *Hum Mol Genet* 13: 829–838. PMID: [14976164](#)
53. Davies JE, Wang L, Garcia-Oroz L, Cook LJ, Vacher C, et al. (2005) Doxycycline attenuates and delays toxicity of the oculopharyngeal muscular dystrophy mutation in transgenic mice. *Nat Med* 11: 672–677. PMID: [15864313](#)
54. Trollet C, Anvar SY, Venema A, Hargreaves IP, Foster K, et al. (2010) Molecular and phenotypic characterization of a mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy reveals severe muscular atrophy restricted to fast glycolytic fibres. *Human molecular genetics* 19: 2191–2207. doi: [10.1093/hmg/ddq098](#) PMID: [20207626](#)
55. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols* 4: 44–57. doi: [10.1038/nprot.2008.211](#) PMID: [19131956](#)
56. Aviv T, Lin Z, Ben-Ari G, Smibert CA, Sicheri F (2006) Sequence-specific recognition of RNA hairpins by the SAM domain of Vts1p. *Nature structural & molecular biology* 13: 168–176.
57. Green JB, Gardner CD, Wharton RP, Aggarwal AK (2003) RNA recognition via the SAM domain of Smaug. *Molecular cell* 11: 1537–1548. PMID: [12820967](#)
58. Gidaro T, Negroni E, Perie S, Mirabella M, Laine J, et al. (2013) Atrophy, fibrosis, and increased PAX7-positive cells in pharyngeal muscles of oculopharyngeal muscular dystrophy patients. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 72: 234–243. doi: [10.1097/NEN.0b013e3182854c07](#) PMID: [23399899](#)
59. Kratter IH, Finkbeiner S (2010) PolyQ disease: Too many Qs, too much function? *Neuron* 67: 897–899. doi: [10.1016/j.neuron.2010.09.012](#) PMID: [20869586](#)
60. Raz V, Routledge S, Venema A, Buijze H, van der Wal E, et al. (2011) Modeling oculopharyngeal muscular dystrophy in myotube cultures reveals reduced accumulation of soluble mutant PABPN1 protein. *The American journal of pathology* 179: 1988–2000. doi: [10.1016/j.ajpath.2011.06.044](#) PMID: [21854744](#)
61. Feany MB, Bender WW (2000) A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature* 404: 394–398. PMID: [10746727](#)
62. Keller RW, Kuhn U, Aragon M, Bornikova L, Wahle E, et al. (2000) The nuclear poly(A) binding protein, PABP2, forms an oligomeric particle covering the length of the poly(A) tail. *J Mol Biol* 297: 569–583. PMID: [10731412](#)
63. Arrasate M, Mitra S, Schweitzer ES, Segal MR, Finkbeiner S (2004) Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* 431: 805–810. PMID: [15483602](#)
64. Baez MV, Luchelli L, Maschi D, Habif M, Pascual M, et al. (2011) Smaug1 mRNA-silencing foci respond to NMDA and modulate synapse formation. *The Journal of cell biology* 195: 1141–1157. doi: [10.1083/jcb.201108159](#) PMID: [22201125](#)
65. Schon EA, Przedborski S (2011) Mitochondria: the next (neurode)generation. *Neuron* 70: 1033–1053. doi: [10.1016/j.neuron.2011.06.003](#) PMID: [21689593](#)

66. Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, Suen DF, Gautier CA, et al. (2010) PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS biology* 8: e1000298. doi: [10.1371/journal.pbio.1000298](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000298) PMID: [20126261](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20126261/)
67. Wang X, Winter D, Ashrafi G, Schlehe J, Wong YL, et al. (2011) PINK1 and Parkin Target Miro for Phosphorylation and Degradation to Arrest Mitochondrial Motility. *Cell* 147: 893–906. doi: [10.1016/j.cell.2011.10.018](https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.018) PMID: [22078885](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22078885/)
68. Clark IE, Dodson MW, Jiang C, Cao JH, Huh JR, et al. (2006) *Drosophila* pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature* 441: 1162–1166. PMID: [16672981](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16672981/)
69. Park J, Lee SB, Lee S, Kim Y, Song S, et al. (2006) Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature* 441: 1157–1161. PMID: [16672980](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16672980/)
70. Salles FJ, Strickland S (1999) Analysis of poly(A) tail lengths by PCR: the PAT assay. *Methods Mol Biol* 118: 441–448. PMID: [10549542](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10549542/)
71. Janicke A, Vancuylenberg J, Boag PR, Traven A, Beilharz TH (2012) ePAT: a simple method to tag adenylated RNA to measure poly(A)-tail length and other 3' RACE applications. *RNA* 18: 1289–1295. doi: [10.1261/ma.031898.111](https://doi.org/10.1261/ma.031898.111) PMID: [22543866](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22543866/)
72. Casas F, Pessemeesse L, Grandemange S, Seyer P, Baris O, et al. (2009) Overexpression of the mitochondrial T3 receptor induces skeletal muscle atrophy during aging. *PLoS One* 4: e5631. doi: [10.1371/journal.pone.0005631](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005631) PMID: [19462004](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19462004/)
73. Benoit B, Nemeth A, Aulner N, Kühn U, Simonelig M, et al. (1999) The *Drosophila* poly(A)-binding protein II is ubiquitous throughout *Drosophila* development and has the same function in mRNA polyadenylation as its bovine homolog *in vitro*. *Nucleic Acids Res* 27: 3771–3778. PMID: [10481015](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10481015/)

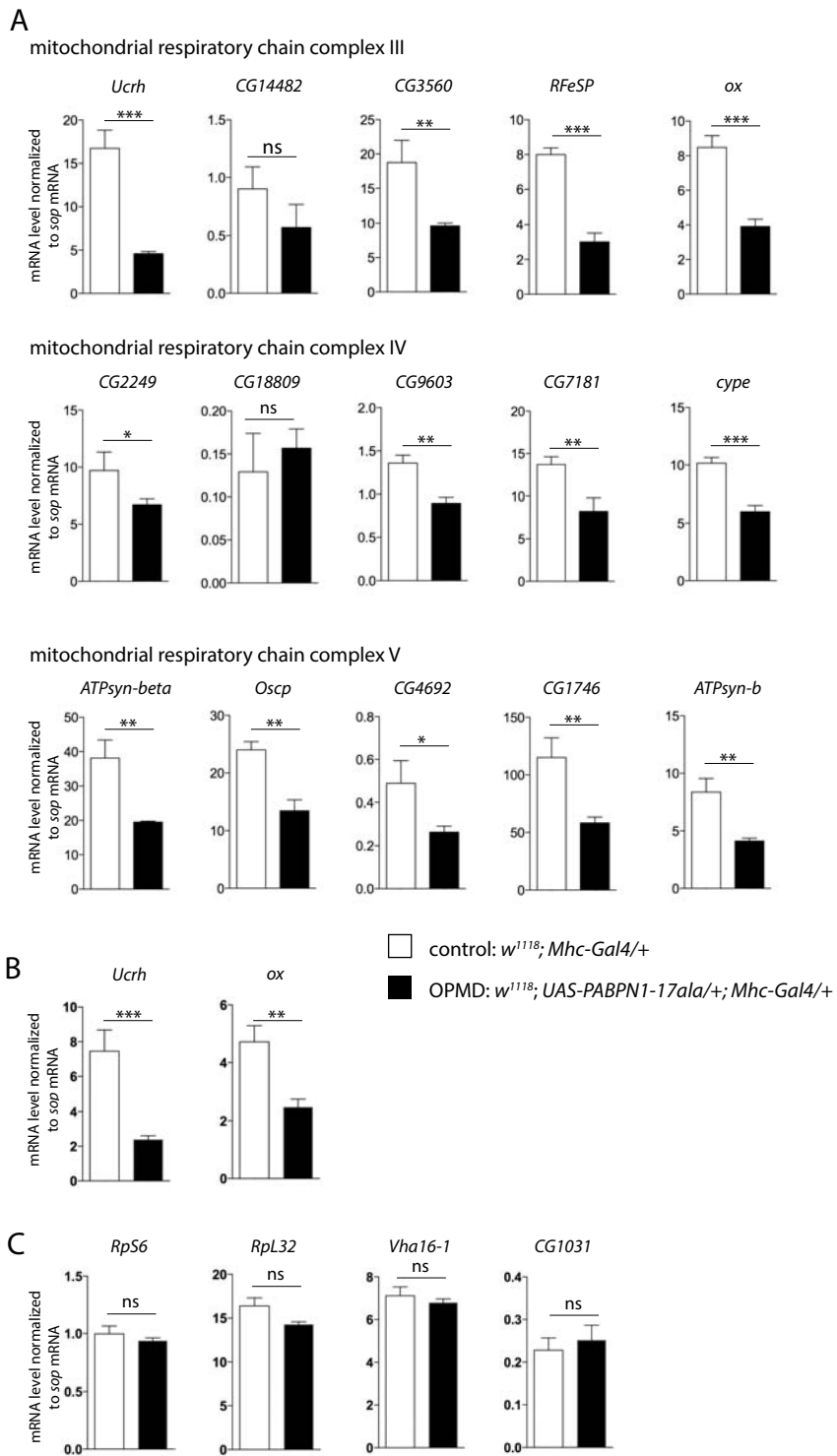


Figure S1

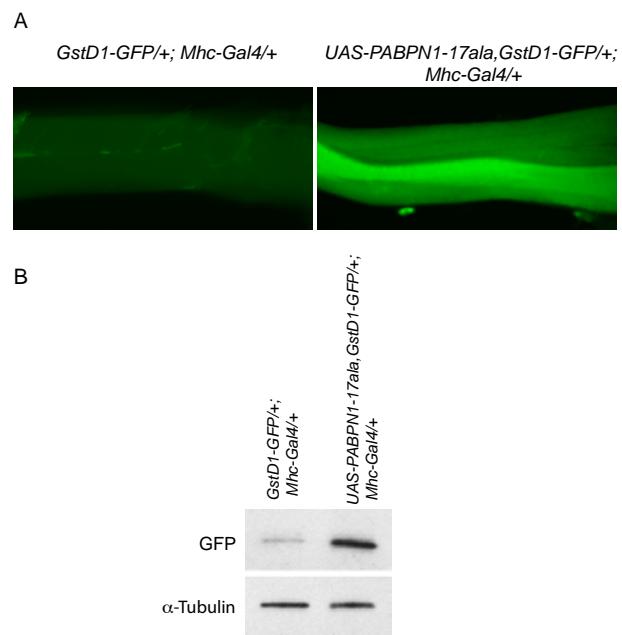


Figure S2

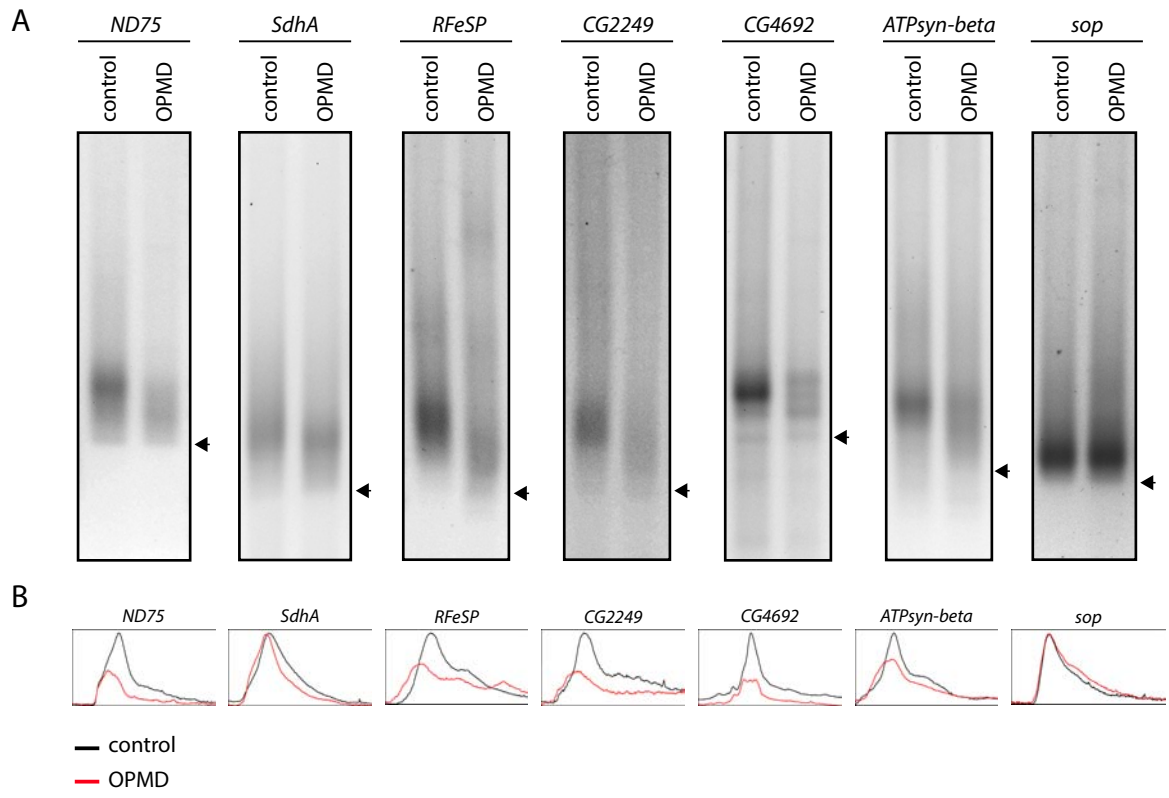


Figure S3

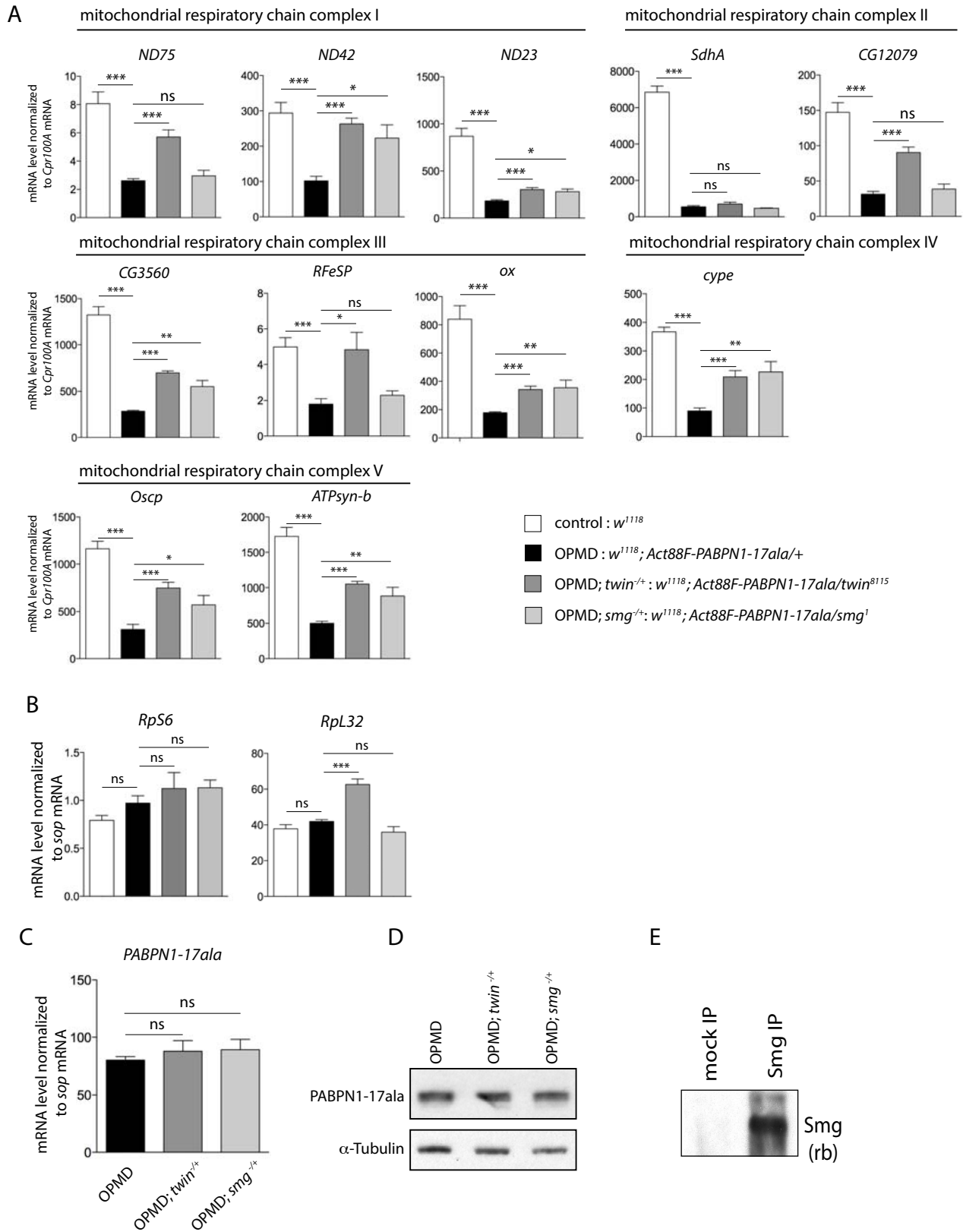


Figure S4

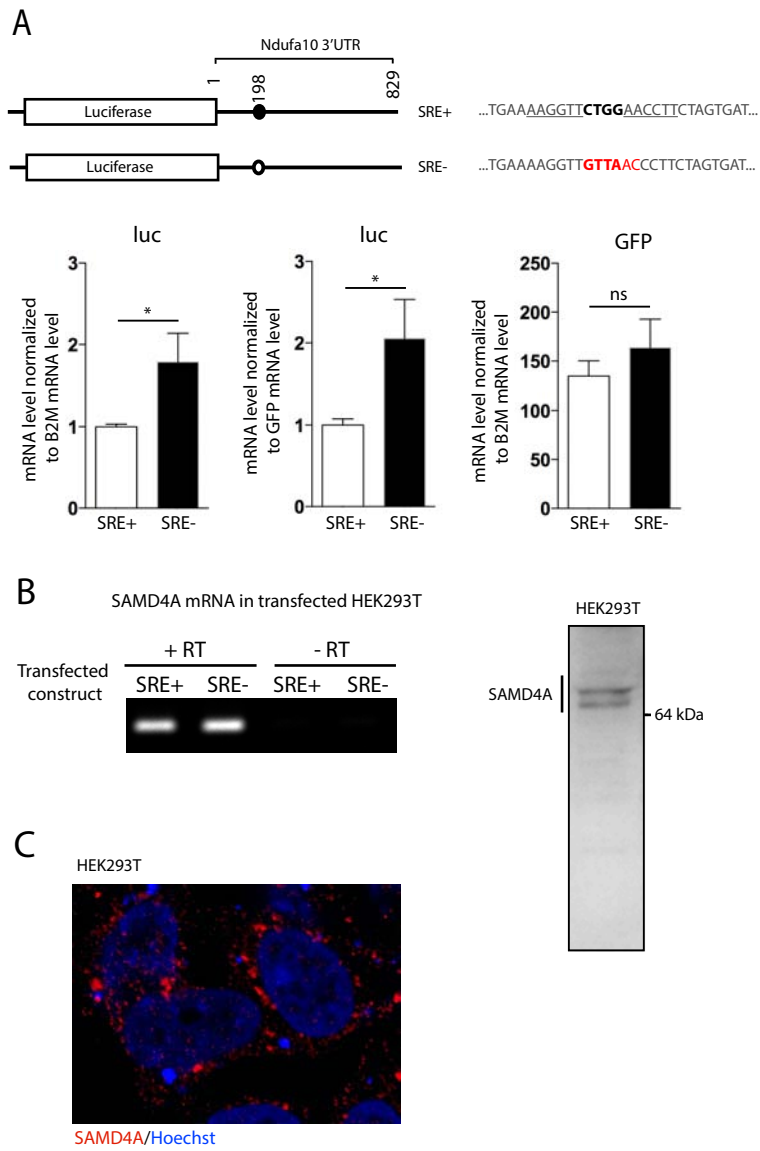
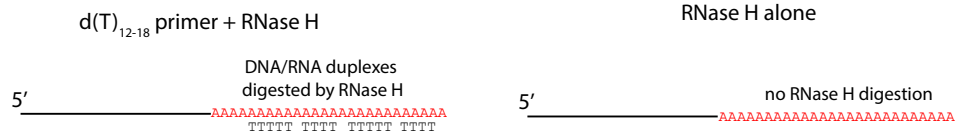


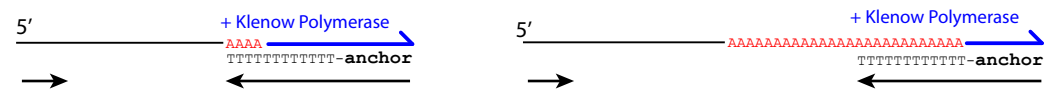
Figure S5

A

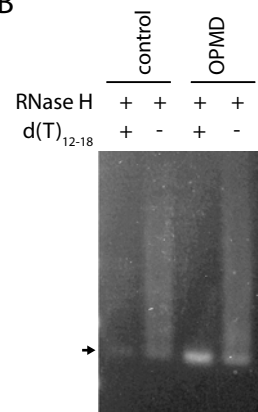
1) Poly(A) tail digestion



2) ePAT



B



C

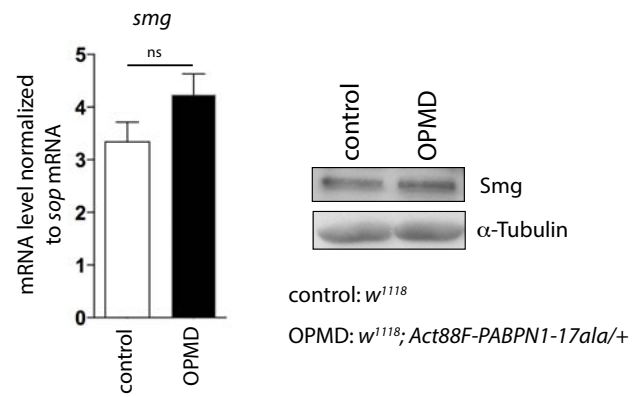


Figure S6

Article n° 2

Nuclear poly(A)-binding protein aggregates misplace a
pre-mRNA outside of SC35 speckle causing its
abnormal splicing

*Pierre Klein, Martine Oloko, Fanny Roth, Valérie Montel, Alberto Malerba, Susan Jarmin, Teresa Gidaro,
Linda Popplewell, Sophie Perie, Jean Lacau St Guily, Pierre de la Grange, Michael Antoniou, George Dickson,
Gillian Butler-Browne, Bruno Bastide, Vincent Mouly, Capucine Trollet*

Nucleic Acids Res gkw703 - 2016.

Contexte de l'étude

Au cours de cette étude nous avons recherché la présence d'éventuels défauts d'épissages dans l'OPMD. En effet des études précédentes suggéraient la possibilité de tels événements: des facteurs d'épissages ont été retrouvés piégés dans les agrégats nucléaires de PABPN1 et une analyse transcriptomique croisée effectuée sur des biopsies de patients OPMD, et sur les modèles de souris et de drosophile de la pathologie, a montré des concepts tels que « RNA splicing » et « alternative splicing » comme étant dérégulés. A partir de ce constat nous avons donc effectué une analyse par « exon array » à partir de biopsies de muscles SCM issus de patients OPMD comparés au même muscle issus d'individus contrôles du même âge. Les biopsies OPMD présentent des agrégats nucléaires caractéristiques de la pathologie. La puce utilisée contient environ 4 sondes par exon et environ 40 sondes par gène permettant ainsi de quantifier à la fois le niveau global d'expression d'un transcrite mais aussi le niveau exonique pour connaître l'épissage alternatif et déterminer d'éventuels défauts. Le résultat obtenu est le suivant : 46 exons différenciellement exprimés dans 39 gènes ont été mis en évidence dans les biopsies issues de patients OPMD comparées à celles d'individus contrôles, et parmi ceux-ci 12 cassettes exon (exon épissé du transcrite final avec ses introns de part et d'autre). Ces transcrits ont été classés manuellement par degré de confiance.

Degré de confiance	Très haut	Haut	Moyen	TOTAL
TOTAL	2	8	14	24
Cassette exon	2	4	1	7
Site épissage alternatif	0	1	1	2
Premier exon alternatif (promoteur alternatif)	0	1	1	2
Dernier exon alternatif (site de polyadénylation alternatif)	0	0	2	2
Inconnu	0	2	9	11

Tableau 6 : Nombre de gènes présentant un défaut d'épissage, détecté par « exon array » effectué sur des biopsies musculaires de patients OPMD comparées à celles d'individus contrôles, et classés par indice de confiance et par type d'épissage

(Voir chapitre épissage).

Les maladies liées à un défaut épissage peuvent être classées en plusieurs groupes :

- mutation ou variation génétique dans une *cis*-séquence régulatrice de l'épissage : plus de 200 maladies humaines sont causées par des mutations affectant l'épissage du pré-mRNA en détruisant ou affaiblissant un site d'épissage ou en activant un site cryptique. Des mutations ponctuelles dans les sites d'épissages en 3' et en 5' sont les formes les plus communes de ce groupe. Cela conduit à l'exclusion d'un exon, l'activation d'un site cryptique ou la rétention d'un intron. Des mutations dans des séquences régulatrices de l'épissage peuvent conduire à des pathologies telles que certains cancers, l'amyotrophie spinale (SMA), la mucoviscidose, la dystrophie musculaire de Duchenne, ou encore le syndrome de Hutchinson-Gilford (Chabot, Shkreta, 2016 ; Daguinet et al., 2015, De Sandre-Giovannoli, Lévy, 2006)
- dérégulation fonctionnelle d'un facteur *trans*-régulateur impliqué dans l'épissage : dans ce cas, plusieurs transcrits différents sont affectés en même temps. Les mutations peuvent être retrouvées dans une protéine impliquée dans la synthèse de snRNP (SMN1, TDP-43), un composant du spliceosome, ou un facteur d'épissage. Un changement du niveau d'expression ou une modification post-traductionnelle d'un facteur d'épissage est fréquent dans les cancers. Ce groupe recouvre les maladies suivantes : mucoviscidose, SMA, pigmentosa retinitis, la sclérose latérale amyotrophique (ALS), l'autisme, les maladies d'Alzheimer et de Huntington et certains cancers (Chabot et Shkreta, 2016 ; Daguinet, Dujardin, et Valcarcel, 2015).
- dérégulation de la stœchiométrie de facteurs d'épissages consécutif à leur séquestration dans des répétitions nucléotidiques (188, 15). L'exemple le plus connu est la dystrophie myotonique où le facteur MBLN est séquestré dans les expansions CTG/CCTG. D'autres maladies sont retrouvées dans ce groupe telles que l'ataxie cérébrospinale 8, 10, 12, la maladie de Huntington, ou l'ALS associée à C9ORF72 (Chabot et Shkreta, 2016 ; Daguinet, Dujardin, et Valcarcel, 2015) (Figure 31)

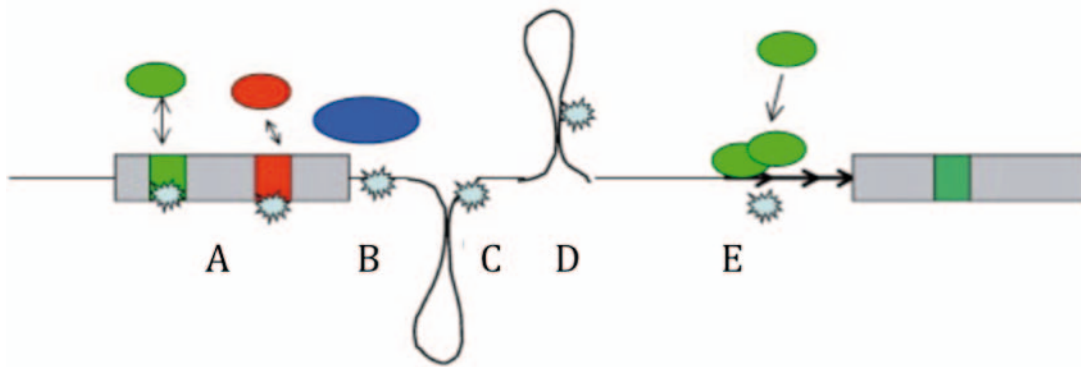


Figure 31: Représentation des causes pouvant conduire à une maladie liée à un défaut épissage.

A) mutation dans une séquence inhibitrice ou activatrice de l'épissage. B) mutation dans un site d'épissage. C-D) mutation conduisant à une structure secondaire incorrecte E) expansion conduisant à la séquestration d'un facteur épissage. Modifié d'après (Chabot, Shkreta, 2016)

Résultats

L'étude par « exon array » a montré que le transcrit présentant l'épissage le plus significativement dérégulé code une protéine spécifique du muscle appelée TNNT3, pour Troponine T3 (*voir chapitre muscle*). Le pré-ARNm de TNNT3 contient 19 exons dont un exon fœtal exclusivement retrouvé lors du développement embryonnaire. Ce gène est intensivement épissé conduisant à plus de 100 isoformes différentes. Six exons alternatifs sont présents dans la partie 5' et deux exons mutuellement exclusifs dans la partie 3' (exon 16 et 17 aussi appelées respectivement alpha et beta). Ces isoformes sont régulées durant le développement et les variations dans l'abondance relative de chaque isoforme participe à la plasticité musculaire (Schilder et al., 2012). L'analyse par exon array a mis en évidence une diminution des isoformes incluant un exon 16, ce que nous avons confirmé sur les biopsies de patients OPMD issues de différents muscles. Nous avons aussi retrouvé le défaut dans un modèle cellulaire murin (Ala17) et dans la souris modèle de l'OPMD (Ala17.1), deux situations de surexpression de la forme mutée de PABPN1. Par des expérimentations d'extinction par siARN de l'expression de la protéine PABPN1 dans les cellules Ala17 nous avons diminué drastiquement la présence d'agrégats nucléaires. Ceci s'accompagne d'un changement du profil d'épissage vers un profil contrôle indiquant un lien entre ces structures pathologiques et le défaut dans le transcrit de *TNNT3*. Nous nous sommes intéressés au facteur d'épissage régulant l'expression des exons mutuellement exclusifs de *TNNT3*. Pour

cela nous avons utilisé des logiciels de prédiction de facteurs d'épissage basés sur la présence des séquences régulatrices retrouvées sur le pré-ARNm. Ainsi 15 facteurs ont été sélectionnés et nous avons réalisé des expériences de cotransfection de ces facteurs avec des vecteurs exprimant les minigènes de *TNNT3* humain et murin, comprenant les exons 15 à 18 avec leurs introns respectifs, ce qui nous a permis d'étudier l'épissage des exons mutuellement exclusifs de *TNNT3*. Dans des cellules de type HEK293T, seule la surexpression du facteur SC35 (SRSF2) fait varier significativement l'épissage de l'exon 16 de *TNNT3* : il s'agit d'une inclusion de cet exon pour les deux minigènes murin et humain. Lorsque l'expression de SC35 est diminuée par ARNi, une exclusion de l'exon 16 de *TNNT3* est observée récapitulant le défaut présent chez les patients OPMD. Ainsi la modulation de l'expression de SC35 est capable de modifier le niveau de l'exon 16 de *TNNT3* dans les deux sens (une surexpression de SC35 entraîne une inclusion de l'exon et une sous-expression entraîne une exclusion de l'exon). Cependant nous avons vérifié le niveau d'expression de SC35 dans les muscles des patients OPMD et il est comparable à celui de sujets contrôles. Par contre, il a été décrit que PABPN1 délocalise des speckles nucléaires qui contiennent SC35, lorsque les agrégats se forment. Nous avons donc émis l'hypothèse que, durant la formation de ces agrégats, PABPN1 pouvait piéger le pré-ARN de *TNNT3* en dehors des speckles nucléaires, entraînant ainsi une délocalisation de cet ARNm de SC35 essentiellement présent dans les speckles. Pour vérifier cela nous avons réalisé des expériences de localisation de cet ARNm *TNNT3* par FISH dans les cellules Ala17, et nous avons bien mis en évidence sa présence dans les agrégats de PABPN1. En utilisant une sonde ciblant un intron, nous avons confirmé la présence du pré-ARNm dans les agrégats de PABPN1, donc spatialement délocalisé des speckles et de la protéine SC35 mimant une diminution locale de la concentration de ce facteur. Nous avons recherché les conséquences physiopathologiques possible de cette perturbation de localisation de l'ARNm de *TNNT3*, et donc du défaut d'épissage, dans le muscle squelettique. Cette protéine est essentielle dans l'homéostasie musculaire et chaque isoforme a son importance dans la plasticité du muscle. Des études *in vitro* ont montré que les isoformes alpha et beta ont une sensibilité différente pour le calcium. En collaboration avec l'équipe de Bruno Bastide, nous avons effectué des mesures de sensibilité calcique sur des fibres isolées issues de soleus de souris contrôle comparé à des soleus de souris OPMD dans lesquels le même défaut d'épissage de *Tnnt3* est présent. Les résultats ont montré une diminution de la sensibilité calcique pour les muscles de souris OPMD comparés ceux de souris contrôles.

Discussion

A partir des résultats de l'exon array effectué sur les biopsies OPMD, la première observation est le nombre relativement faible de gènes dérégulés par rapport à d'autres analyses du même type. Pour exemple, une étude par exon array sur des motoneurons inférieurs isolés par microdissection obtenu *post mortem* sur des individus contrôles comparé à des patients atteints de sclérose latérale amyotrophique, a montré un changement dans l'épissage de 6449 exons dans 4311 gènes. Dans cette pathologie TDP-43, une protéine de liaison à l'ARN impliquée directement dans la régulation de l'épissage alternatif, forme des agrégats cytoplasmiques (Highley et al., 2014). Une autre étude par exon array sur des biopsies de patients atteint de dystrophie myotonique, pathologie causée par le piégeage du facteur d'épissage MBNL dans des expansion anormales du gène DMPK, comparées à des biopsies issus d'individus contrôles, a montré plus de 100 gènes présentant des défauts d'épissage de manière significative (Koebis et al., 2011). Dans ces deux études, un facteur de *trans*-régulation de l'épissage présentait une perte de fonction. Dans notre étude, seulement 2 gènes présentent une dérégulation avec un indice de confiance suffisamment fort, ce qui suggérerait que la dérégulation d'un facteur de *trans*-régulation de l'épissage ne pouvait pas être la cause primaire du défaut dans l'OPMD (car dans ce cas là une dérégulation plus importante aurait vraisemblablement été observée). Au cours de notre étude nous avons mis en évidence un nouveau mécanisme de dérégulation de l'épissage. Nous avons montré que les agrégats de PABPN1 étaient responsables du défaut d'épissage de *TNNT3* par un mécanisme d'emprisonnement du pré-ARN. Le noyau contient des structures appelées « corps nucléaires » qui correspondent à des régions morphologiquement distinctes lorsqu'elles sont observées par microscopie électronique et qui peuvent être observées par des marqueurs protéiques spécifiques en détection par microscopie en fluorescence. Parmi ces structures, on trouve le nucléole, les corps de Cajal, les speckles, les paraspeckles ou encore les corps de stress nucléaires (*voir paragraphe localisation intranucléaire des agrégats*). Ces structures contiennent de nombreuses protéines et ARN et peuvent servir de site de synthèse, maturation, stockage, et séquestration d'ARN spécifiques et de protéines. Elles ne sont pas structurées par des membranes et il semblerait que pour certains des ARN spécifiques soient suffisant pour induire leur formation en servant de plateformes pour recruter les protéines qui les composent (Carmo-Fonseca, Rino, 2011). C'est le cas des certains long ARN non codant nommés récemment ARN architecturaux (arcARN) qui servent de structure d'échafaudage pour la formation de ces corps nucléaires. Ces ARN sont caractérisés par leur localisation enrichie

dans un corps nucléaire spécifique et par le fait que bloquer leur expression conduit à la déstructuration du corps nucléaire (avec la présence de marqueurs protéiques dispersés dans le nucléoplasme) (Chujo et al., 2016). On pourrait donc émettre l'hypothèse que de la même façon les agrégats nucléaires de PABPN1 nécessiteraient la présence d'un ARN spécifique comme structure d'assemblage. Cette hypothèse a déjà été suggérée précédemment (Bengoechea et al., 2012) et pour conforter cette idée, des expériences ont montré que le domaine de liaison à l'ARN de PABPN1 est nécessaire pour la formation des agrégats. Ainsi il est fort probable qu'un ARN soit nécessaire pour permettre à la protéine PABPN1 de former des agrégats nucléaires. Dans ce cas, l'ARN *TNNT3* ou même une de ses formes épissée en particulier pourrait être responsable de l'agrégation. Au cours de notre étude nous avons retrouvé le pré-ARNm piégé dans les agrégats de PABPN1 et pour conforter cette hypothèse plusieurs caractéristiques en font un bon candidat car il est seulement exprimé dans le muscle squelettique où sont exclusivement retrouvés les agrégats de PABPN1 mais aussi son expression est très forte et présente un épissage régulé de façon spatio-temporelle. *In vitro* le niveau de *TNNT3* augmente au cours de la différenciation dans les myoblastes murins et de façon intéressante le nombre d'agrégats augmente aussi dans le modèle OPMD de ces cellules. De plus un ARNm comme échafaud permet de fixer de nombreuses protéines : une protéine peut être capturée par un ou plusieurs autres domaines protéiques contenant entre 10 à 100 acides aminés alors qu'il semblerait qu'une protéine puisse être capturée par seulement 4 à 17 nt d'un ARN. Ainsi une protéine d'environ 100 acides aminés peut capturer seulement 1 à 2 autres protéines alors qu'un ARN de 100 nucléotides pourrait en théorie capturer entre 5 et 20 protéines, l'encombrement stérique est cependant à prendre en compte. Dans les agrégats nucléaires retrouvés dans l'OPMD, de nombreuses autres protéines ont été montrées comme présentes en plus de PABPN1 et il a aussi été montré par FISH en ciblant la queue poly(A) que des ARN polyadénylés s'y trouvent (Calado, Tomé, et al., 2000). Mais aucun en particulier n'avait été mis en évidence. Nous avons ainsi démontré pour la première fois qu'un pré-ARN spécifique du muscle est localisé dans les agrégats de PABPN1. Les corps nucléaires structurés par des ARN permettent une séquestration rapide et réversible des protéines de liaison à l'ARN. Ces structures étant moins rigides que les agrégats protéiques, leur nombre peut être rapidement adapté à un changement de condition physiologique tel qu'un stress cellulaire ce qui semble être le cas des agrégats de PABPN1 puisqu'ils peuvent se dissocier pendant la mitose pour se reformer rapidement après (Marie-Josée Sasseville et al., 2006)

Au cours de notre étude nous avons aussi confirmé le défaut d'épissage de deux autres gènes (*RECK* et *ZCCHC11* ; les autres restent à étudier) dans les biopsies issues de patients. *RECK* pour « Reversion Inducing Cysteine Rich with Kazal Motifs » code une protéine extracellulaire inhibitrice de protéases et *ZCCHC11* pour « Zinc Finger CCHC-Type Containing 11 » code une protéine de type ARN uridylyltransferase. Dans le premier cas nous avons retrouvé une augmentation de l'exon 8 conduisant à un codon stop prématuré dans le transcrit final et dans le deuxième cas une diminution de l'exon 8. Cependant le mécanisme responsable ne semble à priori pas être le même que pour *TNNT3*, car nous n'avons pas observé de lien direct entre la présence des agrégats et la dérégulation de leur épissage : ces défaut n'ont pas pu être confirmée dans les cellules Ala17 qui ont été utilisées dans l'étude pour *TNNT3*.

Pour 80% des pré-ARN l'épissage a lieu co-transcriptionnellement, pour les autres l'épissage est post-transcriptionnel et a lieu dans les speckles avant d'être exporté vers le cytoplasme (Girard et al., 2012). De façon intéressante, en condition contrôle, PABPN1 et le pré-ARN de *TNNT3* sont localisés dans ces structures et donc vraisemblablement à proximité. Il a été montré que la formation des agrégats de PABPN1 commence au niveau des speckles et que leur formation déplete certains composants présents (Tavanez et al., 2005), ce qui semble être aussi le cas de *TNNT3*. L'épissage post-transcriptionnel a lieu majoritairement pour les introns localisés dans la partie 3' des pré-ARN lorsque la molécule a déjà entrepris l'étape de clivage de la partie 3'. Cette étape de maturation nécessite un complexe multiprotéique qui contient entre autre PABPN1 (21) (Voir paragraphe polyadenylation de l'extrémité 3' des ARNm). L'exon 16 dérégulé de *TNNT3* est situé dans la partie 3' du gène juste avant le 3'UTR, il est donc très probable que la protéine PABPN1 soit déjà présente sur la molécule avant l'épissage de ses exons mutuellement exclusifs. Pour aller dans ce sens, nous avons observé une dérégulation dans la longueur de la queue poly(A) de *TNNT3* ce qui montre que la maturation en 3' de cet ARN par PABPN1 n'est pas correcte non plus (Figure 32).

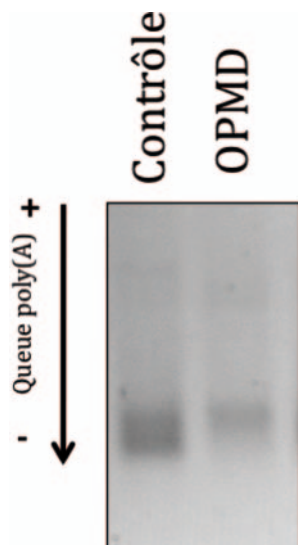


Figure 32: Mesure de la longueur de la taille de la queue poly(A) de l'ARN de *TNNT3* dans des biopsies SCM de patients OPMD et d'individus contrôles.

*Chez les patients OPMD la queue poly(A) de *TNNT3* est raccourcie.*

Au cours de cette étude nous avons mis en évidence pour la première fois des défauts d'épissage dans l'OPMD impliquant la présence des agrégats nucléaires. La spécificité musculaire de cet ARN est intéressante puisqu'elle pourrait permettre de répondre à plusieurs questions en suspens dans la maladie. Nous avons aussi montré un nouveau mécanisme pathologique de dérégulation de l'épissage : à savoir l'emprisonnement d'un pré-ARN dans un agrégat pathologique conduisant à une dérégulation non pas généralisée mais restreinte avec des conséquences physiopathologiques au niveau du muscle.

Nuclear poly(A)-binding protein aggregates misplace a pre-mRNA outside of SC35 speckle causing its abnormal splicing

Pierre Klein¹, Martine Oloko¹, Fanny Roth¹, Valérie Montel², Alberto Malerba³, Susan Jarmin³, Teresa Gidaro¹, Linda Popplewell³, Sophie Perie^{1,4}, Jean Lacau St Guily^{1,4}, Pierre de la Grange⁵, Michael Antoniou⁶, George Dickson³, Gillian Butler-Browne¹, Bruno Bastide², Vincent Mouly¹, Capucine Trollet^{1*}

¹ Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Centre de Recherche en Myologie, INSERM UMRS974, CNRS FRE3617, Institut de Myologie, 47 bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France

² Univ. Lille - URePSSS - Unité de Recherche Pluridisciplinaire Sport Santé Société, équipe APMS, F-59000 Lille, France

³ School of Biological Sciences, Royal Holloway - University of London, Egham, Surrey, TW20 0EX, UK

⁴ Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Faculty of medicine and University Pierre-et-Marie-Curie, Paris VI, Tenon Hospital, Assistance Publique des Hopitaux de Paris, Paris, France

⁵ GenoSplice, ICM, Hôpital de la Pitié Salpêtrière, Paris, France

⁶ King's College London School of Medicine, Nuclear Biology Group, Department of Medical and Molecular Genetics, Guy's Hospital, London, UK.

* To whom correspondence should be addressed. Tel: 00 33 (0)1 42 16 57 15; Fax: 00 33 (0)1 42 16 57 00; Email: capucine.trollet@upmc.fr

Present Address: Capucine TROLLET, Myology Research Center, UMRS 974 UPMC - INSERM - FRE 3617 CNRS – AIM, 47, bld de l'hôpital - G.H. Pitié-Salpêtrière - Bâtiment Babinski, 75651 Paris cedex 13, France

ABSTRACT

A short abnormal polyalanine expansion in the polyadenylate-binding protein nuclear 1 (PABPN1) protein causes oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD). Mutated expanded PABPN1 proteins accumulate as insoluble intranuclear aggregates in muscles of OPMD patients. While the roles of PABPN1 in nuclear polyadenylation and regulation of alternative poly(A) site choice are established, the molecular mechanisms behind OPMD and the exact contribution of these aggregates remain undetermined. Using exon array, we identified for the first time several splicing defects in OPMD. Among them, we demonstrated a defect in the splicing regulation of the muscle-specific Troponin T3 (TNNT3) mutually exclusive exons 16 and 17 in OPMD samples compared to controls. This splicing defect was directly linked to the SC35 (SRSF2) splicing factor and to the presence of nuclear aggregates. As reported here, these aggregates are able to trap *TNNT3* pre-mRNA, driving it outside of nuclear speckles leading to an altered SC35-mediated splicing. This resulted in a decreased calcium sensitivity of muscle fibers, which could in turn play a role in muscle pathology. We thus report a novel splicing mechanism that may play a role in various other diseases with nuclear inclusions or foci containing an RNA binding protein.

INTRODUCTION

The poly(A) RNA binding protein, polyadenylate-binding protein nuclear 1 (PABPN1), is a ubiquitous protein, which plays key roles in post-transcriptional processing of RNA (1). PABPN1 activates the polyA polymerase (PAP) and controls the poly(A) tail length on RNA transcripts (2-4). PABPN1 regulates the use of alternative polyadenylation (APA) sites (5,6), which in turn affects mRNA levels and stability. For example it has recently been shown that PABPN1 regulates human telomerase 3' end mRNA maturation (7). PABPN1 is also involved in the regulation of the processing of long non-coding RNA (lncRNAs) (8) and nuclear surveillance leading to hyperadenylation and decay of RNA (9). A short (1 to 7) and meiotically stable GCN trinucleotide repeat expansion in the coding region of the *PABPN1* gene causes oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) (10), a late and progressive autosomal dominant inherited neuromuscular disorder. OPMD is mainly characterised by progressive eyelid drooping, swallowing difficulties (as pharyngeal and cricopharyngeal muscles are mostly affected) and proximal limb weakness (11).

OPMD belongs to the group of triplet expansion diseases (12,13), the translation of the *PABPN1* allele containing expanded repeats (expPABPN1) leads to a pathogenic polyalanine tract at the N-terminal of the protein and the formation of PABPN1 intranuclear aggregates in muscle fibers (14). Aggregates contain several proteins including PABPN1 itself, ubiquitin, proteasome subunits, heat-shock proteins, splicing factors, poly(A) polymerase (PAP) as well as poly(A) RNA (15-17). But these structures also exclude cleavage and polyadenylation specific factor subunits (CPSF), splicing factor SC35 and the cytoplasmic poly(A) binding protein (PABPC) (17). The expanded polyalanine tract in PABPN1 is thought to induce misfolding and the formation of these aggregates, which are targeted to the ubiquitin-proteasome degradation pathway (18,19). Although the presence of aggregates in skeletal muscles is a pathological hallmark of OPMD, their exact role in the pathogenesis of the

1
2
3 disease remains controversial. The identification of splicing factors in aggregates (15,16,20), the
4 finding that, using literature-aided analyses, the terms 'RNA splicing' and 'alternative splicing' were
5 found to be biomedical concepts highly associated with human OPMD-deregulated genes (18), and
6 two recent studies highlighting a role of PABPN1 in splicing regulation (21,22), all suggested that
7 splicing defects may occur in OPMD, although no such mechanism has yet been described.
8
9

10 In mammalian cells, pre-mRNA splicing regulates gene expression. Alternative splicing (AS) – namely
11 the inclusion or exclusion of exons in mRNAs – enables one single gene to generate multiple mRNAs
12 isoforms further translated into different proteins. This AS produces a highly dynamic proteome,
13 whose diversity is regulated in a developmental and tissue-specific manner (23). More than 90% of
14 human protein-encoding genes create multiple mRNA isoforms by AS. This post-transcriptional
15 mechanism is the first one to generate diversity and is tightly regulated with both cis- and trans-acting
16 elements. Defects in RNA splicing processes, such as mutations in cis-acting splicing elements or in
17 trans-acting splicing factors, have emerged as a common disease-causing mechanism (24,25).
18
19
20
21

22 Skeletal muscle is a highly plastic tissue, adapting its structure and metabolism in response to diverse
23 conditions such as contractile activity, mechanical overload, and nutrients. Skeletal muscle is one of
24 the tissues with the highest number of alternative splicing events, highlighting a high degree of
25 complexity (26-28). In particular, alterations of alternative splicing events have been largely described
26 in several muscular dystrophies (29,30).
27
28
29

30 In this work, we report on the first demonstration of splicing defects in OPMD and of a novel
31 mechanism involved in at least one of these defects related to muscle function. Very interestingly, we
32 demonstrated that in OPMD the mutually exclusive last exons of *TNNT3* mRNA are misspliced with
33 an imbalanced ratio of the two resulting isoforms. Using a minigene construct, we have shown that
34 SC35 regulates the splicing of these mutually exclusive exons. We further demonstrated that
35 PABPN1 aggregates are able to sequester a pre-mRNA. Altogether we proposed that this splicing
36 defect results from the delocalization of the mRNA, trapped in pathological aggregates, and
37 subsequently misplaced outside from SC35-nuclear speckles.
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

MATERIAL AND METHODS

Patients

For the whole-genome microarray study, we selected skeletal muscle (sternocleidomastoid) biopsies from OPMD patients (n=4) and control (n=4) individuals (**Table 1**). All patients were aged between 54 and 91 years at the time of muscle biopsy. For downstream analysis, we used additional muscle biopsies (sternocleidomastoid and quadriceps) from control (aged 44-91) and OPMD (aged 52-82) patients. All samples generated from these biopsies were compared individually and not pooled before the analyses. OPMD patients showed typical clinical phenotype and PABPN1 mutation confirmed by genetic studies. All muscle biopsies were obtained during surgical procedure after informed consent in accordance with the French legislation on ethical rules.

RNA isolation and Affymetrix exon array data processing

Total RNA was extracted from snap frozen skeletal muscles biopsies using Trizol (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. RNA samples were quantified using a ND-1000 NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies) and purity/integrity were assessed using disposable RNA chips (Agilent RNA 6000 Nano LabChip kit) and an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbrunn, Germany). The average RIN value of total RNAs was 7.16 (6.1 to 7.8). Each RNA (n=8; 4 controls and 4 OPMD) was analyzed individually. Affymetrix Human Exon 1.0 ST arrays were hybridized by GenoSplice technology (www.genosplice.com) according the Ambion WT protocol (Life technologies, France) and Affymetrix (Santa Clara, CA) labelling and hybridization recommendations. Raw data were controlled with the Expression console (Affymetrix). Affymetrix Human Exon 1.0 ST Array dataset analysis and visualization were made using EASANA[®] (GenoSplice technology), which is based on the GenoSplice's FAST DB[®] annotations (31). Exon Array data were normalized using quantile normalization. Background corrections were made with antigenomic probes and probes were selected as described previously (24,32). Only probes targeting exons annotated from FAST DB[®] transcripts were selected to focus on well-annotated genes whose mRNA sequences are in public databases (31,33). Bad-quality selected probes (e.g., probes labeled by Affymetrix as 'cross-hybridizing') and probes whose intensity signal was too low compared to antigenomic background probes with the same GC content were removed from the analysis. Only probes were the detection above background was with a *P* value ≤ 0.05 in at least half of the arrays were considered for statistical analysis (24,32). Only genes expressed in at least one compared condition were analyzed. To be considered expressed, the DABG *P*-value had to be ≤ 0.05 for at least half of the gene probes. We performed an unpaired Student's t-test to compare gene intensities in the different biological replicates. Genes were considered significantly regulated when fold-change was ≥ 1.5 and uncorrected *P* value ≤ 0.05 . Statistical analyses were also performed using the Student's unpaired t-test on the splicing index to analyze the Exon Array data as described previously (24,32). The splicing index corresponds to a comparison of gene-normalized exon intensity values between the two analyzed experimental conditions. Results were considered statistically significant for uncorrected *P*-values ≤ 0.05 and fold-changes ≥ 2.0 .

1
2
3 To filter and to classify exons predicted to be differentially included, manual inspection was performed
4 after uploading the Exon Array data into the EASANA[®] visualization module, which is based on the
5 FAST DB[®] Client Edition annotations. By computational comparison of publicly available mRNA
6 sequences with genomic sequences, alternative exons have been annotated in FAST DB[®] as
7 alternative first exons, alternative terminal exons, cassette exons, mutually exclusive exons,
8 alternative 5' donor sites, alternative 3' acceptor sites, intron retention and exonic internal deletion
9
10
11 **(suppl. Fig.1 and Suppl. Table 1).**

12 13 **RT-PCR and Real-time qRT-PCR**

14
15 RNA (50-250ng for muscle biopsies, 1-3µg for cell pellet) was reverse transcribed using M-MLV
16 reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The splicing of *TNNT3*
17 mRNA was observed with 1µl of cDNA for PCR using Reddy mix polymerase (Thermo Scientific)
18 according to the manufacturer's instructions and primers located within *TNNT3* exon 15, *TNNT3* exon
19 16 and *TNNT3* exon 17 (sequences information listed in **Suppl. Table 2**). The reaction mixture was
20 heated to 94°C for 5 min and followed by 35 PCR cycles: 15 seconds at 94°C, 15 seconds at 55°C
21 and 15 seconds at 72°C followed by a last elongation step at 72°C during 7 minutes. PCR products
22 from *TNNT3* mRNAs, which are 108 and 131bp respectively, were resolved on 5% non-denaturing
23 polyacrylamide BET strained gels.
24
25
26
27
28

29 cDNA was used for quantitative PCR reaction using SYBR green mix buffer (LightCycler[®] 480 Sybr
30 green I Master) in a total of 9ul reaction volume. PCR reaction was carried out as follows: 8 minutes
31 at 95°C followed by 50 cycles: 15 seconds at 95°C, 15 seconds at 60°C and 15 seconds at 72°C.
32 Specificity of the PCR products was checked by melting curve analysis using the following program:
33 65°C increasing by 0.11°C/second to 97°C. The expression level of each mRNA was normalized to
34 that of human *B2M* mRNA (Beta-2 microglobuline) or murine *RPLP0* mRNA (large ribosomal protein,
35 subunit P0) expression. Expression levels were calculated according to the $\Delta\Delta C_t$ method.
36
37
38
39

40 The sequences of primers used for RT-PCR and for real-time RT-PCR are listed in **Suppl. Table 2**.

41 42 **Plasmid construction**

43
44 The human *TNNT3* minigene (3881 bp) was prepared by amplifying the human *TNNT3* genomic
45 region between exon 15 and exon 18 with the Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity
46 (Invitrogen) following the manufacturer's instruction and using the primers FWD: 5'-
47 **AAACTTAAGGGACAAGGCCAAGGAGCTCT**-3' containing the *Afl*III restriction site (in bold) and
48 REV: 5'-**ACCGGAATTCTGAAGGGGTTCTGCAGCTTT**-3' containing the *Eco*RI site (in bold). The
49 PCR product was digested by *Afl*III and *Eco*RI and inserted into the pCDNA3.1+ (Invitrogen) at the
50 corresponding restriction sites.
51
52
53

54
55 The murine *Tnnt3* minigene (3476 bp) was prepared using the same protocol by amplifying the
56 murine *Tnnt3* genomic region between exon 15 and 18 using the following primers fwd: 5'-
57
58
59
60

1
2
3 AAAACTTAAGGGACAAGGCCAAGGAACTCTG-3' and rev: 5'
4 ACCGGAATTCGGGAGTCTGATAACTTTATTCCT3'.
5
6

7 **Cell culture and transfection**

8
9 Human embryonic kidney HEK293T cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)
10 supplemented with 10% fetal calf serum (Life Technologies) and 50µg/ml gentamycin (Life
11 Technologies) in a 5% CO₂ incubator at 37°C. Cells were grown in 6 wells plate and were transfected
12 at 80% confluence with 5.2 µg of DNA constructs using PEI in 150mM NaCl. 48 hours after
13 transfection, total RNA was directly extracted using Trizol (Invitrogen).
14
15

16
17 Human myoblasts LHCNM2 (34) were grown in KMEM (199 Medium (Life Technologies) and DMEM
18 (Life Technologies) in a 1:4 ratio - supplemented with 20% fetal calf serum (Life Technologies), 5
19 ng/ml human epithelial growth factor (Life Technologies), 0.5ng/ml bFGF, 0.2µM dexamethasone
20 (Sigma-Aldrich), 50µg/ml fetuin (Life Technologies) and 5µg/ml insulin (Life Technologies) in a 5%
21 CO₂ incubator at 37°C. Differentiation was induced at confluence by replacing the growth medium
22 with DMEM supplemented with 50 µg/ml of gentamycin. Transfections in human myoblasts were
23 performed with Fugene HD (Promega) following manufacturer's instructions and 48 hours after
24 transfection total RNA was directly extracted using Trizol (Invitrogen).
25
26
27

28
29 Primary H2KB IM2 mouse myoblasts (named "control" hereafter) are conditionally immortalized with a
30 temperature-sensitive SV40 large T-antigen (tsA58) transgene and derived from the ImmortoMouse.
31 Mutated-PABPN1 (H2KB-D7e named "Ala17" hereafter) and wild-type-PABPN1 (H2KB-WTa named
32 "Ala10") stable cells lines were derived from IM2 cells line by transfection of a plasmid expressing
33 expanded-PABPN1 or wild-type-PABPN1 respectively under the control of the human desmin locus
34 control region and promoter to ensure myotube-specific expression of the human PABPN1 transgene
35 (35). Cells were cultivated on matrigel coated support (Corning) in DMEM, supplemented with 20%
36 fetal bovine serum (Invitrogen), 0.5% chicken embryo extract (Seralab), 100U/ml penicillin-
37 streptomycin (Thermo Scientific), and 20 U/ml interferon- γ (Millipore) at 33° C in a humidified 5%
38 CO₂ air atmosphere. For Ala17 and Ala10 cell lines, 500µg/ml of G418 is added to the media.
39 Differentiation was induced - when cells were fully confluent (90-100%) - by changing medium to
40 DMEM, 10% horse serum and 100U/ml penicillin-streptomycin at 37°C in a humidified 5% CO₂ air
41 atmosphere.
42
43
44
45
46

47
48 siRNA transfection was performed in HEK293T using PEI in 150 mM NaCl with 100pmol of siRNA
49 with 2 µg of plasmid in a 6 well plates. All siRNA were synthesized by Eurogentec. The control siRNA
50 was against Renilla luciferase (PGL3) from Eurogentec. RNA and proteins were collected 48 hours
51 after transfection. For H2KB cells, siRNA transfection was performed using oligofectamine (Life
52 Technologies) according to manufacturer's instructions in 12 wells plate at 60pmol final of siRNA.
53 siRNA treatment in H2KB cells was performed twice at 48 hours interval before switching to
54 differentiation medium. RNA and protein extractions were performed 5 days later.
55
56
57
58
59
60

Mice

A17.1 and A10.1 transgenic mice have been previously described (36,37). Male A17.1, A10.1 mice and wild-type FvB (WT) controls were generated by crossing the heterozygous carrier strain A17.1 and A10.1 obtained from Rubinsztein's group (36) with the FvB background mice. The mice were genotyped by PCR three to four weeks after birth. Wild type FvB, A10.1 and A17.1 mice were housed in minimal disease facilities (Royal Holloway, University of London) with food and water *ad libitum*.

Isometric tension determination

T/pCa relationships were established as previously described (38).

Skinning protocol: Muscles were chemically skinned by exposure overnight at 4°C to a skinning solution containing 10 mM MOPS, 170 mM potassium propionate, 2.5 mM magnesium acetate, 5 mM K₂ EGTA, 2.5 mM ATP (38). This procedure permeabilizes the sarcolemmal and transverse tubular membranes and allowed the application of activating solutions of various calcium and strontium concentrations (pCa and pSr, with pCa = $-\log[\text{Ca}^{2+}]$ and pSr = $-\log[\text{Sr}^{2+}]$) directly to the contractile proteins. The skinned biopsies were stored at -20°C in storage solution (glycerol/skinning solution, 50/50, v/v) until analysis.

Solutions: The composition of all solutions was calculated according to Fabiato computer program (39). Different solutions were used in the experiments: a washing solution (10 mM MOPS, 185 mM potassium propionate, 2.5 mM magnesium acetate); a relaxing solution identical to the skinning solution; pCa and pSr activating solutions corresponding to washing solution added to various concentrations of free Ca²⁺ or Sr²⁺ from CaCO₃ or SrCl₂, respectively, buffered with EGTA and added in proportions to obtain the different pCa values (7.0 to 4.2) or pSr values (5.0 and 3.4). ATP was added to each solution to bring a final concentration of 2.5 mM. At the beginning of the experiment, each fiber was bathed for 20 min in 2% Brij58 in relaxing solution, in order to irreversibly eliminate the ability of the sarcoplasmic reticulum of skinned muscles to sequester and release Ca²⁺.

Force measurements and effect of O-GlcNAcase inhibitors on calcium properties: A 5 mm fibre segment isolated from skinned biopsies was mounted in an experimental chamber. On one end, the fiber was connected to a strain-gauge (force transducer Fort 10, World Precision Instruments). The output of the force transducer was amplified and recorded on a graph recorder (Gould. model 6120) and simultaneously analysed by computer software.

At the beginning of each experiment, the fibre was activated with the pSr 5.0 solution, followed by the pSr 3.4 solution, to verify that the tested fibre was slow and not fast. After washing solution, the fiber was activated at a level P with various pCa solutions (from 7.0 to 4.8, with a step equal to 0.2 pCa units). Each steady state submaximal tension P was followed immediately by a maximum contraction Po ensured by pCa 4.2 solution, a calcium concentration that will saturate all troponin C sites. The tensions P were expressed as a percentage of the maximal tension Po, and reported as Tension/pCa (T/pCa) relationships. Finally, the fibre was relaxed in the relaxing solution.

1
2
3 If force declined during a sustained contraction or decreased by more than 20% during the whole
4 experiment, or if T/pCa was not completely achieved, the fibres were rejected from analysis. Just after
5 force measurements, each fibre was resuspended in 10 μ l of Laemmli buffer, and stored at -20°C until
6 analysis.
7

8
9 The following parameters were determined from T/pCa curves: the pCa₅₀ value,
10 corresponding to 50% of maximal Ca²⁺ tension responses, which characterize the affinity of the
11 contractile apparatus for Ca²⁺; the threshold for activation by Ca²⁺ (pCa threshold) as an indicator of
12 the calcium sensitivity of the contractile system; and the steepness of the T/pCa reflecting the
13 cooperativity between the different regulatory proteins within the thin filament. The steepness of the
14 T/pCa was determined by the Hill coefficients n_H, calculated according to the following equation: P/Po
15 = $\frac{([Ca^{2+}]/K)^{n_H}}{1 + ([Ca^{2+}]/K)^{n_H}}$, where P/Po is the normalized tension and K is the apparent
16 dissociation constant (pK = -log K = pCa₅₀). All parameters were established independently for each
17 fibre. Data were presented as means \pm SEM. Differences between means were considered significant
18 when $p < 0.05$, according to Student's *t* test.
19
20
21
22

23 24 **Immunodetection of PABPN1 inclusions on muscle sections**

25
26 PABPN1 nuclear aggregates immunostaining was performed as previously described (40). Briefly,
27 muscle sections (5 or 10 μ m) were fixed in 100% cold acetone and pre-incubated in 1M Potassium
28 chloride (KCl) solution for 1 hour to remove any soluble proteins, before incubation with rabbit
29 polyclonal anti-PABPN1 (1/100, Epitomics) and anti-dystrophin antibody (1/10, NCL-Dys1,
30 Novocastra). Sections were further incubated with respective fluorescent secondary antibodies (Life
31 Technologies) and stained with Hoechst (Sigma-Aldrich) to visualize nuclei. The percentage of
32 muscle fibre nuclei containing PABPN1 aggregates was determined by counting the number of nuclei
33 containing any PABPN1 staining compared to the total number of myonuclei on the section.
34
35
36

37 38 **PABPN1/SC35 immunostaining**

39
40 H2KB cells were cultivated on Ibidi 35mm Dish (Biovalley). Immunofluorescence was performed at 5
41 day of differentiation. Cells were washed once with PBS and fixed 10 min with paraformaldehyde 4%-
42 PBS during 10min. Cells were washed with PBS-glycine 0.1M for 15 min and incubated in PBS-triton
43 0.2%, BSA 3% with goat serum 5% during 30 min. Detection of immunocomplexes was performed
44 using anti-PABPN1 (1/100, Epitomics) and anti-SC35 (1/1000, Sigma) for one hour. Cells were
45 washed 3 times in PBS triton 0.1% and incubated with secondary antibody conjugated to Alexa Fluor
46 488 goat anti-mouse and Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit (Life Technologies).
47
48
49

50 51 **Fluorescence in situ hybridization**

52
53 The RNA fluorescence in situ hybridization (FISH) was performed using probes synthesized by PCR
54 with specific primers (one probe for exon 18 and 3 probes for intron 15, see details in **Suppl. Table 2**)
55 using the Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) with a ratio of 1/6 of DIG-
56 dUTP/dTTP (Roche) and murine Tnnt3 expressing vector as template. PCR products were loaded on
57
58
59
60

1
2
3 agarose gels and purified using the Nucleospin and PCR clean-up kit (Macherey-Nagel).

4
5 HEK293T cells were transfected with murine Tnnt3 minigene expressing vector or with pCDNA3.1
6 using PEI (2.5 µg of DNA constructs using PEI in 50mM NaCl). 48h after transfection, cells were fixed
7 during 10 min in PFA 4%, rinsed with PBS. Cells were incubated with PBS 1% triton X-100 during 30
8 min and rinsed 3 times with PBS. The probe was denatured at 95°C during 10 min and put directly on
9 ice. Cells were then incubated with hybridization buffer (SSC2X, 40% formamide, 0.2% BSA, 60ng of
10 yeast RNA) together with 60ng of Tnnt3 probe at 60°C during 2 hours. Then cells were washed with
11 PBS 0.1% tween 20 buffer during 30 min at 65°C and 3 times with PBS. This was followed by an
12 incubation in PBS 2% SVF during 30 min and with anti-digoxigenin-Rhodamine Fab Fragments
13 (Roche diagnostics) during 1 hour in the dark. Cells were washed 3 times in PBS and stained with
14 Hoescht, (Sigma Aldrich) to visualize nuclei. All experiments were performed in RNase free conditions.

15
16
17
18
19
20 H2KB cells (Ala17 and control) were differentiated during 5 days on Ibidi 35mm Dish (Biovalley) and
21 fixed during 10 min in PFA 4%, rinsed with PBS. Cells were incubated with PBS 1% triton X-100
22 during 30 min and rinsed 3 times with PBS. Cells were incubated with pre-hybridization buffer
23 (SSC2X, 40% formamide, 0.2% BSA) during 30 min. The probe was denatured at 95°C during 10 min
24 and put directly on ice. Cells were then incubated with hybridization buffer (SSC2X, 40%
25 formamide, 0.2% BSA, 60ng of yeast RNA) together with 60ng of TNNT3 probe at 60°C during 2
26 hours. Then cell were washed with prehybridization buffer during 30 min at 65°C and 3 times with
27 PBS 0.1% tween 20 and 3 times with PBS.

28
29
30
31
32 This was followed by an immunofluorescence against PABPN1. Briefly, cells were incubated in PBS 2%
33 SVF during 30 min and with PABPN1 primary antibody (Euromedex) and SC35 antibody (Sigma) in
34 the same buffer during 2 hours at room temperature. Cell were washed 3 times with PBS and
35 incubated with the secondary antibodies Alexa Fluor 488 and Alexa fluor 647 goat anti-mouse (Life
36 technology) and anti-digoxigenin-Rhodamine Fab Fragments (Roche diagnostics) during one hour in
37 the dark. Cells were stained with Hoescht, (Sigma Aldrich) to visualize nuclei. All experiments were
38 performed in RNase free condition.

41 42 **Western Blotting**

43
44 Proteins were extracted by sonicating cells in RIPA buffer NaCl 0.15M, 0.1% SDS, 50 mM Tris (pH8),
45 2 mM EDTA and 10% Triton-X-100 with protease inhibitor cocktail (Complete, Roche Diagnostics).
46 Similar quantities of proteins were separated on 4-12% Bis-Tris gel (Invitrogen) and transferred onto a
47 nitrocellulose membrane for 1 hour at 30V constant at 4°C. Membranes were blocked by incubation in
48 5% milk or BSA in 0.1M TBS, 0.1% Tween-20 for 1 hour at room temperature under agitation.
49 Membranes were stained with primary antibodies raised against PABPN1 (1/1000, Abcam), SC35
50 (1/1000, Millipore), SRP30a (1/1000, Santa-Cruz), MBNL1 (1/1000, MB1a antibody, gift from Glenn
51 Morris), Flag-HRP (1/1000, Sigma) and GAPDH-HRP (1/1000, Abcam). Membranes were then
52 incubated with appropriate secondary antibodies conjugated to HRP (except for Flag-HRP and
53 GAPDH-HRP) and the G:Box system (Syngene) was used to detect the signals from the membranes.

Image acquisition and analysis

Images were visualized using an Olympus BX60 microscope (Olympus Optical, Hamburg, Germany), digitalised using a CCD camera (Photometrics CoolSNAP fx; Roper Scientific) and analyzed using MetaView image analysis system (Universal Imaging, Downington, PA), MetaMorph imaging system (Roper Scientific, Tucson, AZ, USA) software, and ImageJ 1.44o (<http://imagej.nih.gov/ij>) for quantification analysis.

Statistical Analysis

All data are presented as mean values \pm standard error of the mean (SEM) (cohort size stated per experiment). All statistical analyses were performed using either the Student t-test, or the ANOVA one-way analysis of variance followed by the Bonferroni post-test, using GraphPad Prism (version 4.0b; GraphPad Software, San Diego California, USA). A difference was considered to be significant at $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) or $P < 0.001$ (***)

RESULTS

***TNNT3* exon 16 is downregulated in OPMD**

To identify potential splicing defects in OPMD, we performed a genome-wide transcriptomic analysis at the exon level on RNA extracted from skeletal muscle biopsies of OPMD patients (**table 1**). For this study we used sternocleidomastoid muscles as a pre-symptomatic muscle, that show both a typical clinical phenotype and a significant amount of nuclear aggregates compared to age-matched control subjects (**fig.1A**). A list of 46 missplicing events was found from 39 distinct genes, including 12 cassette exon defects (**suppl. Table 1 and Suppl. fig.1A**). Among them the most significantly deregulated mRNA (highest splicing fold change index) incidentally encodes a muscle-specific protein, the human Troponin T type 3 (*TNNT3*) (**Table 2**). The *TNNT3* transcript contains 18 exons; its pre-mRNA is extensively spliced with two mutually exclusive exons 16 (alpha) and 17 (beta) included at the 3' end (41-43) (**fig.1B**). Exon 16 was found to be downregulated in OPMD samples (**Suppl. fig.1A**), in turn leading to an imbalanced ratio of these mutually exclusive exons. This was confirmed by RT-PCR on sternocleidomastoid and quadriceps muscle biopsies from OPMD patients, with a strong decrease in the level of the exon 16 isoform expression (**fig.1C-D**). Splicing defects of *RECK* exon 8 (Reversion-Inducing-Cysteine-Rich Protein With Kazal Motifs) and *ZCCHC11* exon 8 (Zinc Finger CCHC Domain-Containing Protein 11 or TUT4) - respectively hits number 2 and 3 on the exon array analysis (**Table 2 and Suppl. fig.1A**) - were also confirmed by qRT-PCR on SCM muscle biopsies (**Suppl. fig.1B**). This is the first time that misregulated alternative splicing events have been described in OPMD.

***TNNT3* splicing defect is linked to the presence of aggregates**

We then checked the splicing pattern of *Tnnt3* in a murine cell model of OPMD, namely the H2KB-D7e cells (35). Primary H2KB-IM2 cells are conditionally immortalized mouse myoblasts derived from the ImmortoMouse (44) and H2KB-D7e cells are stably derived from H2KB-IM2 cells line by transduction with an expanded Flag-tagged PABPN1 construct under the control of the human desmin locus control region and promoter. This ensures expression of the human expPABPN1 transgene in differentiation conditions (**Suppl. fig.2A**). For clarity, the H2KB-IM2 and -D7e will be called hereafter "control" and "Ala17" muscle cells respectively. In differentiation conditions, these Ala17 cells contain a large number of nuclear aggregates present in more than 50% of the nuclei ((35) and **fig.2E**). In control cells, the *Tnnt3* exon 16 isoform was absent at day 1, but progressively increased with differentiation. Interestingly, in Ala17 cells at both 3 and 5 days of differentiation, the same splicing defect detected in human OPMD samples was observed, demonstrated by a strong decrease in the level of the *Tnnt3* exon 16 isoform compared to control cells (**fig.2A-B**). Since the *Tnnt3* exon 16 isoform expression increases with differentiation we verified that the splicing defect in Ala17 cells was not due to a delay in differentiation. Light microscopy visualization showed a comparable number of fused myoblasts in control and OPMD cell lines at 5 days of differentiation (**Suppl. fig.2B**). In addition, myogenin and myosin expression levels were equivalent in both Ala17 and control cells during the time course of differentiation (day 1, 3 and 5). We also checked the

1
2
3 alternative splicing of Bin1 exon 10, which is known to be regulated during muscle differentiation (45)
4 and the splicing pattern was similar in both conditions, further confirming that the differentiation
5 kinetics were similar in control and Ala17 cells (**Suppl. fig.2C**). To understand the link between
6 PABPN1 nuclear aggregates and the splicing defect, we reduced PABPN1 expression in
7 differentiated Ala17 cells using RNA interference. The reduction of PABPN1 expression by 50% at
8 mRNA and protein level (**fig.2C-D**) drastically reduced the percentage of nuclei containing nuclear
9 aggregates from 60 to 10% (**fig.2E**). This led to the rescue of the splicing defect in differentiated
10 siRNA-treated Ala17 cells (**fig.2F**). Several hypotheses have been made regarding the role of
11 PABPN1 aggregates in the pathogenesis of the disease, one of them being the sequestration of
12 PABPN1 itself, leading to a loss of function. Transfection of siRNA against PABPN1 in control cells -
13 to mimic a loss of function- did not modify the level of exon 16 isoform (**fig.2F**) neither did the addition
14 of a wild-type functional PABPN1 expressing vector in Ala17 cells (**data not shown**), suggesting that
15 TNNT3 splicing defect is not linked to the level of available PABPN1 itself. Altogether these results
16 strongly suggest a direct link between the presence of nuclear aggregates and the splicing
17 misregulation of *TNNT3*.
18
19
20
21
22
23

24 **SC35 splicing factor regulates *TNNT3* mutually exclusive exons**

25
26 To determine which splicing factor is involved in the regulation of *TNNT3* mutually exclusive exons, a
27 minigene containing exons 16 and 17 of human *TNNT3* bordered by exon 15, 18 and their intronic
28 regions (**fig.3A**) was cloned from human genomic DNA in a plasmid expressing vector. This minigene
29 construct was co-transfected in HEK293T cells - which do not express *TNNT3* - together with various
30 vectors expressing well-characterized splicing regulatory factors. These included members of the
31 hnRNP, SR, MBNL and CELF families and were selected using prediction software (SpliceAid2 and
32 ESEFinder publicly available at http://193.206.120.249/splicing_tissue.html and
33 <http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/ese finder.cgi?process=home> respectively) (46,47) (**table 3**).
34 Fifteen selected splicing factors were tested by co-transfection with the *TNNT3* minigene expressing
35 vector. GFP was used to monitor expression and transfection efficiency (**Suppl. fig.3A**), and we
36 further confirmed by western-blot the overexpression in HEK293T cells for several of them (**fig.3D**
37 **and Suppl. fig.3B**). Among the 15 splicing factors, only the co-expression of SC35 (also called
38 SRSF2) or hnRNPK together with the *TNNT3* minigene expressing vector induced a significant
39 increase in exon 16 inclusion (**fig.3B**). As the splicing defect is present in both human and murine
40 OPMD samples (**fig.1C-D and fig.2A**), the same approach was applied using a mouse *Tnnt3* exon
41 15-18 minigene expressing vector. In this situation, only the co-transfection of SC35 expressing
42 vector significantly modified the inclusion of exon 16 (**fig.3C**). Finally in human myoblasts, only the
43 transfection of SC35 expressing vector led to the upregulation of the exon 16 isoform when co-
44 transfected with the human *TNNT3* minigene expressing vector (**fig.3E**), confirming SC35 as the most
45 probable splicing factor candidate for regulating exon 16 inclusion. Among serine/arginine-rich
46 proteins, SC35 is a well-known constituent of nuclear speckles (48) involved in pre-mRNA splicing
47 (49). The transfection of SC35 results in an upregulated exon 16 isoform, which is downregulated in
48 OPMD patients or cells. Although the level of SC35 itself is not downregulated in OPMD samples
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 when compared to control samples (**fig.3F**), downregulation of the exon 16 isoform could be
4 mimicked by depletion of SC35 expression level using RNA interference in HEK293T cells transfected
5 with the *TNNT3* minigene (**fig.3G-I**), whereas for example the downregulation of SRP30a (ASF/SF2,
6 a splicing factor related to SC35 (50)) or MBNL1 (which regulates the splicing of *TNNT3* fetal exon
7 (51,52)) by RNA interference did not recapitulate this splicing defect found in OPMD or in SC35-
8 knockdown cells (**Suppl. fig.3C-D**). These results demonstrate that the splicing regulation of *TNNT3*
9 mutually exclusive last exons is strongly dependent of SC35 and suggest that in OPMD *TNNT3* pre-
10 mRNA and SC35 splicing factor are somehow dissociated.

14 ***TNNT3* pre-mRNA is trapped in nuclear aggregates**

15
16
17 Aggregates are formed by PABPN1 accumulation in muscle nuclei. Interestingly, it is already known
18 that these PABPN1 aggregates are delocalized from SC35-nuclear speckles (17,53) (35). By
19 immunostaining we confirmed the delocalization of PABPN1 aggregates and SC35 nuclear splicing
20 domains in differentiated Ala17 OPMD as opposed to the co-localization of PABPN1 and SC35
21 observed in control cells (**fig.4A and Suppl. fig.4A**). A recent study proposed that growing PABPN1
22 aggregates gradually deplete SC35-nuclear speckles of poly(A) RNA/PABPN1 complexes, thus
23 interfering with the normal trafficking and post-transcriptional processing of poly(A) mRNA in speckles
24 (53). We took advantage of the Ala17 cells where *Tnnt3* splicing defect and nuclear aggregates are
25 both present and we analysed the localization of *Tnnt3* pre-mRNA in these cells, by performing
26 fluorescent in situ hybridization (FISH). Using probes targeting specifically exon 18 (ex18) or intron 15
27 (int15) of *Tnnt3* pre-mRNA (**suppl. fig.5**), we observed a colocalization of *Tnnt3* pre-mRNA with
28 PABPN1 in nuclear aggregates (**fig.4B-C and suppl. fig 4B**). Hence the pre-mRNA of *Tnnt3* is
29 physically delocalized from SC35-speckles. Therefore we speculated that the splicing defect is a
30 consequence of the spatial dissociation of SC35 and *Tnnt3* pre-mRNA, the latter being trapped in
31 PABPN1 aggregates.

32 **Calcium sensitivity is decreased in slow fibers of OPMD muscles**

33
34
35 *TNNT3* pre-mRNA is intensively spliced and finely regulated; abundance in the ratio of the different
36 isoforms is suggested to participate to muscle plasticity (43). To investigate the physiopathological
37 consequences of this splicing defect, we used a mouse model of OPMD, the A17.1 mouse. This
38 model is generated by the expression of alanine expanded mammalian PABPN1 (PABPN1-17ala)
39 specifically in muscles; it reproduces the disease characteristics, namely progressive muscle
40 weakness and formation of nuclear aggregates containing mutant PABPN1 in muscles (36,37).
41 Interestingly, we found the same splicing defect in the soleus muscle of this A17.1 OPMD mouse
42 model (**fig.5A**), where nuclear aggregates are present (**fig.5B**), whereas this splicing defect was
43 absent in the soleus of the control A10.1 mouse (overexpressing wild-type PABPN1 (36)), where
44 nuclear aggregates are absent (**suppl. fig.6**). These data strengthen the claim of a direct link
45 between the splicing defect and the presence of aggregate. *TNNT3* is a subunit of the trimeric
46 troponin complex, which regulates skeletal muscle contraction in response to calcium (54). *In vitro*
47 assays with recombinant proteins already demonstrated that a difference in the ratio of isoforms
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 including exon 16 or 17 led to alterations in muscle fibre calcium affinity, a key parameter involved in
4 the modulation of force contraction (55,56). Indeed, while numerous reports demonstrated the
5 predominant role of the calcium sensor Troponin C of the troponin complex in the modulation of
6 calcium sensitivity and affinity, it has been clearly established that TNNT3 isoform could be involved
7 in the modulation of these mechanisms as well (57). We took advantages of the soleus of the A17.1
8 mouse, which presents the unbalanced ratio of *Tnnt3* mutually exclusive exons. We established
9 pCa/tension relationship in order to analyse whether activation parameters of muscle fibre tension by
10 calcium could be altered in OPMD muscles. The Tension/pCa relationship performed on isolated
11 skinned fibres from murine soleus muscles revealed a decrease in calcium affinity of slow OPMD
12 fibres compared to slow control fibres (pCa of 5.85 ± 0.04 and 6.02 ± 0.04 respectively, $P < 0.05$)
13 (fig.5C). This decrease in calcium affinity can be clearly related to the expression of exon 17
14 containing isoform instead of exon 16 isoform, since previous data revealed that *Tnnt3* exon 17
15 containing isoform presented lower calcium affinity than exon 16 (55). Our data demonstrate a
16 functional consequence - i.e decrease in calcium affinity - of the decrease in exon 16 *Tnnt3* isoform in
17 slow fibres, which are predominant in humans.
18
19
20
21
22
23
24
25
26

27 DISCUSSION

28
29 PABPN1 is an ubiquitous polyadenylation factor that binds virtually all mRNAs and is involved in
30 several mRNA processes such as addition and regulation of the poly (A) tail at the 3' end of mRNA,
31 nuclear export, polyA site selection, control of several coding and non coding RNA surveillance
32 pathways (1). PABPN1 contains a polyalanine stretch, shortly expanded in OPMD. Polyalanine
33 sequences are present in around 1.5% of human proteins, and abnormal alanine expansions have
34 been implicated in many neurodegenerative and neurological diseases (58,59). Among them, the
35 molecular mechanisms underlying the pathogenesis of OPMD remain largely undetermined.
36 Apoptosis and deregulation of the ubiquitin-proteasome system have been proposed as downstream
37 events (18,60). We recently demonstrated a global deregulation of nuclear-encoded mitochondrial
38 RNA, implicating mRNA poly(A) tail regulation via the recruitment of Smaug RNA binding protein (61).
39 OPMD is characterised by the presence of PABPN1 insoluble nuclear aggregates in muscle fibres.
40 However the exact role and contribution of these aggregates in OPMD is still debated (1). Several
41 studies have suggested a pathological function for nuclear aggregates e.g. by sequestering essential
42 cellular components including PABPN1 itself (15,16,20). Moreover, a higher frequency of nuclear
43 aggregates is present in severe homozygous patients (62) and an improved muscle function is
44 observed when the amount of aggregates is reduced (36,63,64). In contrast, other studies have
45 suggested that the aggregates may just be the result of a cellular defence mechanism and not the
46 direct cause of the disease, the soluble form of the mutated PABPN1 being itself pathogenic (65,66).
47 Our results clearly illustrate that PABPN1 nuclear aggregates have at least a toxic function as they
48 lead to specific splicing defects. Poly(A) RNA were previously observed in PABPN1 nuclear
49 aggregates using oligo-dT probes (16,17,53), here we additionally demonstrate that PABPN1 nuclear
50 aggregates are able to sequester a pre-mRNA leading to its missplicing. Whether this muscle-specific
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 RNA plays a role as a potential scaffold for aggregate formation – as suggested by others (17) -
4 remains to be further investigated.

5
6 Nuclear speckles are essential nuclear compartments involved in post-transcriptional processing of
7 mRNA. These nuclear structures are enriched in poly(A) RNA, in many pre-mRNA splicing factors
8 including snRNP (small nuclear ribonucleoprotein particles) and SR splicing factors such as SC35
9 (67). PABPN1 is found in nucleoplasm excluding nucleolus and concentrated mostly to nuclear
10 speckles where it participates to mRNA metabolism. This localization of PABPN1 in nuclear speckles
11 requires the binding to poly(A) RNA, in contrast to splicing factors which assemble into speckles in the
12 absence of newly synthesized transcripts (17,66,68,69). Previous studies have shown that PABPN1
13 nuclear aggregates take birth at the edge of the speckles and gradually delocalize outside of these
14 compartments, together with a gradual depletion of poly(A) RNA from speckles (17,53). It has been
15 suggested that Pab2 (fission yeast ortholog of mammalian PABPN1) associates with pre-mRNA co-
16 transcriptionally prior to 3'end processing/polyadenylation (70). In addition, pre-mRNA introns located
17 at the 3'end of multiple intron transcripts are more frequently spliced post-transcriptionally,
18 presumably because transcription termination and cleavage at the polyadenylation site occur before
19 the splicing machinery manages to catalyse their removal (71). It is well established that the different
20 steps of pre-mRNA processing (5' cap, splicing, 3'end processing) are connected and influence each
21 other (72,73). The splicing defect that we identified is at the 3'end of the *TNNT3* pre-mRNA and we
22 propose that during the processing of *TNNT3* pre-mRNA, the binding of PABPN1 to its 3'end for
23 further cleavage and polyadenylation induces, in the case of OPMD, a gradual delocalization of the
24 complex pre-mRNA/PABPN1 from SC35-nuclear speckles. This delocalization induces a missplicing
25 of the last exons of *TNNT3* with the production of a modified protein that has a negative effect on
26 muscle contraction. Indeed, the imbalanced ratio of *TNNT3* exon 16 and 17 induced a decrease in
27 calcium sensitivity with physiopathological consequences at the level of the muscle fibre (see **fig.6** as
28 a molecular model). Similar findings regarding alanine repeats and subnuclear protein localization
29 have been recently observed with the RNA-binding motif protein 4 (RBM4) (74). Alternative splicing
30 defects have previously been observed in other trinucleotide repeat disorders including myotonic
31 dystrophy (30). However, this is the first time that a splicing defect, with a misregulation of mutually
32 exclusive last exons of the muscle specific *TNNT3* mRNA, has been identified in OPMD. In
33 spliceopathies described so far, alternative splicing misregulation is in most cases due to an abnormal
34 activity of an RNA splicing factor, for example functional loss of MBNL proteins due to their
35 sequestration by nuclear mutant RNA in myotonic dystrophy (75). This abnormal activity often results
36 from splicing factors misplaced from their natural location within the cell, highlighting the importance
37 of the intracellular mRNA and splicing factors spatial distribution. We describe here a different
38 mechanism directly linked to the presence of nuclear aggregates: the splicing defect is due to the
39 spatial separation of the deregulated RNA from its splicing factor. Although the generic nature of this
40 alternative mechanism remains to be demonstrated, it may play a role in various other diseases with
41 nuclear inclusions or foci containing an RNA binding protein, as shown here for OPMD.
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ACKNOWLEDGEMENT

We are grateful to D. Auboeuf, D. Weil and N. Charlet-Berguerand for their gifts of splicing factor expressing vectors. We thank I. Behm for the ASF/SF2 antibody and N. Vignier for qPCR primers. We thank Glenn Morris at the Centre for Inherited Neuromuscular Disease for supplying antibody Mb1a to detect MBNL1. We thank J. Marie for fruitful discussion and careful reading of the manuscript. We thank N. Beltchenko for the construction of the mouse Tntt3 minigene and Elisa Negroni for image processing. The authors acknowledge the OPMD patients for their collaboration.

FUNDING

This work was supported by the Centre National pour la Recherche Scientifique, the Association Française contre les Myopathies [Research Programs 15123 and 17110], the University Paris VI Pierre et Marie Curie, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Fondation de l'Avenir [project ET1-622]. PK has a salary from the Ministère de l'Éducation Nationale de la Recherche et de Technologie.

REFERENCES

1. Banerjee, A., Apponi, L.H., Pavlath, G.K. and Corbett, A.H. (2013) PABPN1: molecular function and muscle disease. *FEBS J*, **280**, 4230-4250.
2. Eckmann, C.R., Rammelt, C. and Wahle, E. (2011) Control of poly(A) tail length. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, **2**, 348-361.
3. Apponi, L.H., Leung, S.W., Williams, K.R., Valentini, S.R., Corbett, A.H. and Pavlath, G.K. (2009) Loss of nuclear poly(A)-binding protein 1 (PABPN1) causes defects in myogenesis and mRNA biogenesis. *Hum Mol Genet*.
4. Benoit, B., Mitou, G., Chartier, A., Temme, C., Zaessinger, S., Wahle, E., Busseau, I. and Simonelig, M. (2005) An essential cytoplasmic function for the nuclear poly(A) binding protein, PABP2, in poly(A) tail length control and early development in *Drosophila*. *Dev Cell*, **9**, 511-522.
5. de Klerk, E., Venema, A., Anvar, S.Y., Goeman, J.J., Hu, O., Trollet, C., Dickson, G., den Dunnen, J.T., van der Maarel, S.M., Raz, V. *et al.* (2012) Poly(A) binding protein nuclear 1 levels affect alternative polyadenylation. *Nucleic Acids Res*.
6. Jenal, M., Elkon, R., Loayza-Puch, F., van Haaften, G., Kuhn, U., Menzies, F.M., Vrieling, J.A., Bos, A.J., Drost, J., Rooijers, K. *et al.* (2012) The poly(a)-binding protein nuclear 1 suppresses alternative cleavage and polyadenylation sites. *Cell*, **149**, 538-553.
7. Nguyen, D., Grenier St-Sauveur, V., Bergeron, D., Dupuis-Sandoval, F., Scott, M.S. and Bachand, F. (2015) A Polyadenylation-Dependent 3' End Maturation Pathway Is Required for the Synthesis of the Human Telomerase RNA. *Cell Rep*, **13**, 2244-2257.
8. Beaulieu, Y.B., Kleinman, C.L., Landry-Voyer, A.M., Majewski, J. and Bachand, F. (2012) Polyadenylation-dependent control of long noncoding RNA expression by the poly(A)-binding protein nuclear 1. *PLoS Genet*, **8**, e1003078.
9. Bresson, S.M. and Conrad, N.K. (2013) The human nuclear poly(a)-binding protein promotes RNA hyperadenylation and decay. *PLoS Genet*, **9**, e1003893.
10. Brais, B., Bouchard, J.P., Xie, Y.G., Rochefort, D.L., Chretien, N., Tome, F.M., Lafreniere, R.G., Rommens, J.M., Uyama, E., Nohira, O. *et al.* (1998) Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nat Genet*, **18**, 164-167.

- 1
- 2
- 3 11. Trollet, C., Gidaro, T., Klein, P., Perie, S., Butler-Browne, G. and Lacau St Guily, J. (1993)
- 4 Oculopharyngeal Muscular Dystrophy.
- 5 12. Lopez Castel, A., Cleary, J.D. and Pearson, C.E. (2010) Repeat instability as the basis for
- 6 human diseases and as a potential target for therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **11**, 165-170.
- 7 13. Galka-Marciniak, P., Urbanek, M.O. and Krzyzosiak, W.J. (2012) Triplet repeats in transcripts:
- 8 structural insights into RNA toxicity. *Biol Chem*, **393**, 1299-1315.
- 9 14. Tome, F.M. and Fardeau, M. (1980) Nuclear inclusions in oculopharyngeal dystrophy. *Acta*
- 10 *Neuropathol*, **49**, 85-87.
- 11 15. Corbeil-Girard, L.P., Klein, A.F., Sasseville, A.M., Lavoie, H., Dicaire, M.J., Saint-Denis, A., Page,
- 12 M., Duranceau, A., Codere, F., Bouchard, J.P. *et al.* (2005) PABPN1 overexpression leads to
- 13 upregulation of genes encoding nuclear proteins that are sequestered in oculopharyngeal
- 14 muscular dystrophy nuclear inclusions. *Neurobiol Dis*, **18**, 551-567.
- 15 16. Calado, A., Tome, F.M., Brais, B., Rouleau, G.A., Kuhn, U., Wahle, E. and Carmo-Fonseca, M.
- 16 (2000) Nuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy consist of poly(A) binding
- 17 protein 2 aggregates which sequester poly(A) RNA. *Hum Mol Genet*, **9**, 2321-2328.
- 18 17. Tavanez, J.P., Calado, P., Braga, J., Lafarga, M. and Carmo-Fonseca, M. (2005) In vivo
- 19 aggregation properties of the nuclear poly(A)-binding protein PABPN1. *Rna*, **11**, 752-762.
- 20 18. Anvar, S.Y., t Hoen, P.A., Venema, A., van der Sluijs, B., van Engelen, B., Snoeck, M., Vissing,
- 21 J., Trollet, C., Dickson, G., Chartier, A. *et al.* (2011) Deregulation of the ubiquitin-proteasome
- 22 system is the predominant molecular pathology in OPMD animal models and patients. *Skelet*
- 23 *Muscle*, **1**, 15.
- 24 19. Raz, V., Buijze, H., Raz, Y., Verwey, N., Anvar, S.Y., Aartsma-Rus, A. and van der Maarel, S.M.
- 25 (2014) A novel feed-forward loop between ARIH2 E3-ligase and PABPN1 regulates aging-
- 26 associated muscle degeneration. *Am J Pathol*, **184**, 1119-1131.
- 27 20. Fan, X., Messaed, C., Dion, P., Laganriere, J., Brais, B., Karpati, G. and Rouleau, G.A. (2003)
- 28 HnRNP A1 and A/B interaction with PABPN1 in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Can J*
- 29 *Neurol Sci*, **30**, 244-251.
- 30 21. Bergeron, D., Pal, G., Beaulieu, Y.B., Chabot, B. and Bachand, F. (2015) Regulated Intron
- 31 Retention and Nuclear Pre-mRNA Decay Contribute to PABPN1 Autoregulation. *Mol Cell Biol*,
- 32 **35**, 2503-2517.
- 33 22. Muniz, L., Davidson, L. and West, S. (2015) Poly(A) Polymerase and the Nuclear Poly(A)
- 34 Binding Protein, PABPN1, Coordinate the Splicing and Degradation of a Subset of Human
- 35 Pre-mRNAs. *Mol Cell Biol*, **35**, 2218-2230.
- 36 23. Nilsen, T.W. and Graveley, B.R. (2010) Expansion of the eukaryotic proteome by alternative
- 37 splicing. *Nature*, **463**, 457-463.
- 38 24. Wang, E., Aslanzadeh, V., Papa, F., Zhu, H., de la Grange, P. and Cambi, F. (2012) Global
- 39 profiling of alternative splicing events and gene expression regulated by hnRNPH/F. *PLoS*
- 40 *One*, **7**, e51266.
- 41 25. Wang, G.S. and Cooper, T.A. (2007) Splicing in disease: disruption of the splicing code and
- 42 the decoding machinery. *Nat Rev Genet*, **8**, 749-761.
- 43 26. Pan, Q., Shai, O., Lee, L.J., Frey, B.J. and Blencowe, B.J. (2008) Deep surveying of alternative
- 44 splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet*,
- 45 **40**, 1413-1415.
- 46 27. Castle, J.C., Zhang, C., Shah, J.K., Kulkarni, A.V., Kalsotra, A., Cooper, T.A. and Johnson, J.M.
- 47 (2008) Expression of 24,426 human alternative splicing events and predicted cis regulation in
- 48 48 tissues and cell lines. *Nat Genet*, **40**, 1416-1425.
- 49 28. Wang, E.T., Sandberg, R., Luo, S., Khrebtkova, I., Zhang, L., Mayr, C., Kingsmore, S.F.,
- 50 Schroth, G.P. and Burge, C.B. (2008) Alternative isoform regulation in human tissue
- 51 transcriptomes. *Nature*, **456**, 470-476.
- 52 29. Pistoni, M., Ghigna, C. and Gabellini, D. (2010) Alternative splicing and muscular dystrophy.
- 53 *RNA Biol*, **7**, 441-452.
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60

- 1
2
3 30. Nakamori, M., Sobczak, K., Puwanant, A., Welle, S., Eichinger, K., Pandya, S., Dekdebrun, J.,
4 Heatwole, C.R., McDermott, M.P., Chen, T. *et al.* (2013) Splicing biomarkers of disease
5 severity in myotonic dystrophy. *Ann Neurol*.
- 6 31. de la Grange, P., Dutertre, M., Martin, N. and Auboeuf, D. (2005) FAST DB: a website
7 resource for the study of the expression regulation of human gene products. *Nucleic Acids*
8 *Res*, **33**, 4276-4284.
- 9 32. Gandoura, S., Weiss, E., Rautou, P.E., Fasseu, M., Gustot, T., Lemoine, F., Hurtado-Nedelec,
10 M., Hego, C., Vadrot, N., Elkrief, L. *et al.* (2013) Gene- and exon-expression profiling reveals
11 an extensive LPS-induced response in immune cells in patients with cirrhosis. *J Hepatol*, **58**,
12 936-948.
- 13 33. de la Grange, P., Dutertre, M., Correa, M. and Auboeuf, D. (2007) A new advance in
14 alternative splicing databases: from catalogue to detailed analysis of regulation of
15 expression and function of human alternative splicing variants. *BMC Bioinformatics*, **8**, 180.
- 16 34. Mamchaoui, K., Trollet, C., Bigot, A., Negroni, E., Chaouch, S., Wolff, A., Kandalla, P.K., Marie,
17 S., Di Santo, J., St Guily, J.L. *et al.* (2011) Immortalized pathological human myoblasts:
18 towards a universal tool for the study of neuromuscular disorders. *Skelet Muscle*, **1**, 34.
- 19 35. Raz, V., Routledge, S., Venema, A., Buijze, H., van der Wal, E., Anvar, S., Straasheijm, K.R.,
20 Klooster, R., Antoniou, M. and van der Maarel, S.M. (2011) Modeling oculopharyngeal
21 muscular dystrophy in myotube cultures reveals reduced accumulation of soluble mutant
22 PABPN1 protein. *Am J Pathol*, **179**, 1988-2000.
- 23 36. Davies, J.E., Wang, L., Garcia-Oroz, L., Cook, L.J., Vacher, C., O'Donovan, D.G. and Rubinsztein,
24 D.C. (2005) Doxycycline attenuates and delays toxicity of the oculopharyngeal muscular
25 dystrophy mutation in transgenic mice. *Nat Med*, **11**, 672-677.
- 26 37. Trollet, C., Anvar, S.Y., Venema, A., Hargreaves, I.P., Foster, K., Vignaud, A., Ferry, A., Negroni,
27 E., Hourde, C., Baraibar, M.A. *et al.* (2010) Molecular and phenotypic characterization of a
28 mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy reveals severe muscular atrophy
29 restricted to fast glycolytic fibres. *Hum Mol Genet*, **19**, 2191-2207.
- 30 38. Mounier, Y., Holy, X. and Stevens, L. (1989) Compared properties of the contractile system of
31 skinned slow and fast rat muscle fibres. *Pflugers Arch*, **415**, 136-141.
- 32 39. Fabiato, A. (1988) Computer programs for calculating total from specified free or free from
33 specified total ionic concentrations in aqueous solutions containing multiple metals and
34 ligands. *Methods Enzymol*, **157**, 378-417.
- 35 40. Gidaro, T., Negroni, E., Perie, S., Mirabella, M., Laine, J., Lacau St Guily, J., Butler-Browne, G.,
36 Mouly, V. and Trollet, C. (2013) Atrophy, Fibrosis, and Increased PAX7-Positive Cells in
37 Pharyngeal Muscles of Oculopharyngeal Muscular Dystrophy Patients. *J Neuropathol Exp*
38 *Neurol*, **72**, 234-243.
- 39 41. Breitbart, R.E. and Nadal-Ginard, B. (1987) Developmentally induced, muscle-specific trans
40 factors control the differential splicing of alternative and constitutive troponin T exons. *Cell*,
41 **49**, 793-803.
- 42 42. Breitbart, R.E., Nguyen, H.T., Medford, R.M., Destree, A.T., Mahdavi, V. and Nadal-Ginard, B.
43 (1985) Intricate combinatorial patterns of exon splicing generate multiple regulated troponin
44 T isoforms from a single gene. *Cell*, **41**, 67-82.
- 45 43. Schilder, R.J., Kimball, S.R. and Jefferson, L.S. (2013) Cell-autonomous regulation of fast
46 troponin T pre-mRNA alternative splicing in response to mechanical stretch. *Am J Physiol Cell*
47 *Physiol*, **303**, C298-307.
- 48 44. Jat, P.S., Noble, M.D., Ataliotis, P., Tanaka, Y., Yannoutsos, N., Larsen, L. and Kioussis, D.
49 (1991) Direct derivation of conditionally immortal cell lines from an H-2Kb-tsA58 transgenic
50 mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 5096-5100.
- 51 45. Wechsler-Reya, R.J., Elliott, K.J. and Prendergast, G.C. (1998) A role for the putative tumor
52 suppressor Bin1 in muscle cell differentiation. *Mol Cell Biol*, **18**, 566-575.
- 53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 46. Piva, F., Giulietti, M., Burini, A.B. and Principato, G. (2012) SpliceAid 2: a database of human
4 splicing factors expression data and RNA target motifs. *Hum Mutat*, **33**, 81-85.
- 5 47. Cartegni, L., Wang, J., Zhu, Z., Zhang, M.Q. and Krainer, A.R. (2003) ESEfinder: A web
6 resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res*, **31**, 3568-3571.
- 7 48. Spector, D.L., Fu, X.D. and Maniatis, T. (1991) Associations between distinct pre-mRNA
8 splicing components and the cell nucleus. *EMBO J*, **10**, 3467-3481.
- 9 49. Fu, X.D. (1993) Specific commitment of different pre-mRNAs to splicing by single SR proteins.
10 *Nature*, **365**, 82-85.
- 11 50. Wang, J. and Manley, J.L. (1995) Overexpression of the SR proteins ASF/SF2 and SC35
12 influences alternative splicing in vivo in diverse ways. *RNA*, **1**, 335-346.
- 13 51. Kanadia, R.N., Johnstone, K.A., Mankodi, A., Lungu, C., Thornton, C.A., Esson, D., Timmers,
14 A.M., Hauswirth, W.W. and Swanson, M.S. (2003) A muscleblind knockout model for
15 myotonic dystrophy. *Science*, **302**, 1978-1980.
- 16 52. Kanadia, R.N., Shin, J., Yuan, Y., Beattie, S.G., Wheeler, T.M., Thornton, C.A. and Swanson,
17 M.S. (2006) Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscleblind overexpression in a
18 mouse poly(CUG) model for myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 11748-11753.
- 19 53. Bengoechea, R., Tapia, O., Casafont, I., Berciano, J., Lafarga, M. and Berciano, M.T. (2012)
20 Nuclear speckles are involved in nuclear aggregation of PABPN1 and in the pathophysiology
21 of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neurobiol Dis*, **46**, 118-129.
- 22 54. Perry, S.V. (1998) Troponin T: genetics, properties and function. *J Muscle Res Cell Motil*, **19**,
23 575-602.
- 24 55. Chaudhuri, T., Mukherjea, M., Sachdev, S., Randall, J.D. and Sarkar, S. (2005) Role of the fetal
25 and alpha/beta exons in the function of fast skeletal troponin T isoforms: correlation with
26 altered Ca²⁺ regulation associated with development. *J Mol Biol*, **352**, 58-71.
- 27 56. Schilder, R.J., Kimball, S.R. and Jefferson, L.S. (2012) Cell-autonomous regulation of fast
28 troponin T pre-mRNA alternative splicing in response to mechanical stretch. *Am J Physiol Cell
29 Physiol*, **303**, C298-307.
- 30 57. Gordon, A.M., Homsher, E. and Regnier, M. (2000) Regulation of contraction in striated
31 muscle. *Physiol Rev*, **80**, 853-924.
- 32 58. Lavoie, H., Debeane, F., Trinh, Q.D., Turcotte, J.F., Corbeil-Girard, L.P., Dicaire, M.J., Saint-
33 Denis, A., Page, M., Rouleau, G.A. and Brais, B. (2003) Polymorphism, shared functions and
34 convergent evolution of genes with sequences coding for polyalanine domains. *Hum Mol
35 Genet*, **12**, 2967-2979.
- 36 59. Brown, L.Y. and Brown, S.A. (2004) Alanine tracts: the expanding story of human illness and
37 trinucleotide repeats. *Trends Genet*, **20**, 51-58.
- 38 60. Davies, J.E. and Rubinsztein, D.C. (2011) Over-expression of BCL2 rescues muscle weakness
39 in a mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*, **20**, 1154-1163.
- 40 61. Chartier, A., Klein, P., Pierson, S., Barbezier, N., Gidaro, T., Casas, F., Carberry, S., Dowling, P.,
41 Maynadier, L., Bellec, M. *et al.* (2015) Mitochondrial dysfunction reveals the role of mRNA
42 poly(A) tail regulation in oculopharyngeal muscular dystrophy pathogenesis. *PLoS Genet*, **11**,
43 e1005092.
- 44 62. Blumen, S.C., Brais, B., Korczyn, A.D., Medinsky, S., Chapman, J., Asherov, A., Nisipeanu, P.,
45 Codere, F., Bouchard, J.P., Fardeau, M. *et al.* (1999) Homozygotes for oculopharyngeal
46 muscular dystrophy have a severe form of the disease. *Ann Neurol*, **46**, 115-118.
- 47 63. Davies, J.E., Sarkar, S. and Rubinsztein, D.C. (2006) Trehalose reduces aggregate formation
48 and delays pathology in a transgenic mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy.
49 *Hum Mol Genet*, **15**, 23-31.
- 50 64. Chartier, A., Raz, V., Sterrenburg, E., Verrips, C.T., van der Maarel, S.M. and Simonelig, M.
51 (2009) Prevention of oculopharyngeal muscular dystrophy by muscular expression of Llama
52 single-chain intrabodies in vivo. *Hum Mol Genet*, **18**, 1849-1859.
- 53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
65. Catoire, H., Pasco, M.Y., Abu-Baker, A., Holbert, S., Tourette, C., Brais, B., Rouleau, G.A., Parker, J.A. and Neri, C. (2008) Sirtuin inhibition protects from the polyalanine muscular dystrophy protein PABPN1. *Hum Mol Genet*, **17**, 2108-2117.
 66. Messaed, C., Dion, P.A., Abu-Baker, A., Rochefort, D., Laganieri, J., Brais, B. and Rouleau, G.A. (2007) Soluble expanded PABPN1 promotes cell death in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neurobiol Dis*, **26**, 546-557.
 67. Lamond, A.I. and Spector, D.L. (2003) Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 605-612.
 68. Calado, A. and Carmo-Fonseca, M. (2000) Localization of poly(A)-binding protein 2 (PABP2) in nuclear speckles is independent of import into the nucleus and requires binding to poly(A) RNA. *J Cell Sci*, **113** (Pt 12), 2309-2318.
 69. Calado, A., Kutay, U., Kuhn, U., Wahle, E. and Carmo-Fonseca, M. (2000) Deciphering the cellular pathway for transport of poly(A)-binding protein II. *Rna*, **6**, 245-256.
 70. Lemieux, C. and Bachand, F. (2009) Cotranscriptional recruitment of the nuclear poly(A)-binding protein Pab2 to nascent transcripts and association with translating mRNPs. *Nucleic Acids Res*, **37**, 3418-3430.
 71. Girard, C., Will, C.L., Peng, J., Makarov, E.M., Kastner, B., Lemm, I., Urlaub, H., Hartmuth, K. and Luhrmann, R. (2012) Post-transcriptional spliceosomes are retained in nuclear speckles until splicing completion. *Nat Commun*, **3**, 994.
 72. Proudfoot, N.J. (2011) Ending the message: poly(A) signals then and now. *Genes Dev*, **25**, 1770-1782.
 73. Proudfoot, N.J., Furger, A. and Dye, M.J. (2002) Integrating mRNA processing with transcription. *Cell*, **108**, 501-512.
 74. Chang, S.H., Chang, W.L., Lu, C.C. and Tarn, W.Y. (2014) Alanine repeats influence protein localization in splicing speckles and paraspeckles. *Nucleic Acids Res*, **42**, 13788-13798.
 75. Miller, J.W., Urbinati, C.R., Teng-Umnuay, P., Stenberg, M.G., Byrne, B.J., Thornton, C.A. and Swanson, M.S. (2000) Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy. *EMBO J*, **19**, 4439-4448.

TABLE AND FIGURES LEGENDS

Table 1. Skeletal muscle biopsies from control and aged-matched OPMD patients (n=4 per group) were used for the study. M: male; F: female.

patient	age	gender	genotype
OPMD	54	M	(GCN)9/Ala9
OPMD	61	F	(GCN)10/Ala10
OPMD	81	M	(GCN)8/Ala8
OPMD	83	M	(GCN)9/Ala9
CTRL	44	F	
CTRL	61	M	
CTRL	88	M	
CTRL	91	M	

Table 2. Splicing defects are present in oculopharyngeal muscular dystrophy including alteration of *TNNT3* alternative splicing of exon 16 and 17. Exon array revealed several splicing events, including

12 cassette exon events. *TNNT3* was the first hit on the array with the highest splicing fold change index. A manual inspection allowed the filtering and classification of exons predicted to be differentially included.

GENE STABLE ID	Gene Symbol	Fold-Change Splicing Index	P-Value Splicing Index	Confidence
GSHG0004534	TNNT3	3,55	1,03E-02	+++
GSHG0030112	RECK	2,12	2,03E-02	+++
GSHG0002105	ZCCHC11	2,17	1,42E-02	++
GSHG0008422	SPG20	2,09	1,80E-02	++
GSHG0030642	RFX3	2,07	3,70E-02	++
GSHG0008586	UGGT2	2,04	4,80E-02	++
GSHG0008374	USP12	2,53	1,41E-02	+
GSHG0017444	SMC6	2,49	7,97E-04	+
GSHG0022278	ABCC5	2,33	3,04E-02	+
GSHG0031771	WDR44	2,24	1,24E-02	+
GSHG0007569	STAC3	2,15	4,80E-02	+
GSHG0023986	SLC30A5	2,26	1,66E-02	+

Table 3. List of splicing factors (SF) able to regulate exon 16 and 17 of *TNNT3* pre-mRNA using prediction sites. Splicing enhancers are in blue and splicing silencers are in red.

Name	SF Symbol	TNNT3_e16	TNNT3_e17	Full Name
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein				
HNRNPA1	hnRNP A1			heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
HNRNPH1	hnRNP H1			heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1
HNRNPH2	hnRNP H2			heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2
HNRNPK	hnRNP K			heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
Serine/arginine-rich splicing factor				
SRSF1	SF2, ASF, SRp30a			serine/arginine-rich splicing factor 1
SRSF2	SC35			serine/arginine-rich splicing factor 2
SRSF3	SRp20			serine/arginine-rich splicing factor 3
SRSF5	SRp40			serine/arginine-rich splicing factor 5
SRSF9	SRp30c			serine/arginine-rich splicing factor 9
Muscleblind-like and CUGBP, Elav-like factor				
MBNL1	MBNL1			muscleblind-like splicing regulator 1
CELF1	CUG-BP1, CELF1			CUGBP, Elav-like family member 1
CELF2	CUG-BP2, ETR-3, CELF2			CUGBP, Elav-like family member 2
Other				
NOVA1	Nova-1			neuro-oncological ventral antigen 1
NOVA2	Nova-2			neuro-oncological ventral antigen 2
YB1	YB-1, YBX1			Y box binding protein 1
TIA1	TIA-1			TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein

1
2
3
4
5 **Figure 1. Splicing of *TNNT3* mutually exclusive exons 16 and 17 is deregulated in**
6 **oculopharyngeal muscular dystrophy. (A)** Left: PABPN1 staining following KCl treatment revealed
7 intranuclear aggregates in OPMD muscle biopsies (red: dystrophin, green: PABPN1, blue: dapi).
8 Aggregates are indicated with an arrow. On the bottom right panel, is presented a control biopsy - no
9 aggregate are present. Right: Quantification of nuclear aggregates showed 6.7-16.7% PABPN1
10 aggregates (mean 12%) in myonuclei from OPMD patients. ** indicates P<0.01. **(B)** Schematic
11 representation of the exon structure of *TNNT3* pre-mRNA. pA: polyadenylation site. Exons 16 and 17
12 are highlighted in grey. The two mutually exclusive exons are both 41 bp long encoding each a short
13 14 amino acid peptide in C-terminal of the protein. Arrows on exon 15, 16 and 17 indicate the forward
14 (TNNT3-ex15-FWD) and two reverse (TNNT3-ex16-REV-108 and TNNT3-ex17-REV-131) primers
15 used to amplify and discriminate by PCR the two *TNNT3* transcript isoforms. **(C-D)** *TNNT3* exon 16 is
16 downregulated in OPMD skeletal muscle biopsies with **(C)** Left: RT-PCR analysis of endogenous
17 *TNNT3* exon 16 and 17 isoforms from human sternocleidomastoid skeletal muscle biopsies of normal
18 adult individuals (CTRL; n=4) and OPMD patients (OPMD; n=5). Right: quantification of respective
19 exon 16 and 17 inclusions in *TNNT3* mRNA. ***indicates P<0.001 and **(D)** RT-PCR analysis of
20 endogenous *TNNT3* exon 16 and 17 isoforms from human quadriceps skeletal muscle biopsies of
21 normal adult individuals (CTRL; n=4) and OPMD patients (OPMD; n=2).

22
23
24
25
26
27
28
29
30 **Figure 2. *Tnnt3* splicing defect is rescued by reducing the amount of aggregates in murine**
31 **myoblasts. (A)** *Tnnt3* exon 16 level is downregulated in OPMD murine myoblasts. RT-PCR analysis
32 of endogenous *Tnnt3* exon 16 and 17 isoforms from CTRL and OPMD (Ala17) murine myoblasts after
33 1, 3 and 5 days of differentiation - primary CTRL mouse myoblasts are conditionally immortalized with
34 a temperature-sensitive SV40 large T-antigen (tsA58) transgene and derived from the ImmortoMouse.
35 Mutated-PABPN1 (Ala17) stable cells lines derive from CTRL cells line and express expanded-
36 PABPN1. Below: quantification of respective exon 16 and 17 inclusions in *Tnnt3* mRNA. **(B)** and **(C)**
37 siRNA treatment against PABPN1 (siPAB#1 and siPAB#2) in differentiated Ala17 cells reduce the
38 level of PABPN1 at mRNA level, as shown by quantitative RT-PCR (** indicates P<0.01 compared to
39 siCTRL, transfections are performed in triplicate), and **(D)** at protein level as shown by representative
40 Western blot. **(E)** The amount of nuclear aggregates was drastically reduced by siPAB treatment. The
41 histogram indicates the percentage of nuclei containing PABPN1 aggregates classified based on the
42 number of aggregates per nuclei (1, 2, 3 or more than 3). An average of 100 nuclei in myotubes were
43 counted on random fields. Representative immunofluorescence of nuclei with 0, 1, 2, and more than 3
44 PABPN1 nuclear aggregates. **(F)** Rescue of *Tnnt3* mRNA splicing defect with siRNA against PABPN1
45 (siPAB#1 and #2) compared to a siRNA control (siCTRL) in differentiated Ala17 cells. Quantification
46 of RT-PCR analysis of *Tnnt3* exon 16 (% exon 16) inclusion. NS indicates non statistical, * P<0.05, **
47 P<0.01 compared to the CTRL condition. Transfections are performed in triplicate.

48
49
50
51
52
53
54
55 **Figure 3. SC35 regulates alternative splicing of *TNNT3* exon 16 and 17. (A)** Schematic
56 representation of the human *TNNT3* minigene containing both exons 16 and 17 bordered by exons 15
57 and 18 including full downstream and upstream intronic sequences (sizes are indicated in italic
58
59
60

1
2
3 above). **(B)** and **(C)** SC35 overexpression increases inclusion of *TNNT3* exon 16. Quantification of
4 RT-PCR analysis of *TNNT3* exon 16 (% exon 16) inclusion following respectively human (B) and
5 mouse (C) exons 15-18 minigene expressing vector cotransfection in HEK293T cells together with 15
6 different vectors expressing splicing factors. Histograms represent the mean of at least three
7 independent transfections and are depicted as the percentage of mRNA containing *TNNT3* exon 16.
8 Error bars indicate s.d. and # indicates statistical ANOVA difference compared to the minigene only
9 condition. **(D)** Western-blot showing SC35 overexpression in HEK293T cells transfected with SC35
10 expressing vector fused with GFP compared to untransfected cells. **(E)** SC35 overexpression
11 increases inclusion of *TNNT3* exon 16 in human myoblasts. RT-PCR analysis after transfection of the
12 human *TNNT3* minigene into the human myoblast cell line LHCNM2 together with several splicing
13 factors. **(F)** RT-qPCR on human muscle biopsies demonstrating that the expression level of SC35
14 mRNA is similar in control and OPMD samples. **(G)** Representative Western blot showing SC35
15 extinction in HEK293T cells transfected with siRNA against SC35 compared to HEK293T cells
16 transfected with siRNA CTRL. **(H-I)** SC35 extinction mimics *TNNT3* splicing defect observed in OPMD.
17 RT-PCR analysis of the *TNNT3* minigene cotransfected with a siRNA against SC35 (siSC35#1 and
18 #2), a siRNA against luciferase as a control (siCTRL), or with a plasmid expressing SC35 (+SC35).
19 Quantification of *TNNT3* exon 16 inclusion is presented in **(I)**. *** indicates $P < 0.001$ compared to the
20 siCTRL condition.
21
22
23
24
25
26
27

28
29 **Figure 4. *Tnnt3* pre-mRNA is trapped in PABPN1 aggregates.** **(A)** PABPN1 is localized in SC35-
30 speckles in control condition (Ctrl) and delocalized from SC35-speckles with nuclear aggregates
31 formation in OPMD (Ala17). Immunofluorescence of PABPN1 and SC35 in control (Ctrl) and OPMD
32 (Ala17) H2KB cell lines. **(B-C)** *Tnnt3* pre-mRNA is present in PABPN1 nuclear aggregates – **(B)**
33 Representative image of RNA fluorescence in situ hybridization (FISH) using a Digoxigenin probe
34 targeting exon 18 of *TNNT3* mRNA (red) coupled to immunofluorescence detection of PABPN1
35 (green) and counterstained with Hoechst (blue) on fixed 5-day differentiated Ala17 cells - **(C)** Different
36 representative images of FISH using a probe targeting exon 18 (ex18, left) or intron 15 (int15, right) of
37 *TNNT3* pre-mRNA coupled to immunofluorescence detection of PABPN1 on fixed 5-day differentiated
38 Ala17 cells. Pre-mRNA detection is indicated with white arrows.
39
40
41
42

43 **Figure 5. Splicing defect in OPMD mouse induces decreased calcium sensitivity.** **(A)** *Tnnt3*
44 splicing defect is present in OPMD mouse model. RT-PCR analysis of endogenous *Tnnt3* exon 16
45 and 17 isoforms in soleus muscles of wild-type (WT) and A17.1 (OPMD) mice. **(B)** PABPN1 staining
46 following KCl treatment revealed intranuclear aggregates in the soleus muscle of A17.1 mouse (red:
47 dystrophin, green: PABPN1, blue: dapi), whereas no aggregate are observed in control mice.
48 Aggregates are indicated with an arrow. **(C)** Deregulation of *Tnnt3* exon 16 and 17 induces decreased
49 calcium sensitivity in mice slow fibers, as measured by pCa/Tension relationship. * indicates $P < 0.05$,
50 ** indicates $P < 0.01$.
51
52
53
54

55 **Figure 6. Molecular mechanism of splicing deregulation in OPMD.** Molecular model of *TNNT3*
56 mRNA splicing defect in OPMD: in healthy condition, mutually exclusives exons of *TNNT3* pre-mRNA
57 are regulated by SC35 splicing factor favouring exon 16 inclusion. In OPMD condition, *TNNT3* pre-
58
59
60

1
2
3 mRNA is delocalized from SC35 nuclear speckles by PABPN1 nuclear aggregates trapping resulting
4 in a missplicing of exon 16 and a decreased calcium affinity of muscle fibres.
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

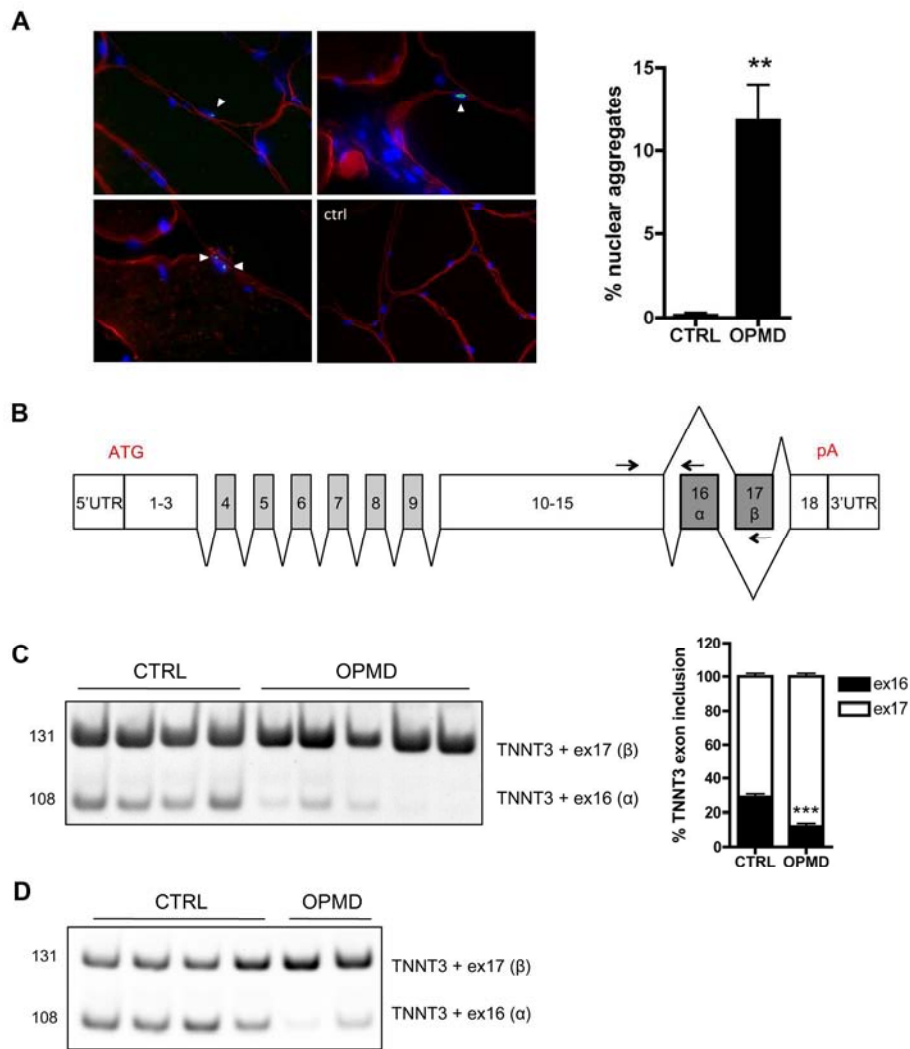


Figure 1

Figure 1
177x230mm (300 x 300 DPI)

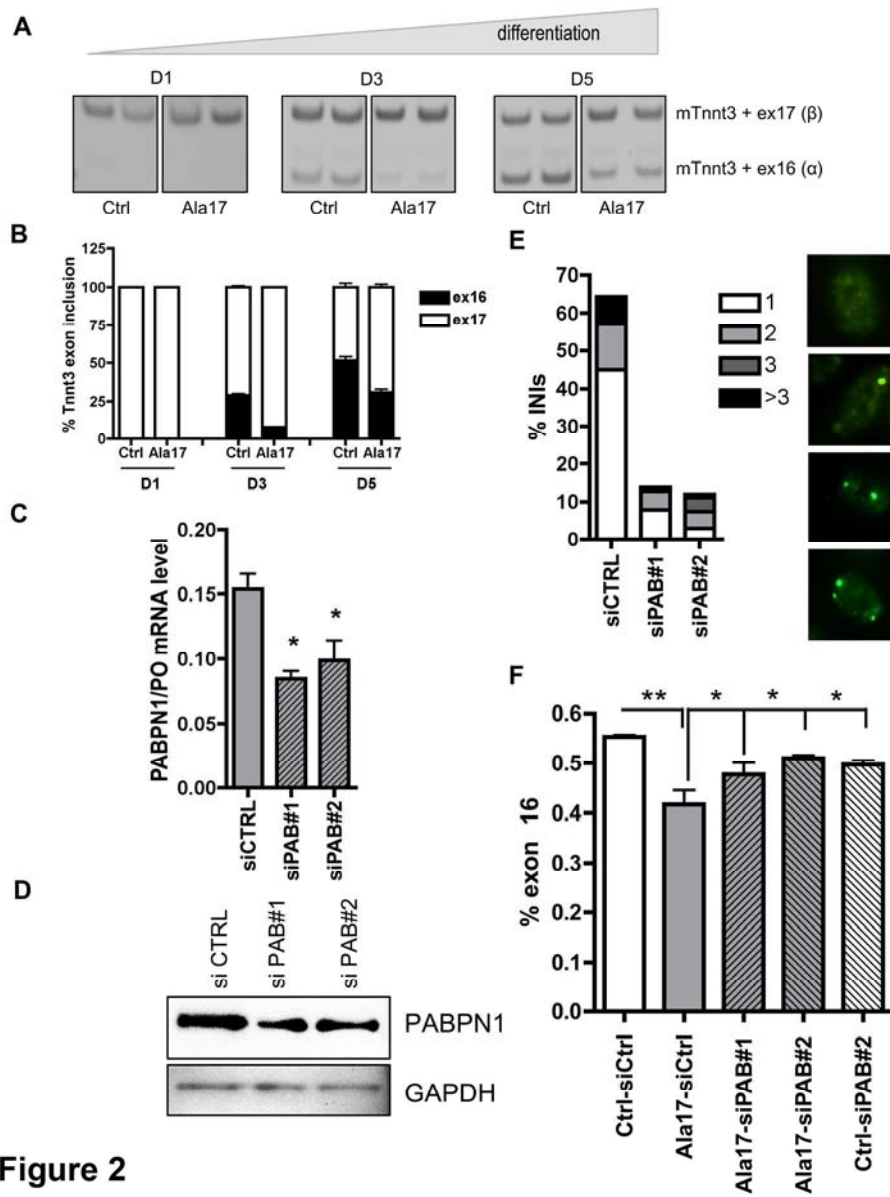


Figure 2

Figure 2
177x230mm (300 x 300 DPI)

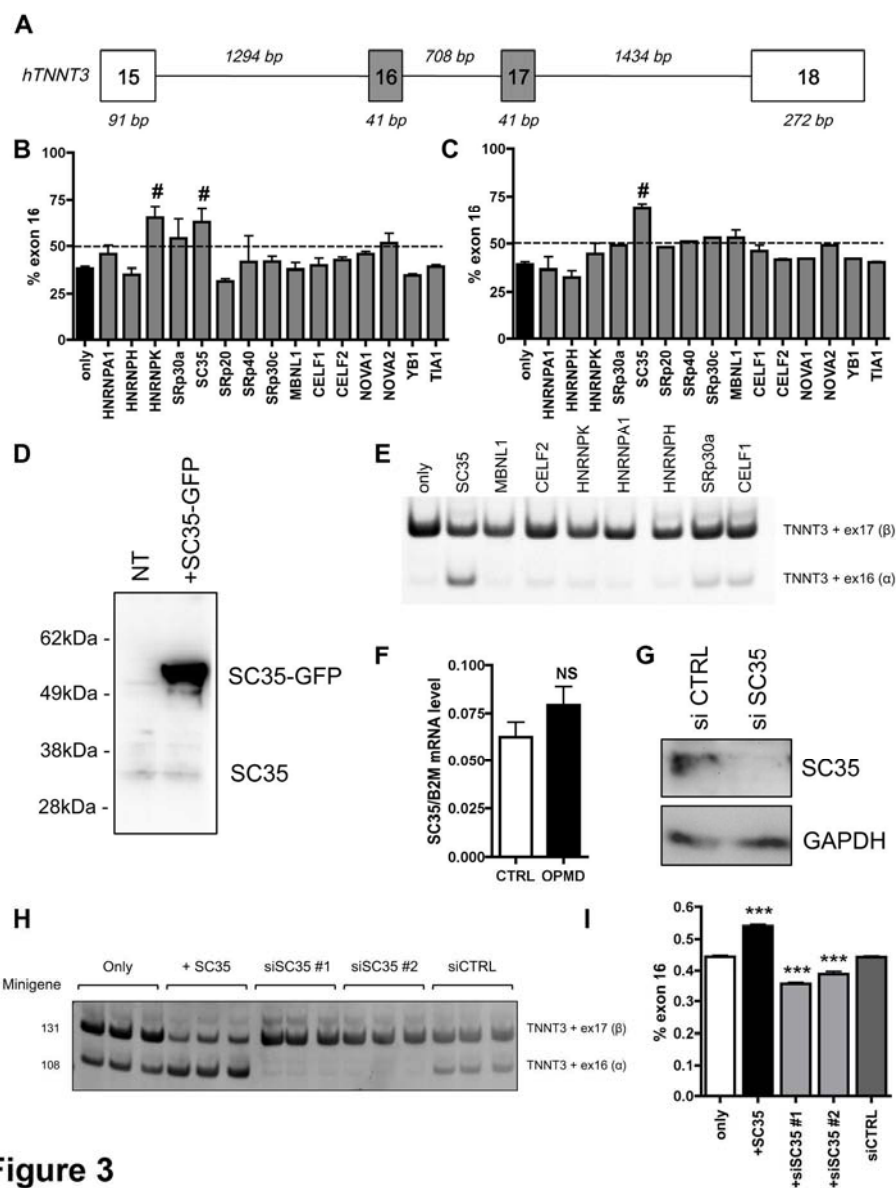


Figure 3

Figure 3
177x230mm (300 x 300 DPI)

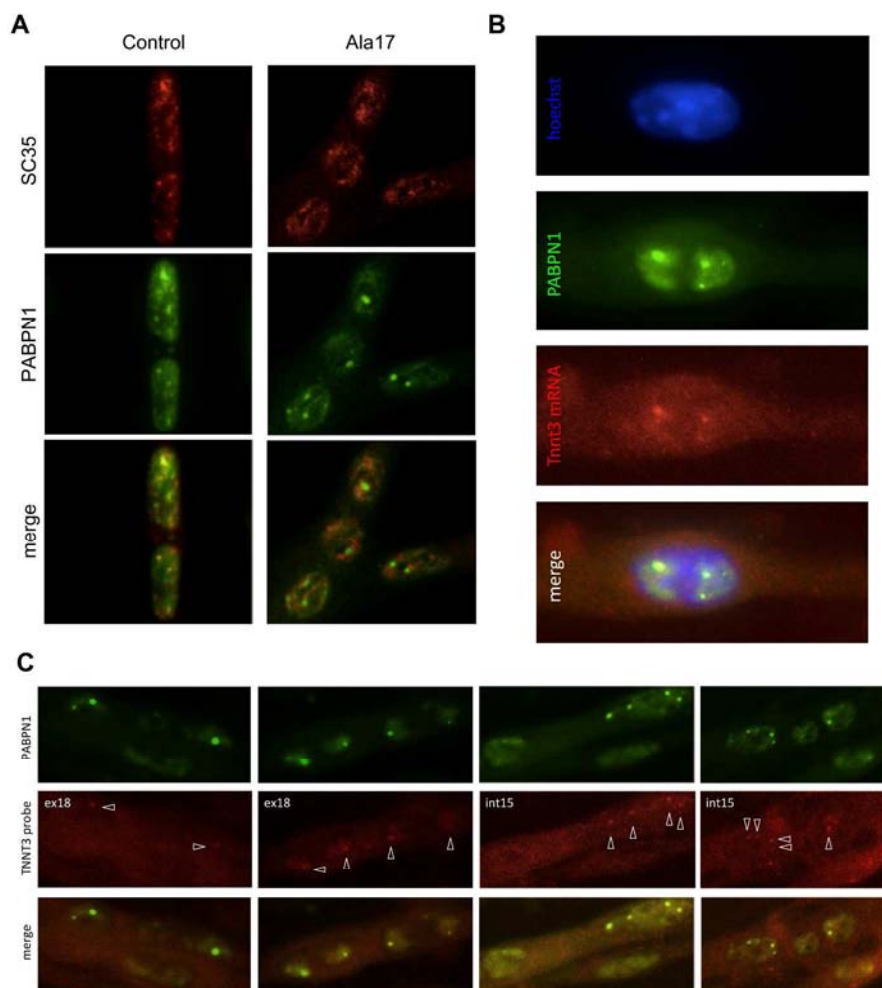


Figure 4

Figure 4
177x230mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

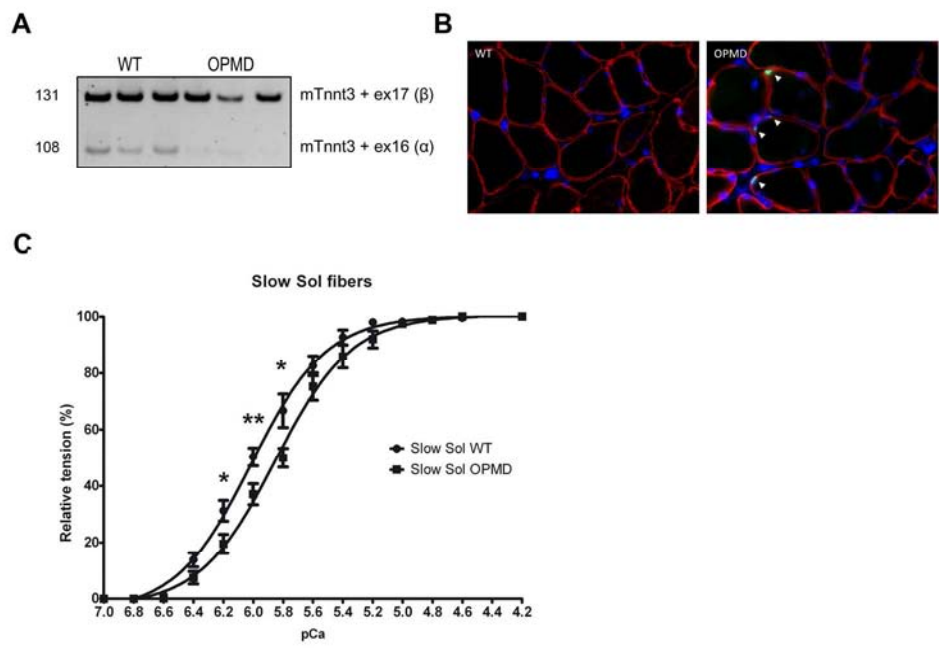


Figure 5

Figure 5
180x138mm (300 x 300 DPI)

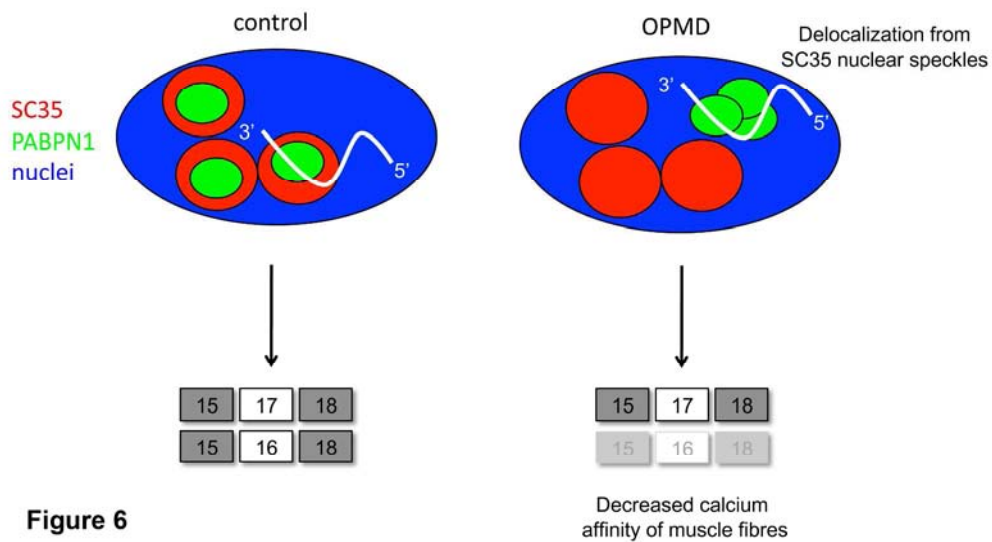


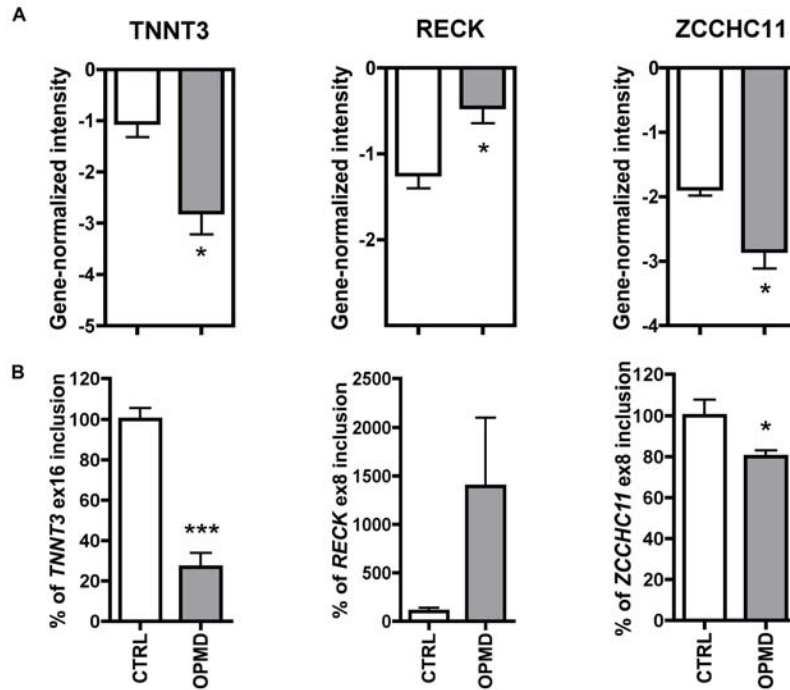
Figure 6

Figure 6
244x134mm (300 x 300 DPI)

SUPPLEMENTARY DATA

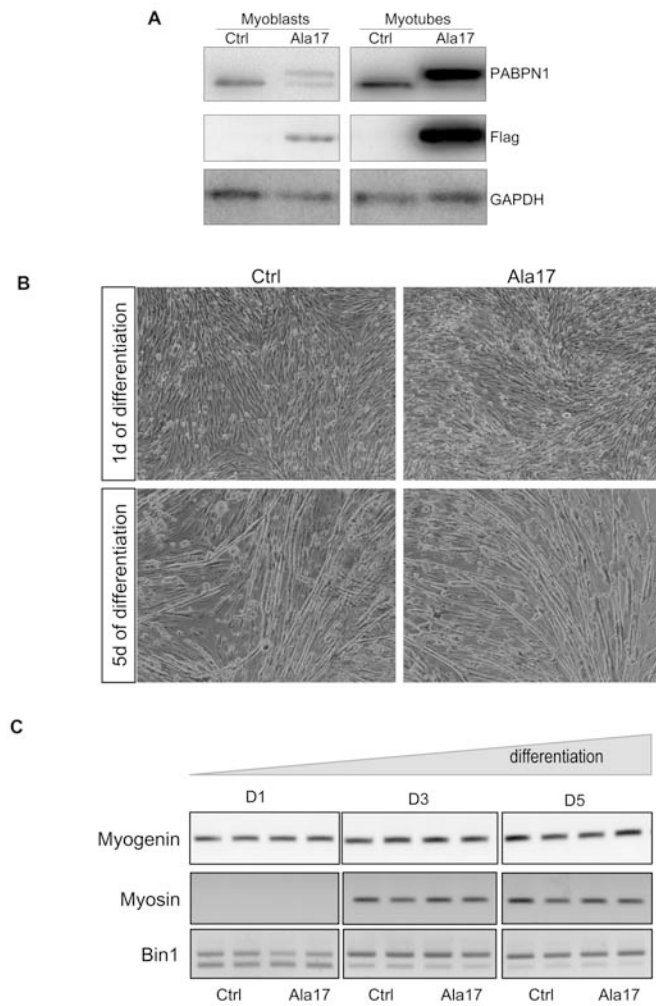
Supplementary Table 1. List of the 46 Differentially Regulated Exons (from 39 Distinct Genes)

Supplementary Table 2. List of primers used in this study



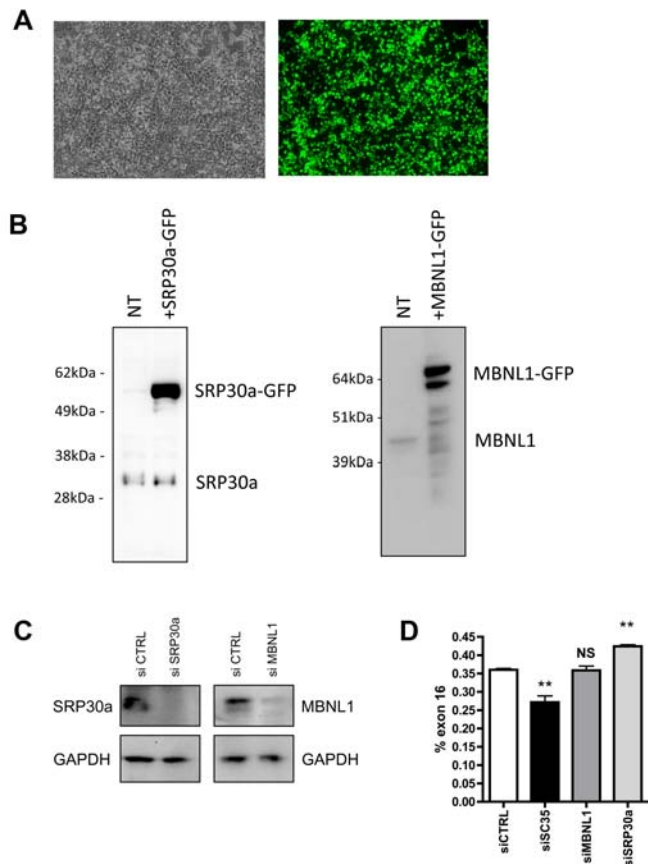
Supplementary figure 1

Supplementary figure 1. Cassette exon splicing defect in OPMD. (A) Gene-normalized intensity of TNNT3 exon 16, RECK exon 8 and ZCCHC11 exon 8 on the exon array. **(B)** RT-qPCR confirmation of *TNNT3*, *RECK* and *ZCCHC11* deregulation in human sternocleidomastoid muscle biopsies of control adult individuals (CTRL; n=3-4) and OPMD patients (OPMD; n=5-7).



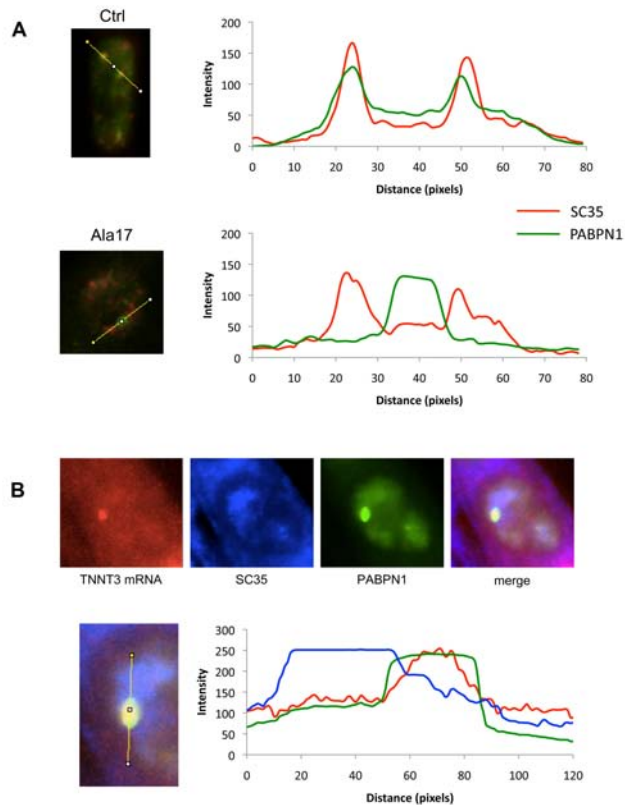
Supplementary figure 2

Supplementary figure 2. Muscle differentiation is not altered in murine cell model of OPMD. (A) Exogenous expPABPN1-Flag is overexpressed in differentiation condition in Ala17 cells. Western blot against PABPN1, Flag and GAPDH in Ctrl and Ala17 cells either in proliferation (myoblasts) or at 5 days of differentiation (myotubes). Exogenous PABPN1-Flag is overexpressed in differentiated condition in Ala17 cells. **(B-C)** Differentiation condition is similar in CTRL and OPMD cell lines. – **(B)** Light fluorescence visualisation of CTRL and Ala17 cells at 1 and 5 days of differentiation - **(C)** RT-PCR analysis at 1, 3 and 5 days of differentiation (D1, D3, D5) showing that the level of two differentiation markers myogenin and myosin mRNA levels are not modified in Ala17 cells compared to control (Ctrl) cells. The splicing inclusion of *Bin1* exon 10 (physiologically enhanced during myoblast differentiation) is comparable in Ala17 and in Ctrl cell lines.



Supplementary figure 3

Supplementary figure 3. Only SC35 splicing factor regulates mutually exclusive exons of *TNNT3* (A) Transfection efficiency is monitored by GFP expression visualization using fluorescent microscope. Example of visualization of HEK293T cells transfected with a splicing factor expressing vector together with GFP reporter gene. (B) Western blot showing the overexpression of SRP30a and MBNL1 splicing factors tagged together with GFP in transfected HEK293T cell compared to untransfected. (C) Western blot against SRP30a, MBNL1 and GFP showing SRP30a and MBNL1 protein extinction in HEK293T cells transfected with corresponding siRNA compared to siCTRL. (D) Quantification of RT-PCR analysis of *TNNT3* exon 16 (% exon 16) inclusion in HEK293T cotransfected with an siRNA against MBNL1, SRP30a or a control siRNA (siCTRL).

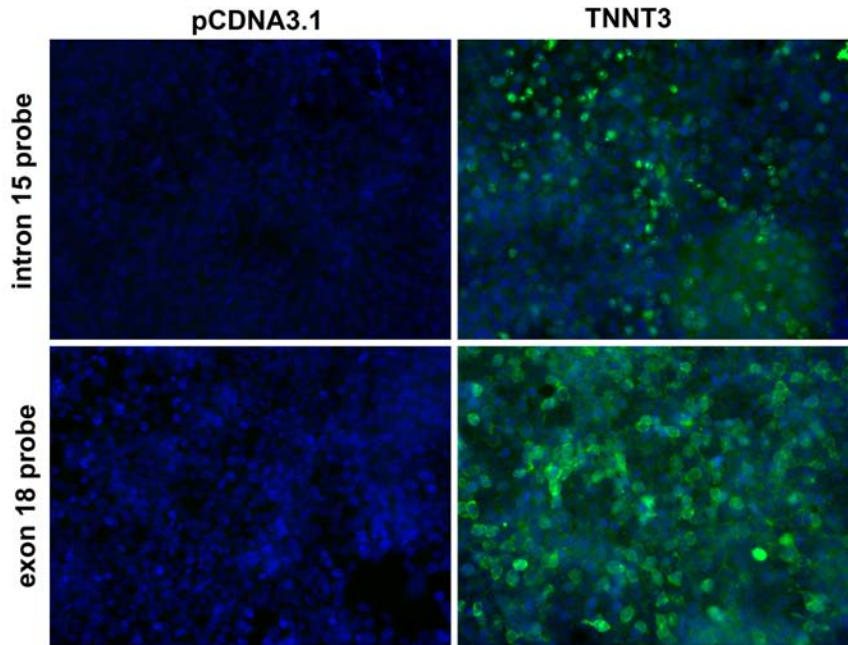


Supplementary figure 4

Supplementary figure 4. Delocalisation of PABPN1 aggregates from SC35 speckles. (A)

Colocalization and delocalization of PABPN1 and SC35 in CTRL and Ala17 cells respectively. The graphs on the right correspond to quantitative measurement with ImageJ of fluorescence intensity along the line indicated in the images on the left with red (SC35) and green (PABPN1). **(B)** TNNT3 mRNA is present in nuclear aggregates excluded from SC35. Top: FISH *Tnnt3* mRNA detection and SC35/PABPN1 co-staining on Ala17 cells. Bottom: Corresponding quantitative measurement of fluorescence intensity (blue: SC35; green: PABPN1; red: *Tnnt3* mRNA).

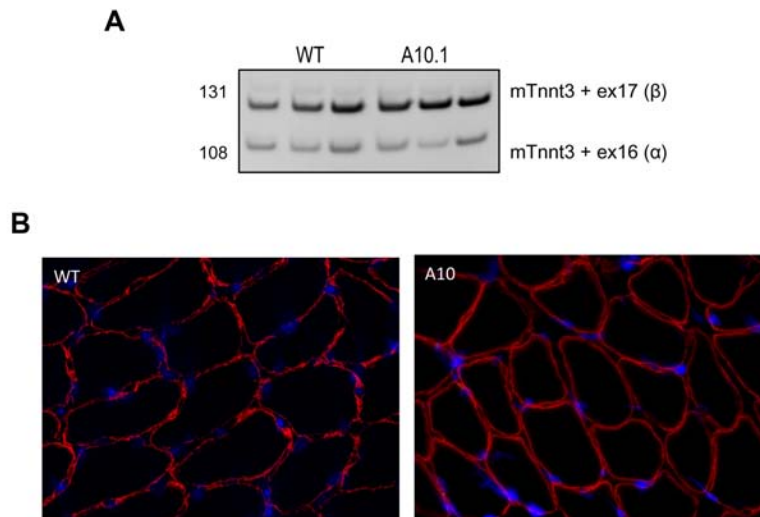
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38

Supplementary figure 5

Supplementary figure 5. Specificity of the probes used. HEK293T cells were either transfected with an empty pCDNA3.1 plasmid or with the *TNNT3* minigene and a FISH was performed with probes targeting intron 15 and exon 18. The positive signal (green) is only observed in the *TNNT3* minigene transfection condition.



Supplementary figure 6

Supplementary figure 6. The splicing defect is absent in the A10.1 mouse. (A) RT-PCR analysis of endogenous *Tnnt3* exon 16 and 17 isoforms from soleus muscles of wild-type (WT) and A10.1 mice. (B) PABPN1 staining following KCl treatment revealed the absence of intranuclear aggregates

1
2
3 in the soleus muscle of A10.1 mice as observed in control mice (WT) (red: dystrophin, green:
4 PABPN1, blue: dapi).
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Suppl. Table 1: List of the 46 Differentially Regulated Exons (from 39 Distinct Genes)

GENE STABLE ID	Detected Exon	Known Alternative Event
GSHG0004534	ex17	exon_skipping
GSHG0011220	ae2	alternative_donor_splice_site
GSHG0018970	e21	unknwon
GSHG0008374	e7	unknwon
GSHG0020732	e4	unknwon
GSHG0017444	e29	unknwon
GSHG0018970	e13	alternative_acceptor_splice_site
GSHG0008251	e8	exon_skipping
GSHG0018970	e17	unknwon
GSHG0029712	e2	alternative_first_exon,exon_skipping
GSHG0022278	e22	unknwon
GSHG0022277	e7	unknwon
GSHG0029116	e4	alternative_last_exon
GSHG0012455	ae14	alternative_acceptor_splice_site
GSHG0000812	ae4	alternative_first_exon
GSHG0023986	e4	alternative_last_exon,exon_skipping
GSHG0031771	e12	unknwon
GSHG0021553	e15	unknwon
GSHG0002105	e8	unknwon
GSHG0007569	e36	unknwon
GSHG0020152	e1	alternative_first_exon
GSHG0012659	e3	unknwon
GSHG0003564	e3	unknwon
GSHG0030112	e8	exon_skipping
GSHG0026684	e5	unknwon
GSHG0004308	e13	alternative_last_exon
GSHG0026650	e8	exon_skipping
GSHG0018970	e19	unknwon
GSHG0008422	e4	exon_skipping
GSHG0017623	e27	unknwon
GSHG0008408	e1	alternative_first_exon
GSHG0000473	e10	unknwon
GSHG0030642	e2	exon_skipping
GSHG0018970	e20	alternative_first_exon
GSHG0008773	e7	alternative_first_exon,exon_skipping
GSHG0025562	e8	alternative_last_exon,exon_skipping
GSHG0018362	ae11	alternative_last_exon
GSHG0000609	e7	unknwon
GSHG0008586	e10	exon_skipping
GSHG0022822	e2	unknwon
GSHG0018357	e27	unknwon
GSHG0018970	e8	unknwon
GSHG0012767	e1	alternative_first_exon
GSHG0031635	e12	unknwon
GSHG0018970	e12	unknwon
GSHG0017623	ae46	alternative_first_exon

s)

Gene Symbol	Regulation Splicing Index	Fold-Change Splicing Index
TNNT3	down	3.55
MT1X	down	3.07
C20orf194	down	2.57
USP12 // USP12P1	down	2.53
NKTR	down	2.50
SMC6	up	2.49
C20orf194	down	2.40
UBAC2	down	2.37
C20orf194	down	2.36
RUNX1T1	up	2.35
ABCC5	down	2.33
---	up	2.30
FABP5	down	2.29
CDK12	up	2.28
DDX20	up	2.27
SLC30A5	down	2.26
WDR44	down	2.24
COLQ // HACL1	down	2.23
ZCCHC11	down	2.17
R3HDM2 // STAC3	down	2.15
---	down	2.15
PCTP	down	2.15
EXOC6	up	2.12
RECK	up	2.12
ICK	down	2.11
ERLIN1	up	2.10
CLIC5	down	2.10
C20orf194	down	2.10
SPG20	up	2.09
PSME4	down	2.08
N4BP2L1	up	2.08
NASP	down	2.08
RFX3	down	2.07
C20orf194	down	2.07
NUBPL	down	2.07
HLA-F	down	2.05
DNPEP	up	2.04
MIER1	down	2.04
UGGT2	up	2.04
KIAA1109	down	2.03
ABCB6 // ATG9A	down	2.03
C20orf194	down	2.02
PRKAR1A	up	2.02
ATP7A	down	2.01
C20orf194	down	2.00
PSME4	down	2.00

P-Value Splicing Index	Gene Coordinates (hg19)
1.03E-02	chr11(+):1957444-1957484
3.34E-02	---
3.11E-02	chr20(-):3295680-3295767
1.41E-02	chr13(-):27649328-27649525
2.70E-03	chr3(+):42660512-42660619
7.97E-04	chr2(-):17864905-17865030
1.94E-02	chr20(-):3306844-3306931
3.18E-03	chr13(+):99960937-99961063
1.15E-02	chr20(-):3302864-3302909
4.15E-02	chr8(-):93107256-93107399
3.04E-02	chr3(-):183677521-183677623
4.73E-02	chr3(-):183558358-183558428
8.90E-03	chr8(+):82196749-82197011
3.94E-03	---
1.80E-02	---
1.66E-02	chr5(+):68399789-68400261
1.24E-02	chrX(+):117544858-117544922
3.47E-02	chr3(-):15606058-15606165
1.42E-02	chr1(-):52959283-52959334
4.80E-02	chr12(-):57638098-57638149
4.78E-02	chr22(+):51195376-51195754
2.38E-02	chr17(+):53844696-53844813
2.84E-02	chr10(+):94594470-94594581
2.03E-02	chr9(+):36066766-36066867
2.75E-02	chr6(-):52897331-52897452
1.80E-02	chr10(-):101912018-101912109
3.28E-02	chr6(-):45886672-45886805
1.02E-02	chr20(-):3297370-3297440
1.80E-02	chr13(-):36910424-36910495
1.51E-02	chr2(-):54133735-54133830
2.32E-03	chr13(-):33002041-33002311
3.94E-02	chr1(+):46079768-46079853
3.70E-02	chr9(-):3490279-3490345
3.66E-02	chr20(-):3296382-3296432
2.38E-03	chr14(+):32183775-32184009
8.54E-03	chr6(+):29694660-29694781
2.49E-02	---
2.54E-02	chr1(+):67423742-67423903
4.80E-02	chr13(-):96638587-96638686
1.57E-02	chr4(+):123094191-123094307
3.60E-02	chr2(-):220078161-220078224
3.75E-02	chr20(-):3329172-3329270
2.40E-03	chr17(+):66508141-66508283
3.54E-03	chrX(+):77270159-77270250
2.02E-02	chr20(-):3311293-3311329
4.59E-04	---

Gene Name
troponin T type 3 (skeletal, fast)
metallothionein 1X
chromosome 20 open reading frame 194
ubiquitin specific peptidase 12 // ubiquitin specific peptidase 12 pseudogene 1
natural killer-tumor recognition sequence
structural maintenance of chromosomes 6
chromosome 20 open reading frame 194
UBA domain containing 2
chromosome 20 open reading frame 194
runt-related transcription factor 1; translocated to, 1 (cyclin D-related)
ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5

fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)
cyclin-dependent kinase 12
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 20
solute carrier family 30 (zinc transporter), member 5
WD repeat domain 44
collagen-like tail subunit (single strand of homotrimer) of asymmetric acetylcholinesterase // 2-hydroxyacyl-CoA
zinc finger, CCHC domain containing 11
R3H domain containing 2 // SH3 and cysteine rich domain 3

phosphatidylcholine transfer protein
exocyst complex component 6
reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs
intestinal cell (MAK-like) kinase
ER lipid raft associated 1
chloride intracellular channel 5
chromosome 20 open reading frame 194
spastic paraplegia 20 (Troyer syndrome)
proteasome (prosome, macropain) activator subunit 4
NEDD4 binding protein 2-like 1
nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding)
regulatory factor X, 3 (influences HLA class II expression)
chromosome 20 open reading frame 194
nucleotide binding protein-like
major histocompatibility complex, class I, F
aspartyl aminopeptidase
mesoderm induction early response 1 homolog (<i>Xenopus laevis</i>)
UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase 2
KIAA1109
ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 6 // ATG9 autophagy related 9 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)
chromosome 20 open reading frame 194
protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha (tissue specific extinguisher 1)
ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, alpha polypeptide
chromosome 20 open reading frame 194
proteasome (prosome, macropain) activator subunit 4

Aliases and Synonyms	Representative Transcript ID
AMCD2B // DA2B // DKFZp7	BX640689
MT1 // MT-1l	AK311373
DKFZp434N061	AK226100
UBH1 // USP12 // USP12L1	AF022789
p104	CR749571
SMC6L1 // FLJ22116	AK292421
DKFZp434N061	AK226100
PHGDHL1 // FLJ30548 // RP	AK129861
DKFZp434N061	AK226100
AML1T1 // CBFA2T1 // CDR	BC005850
EST277145 // MOAT-C // MF	AF146074
---	BC003653
E-FABP // PA-FABP	AK226036
CRKRS // CRK7 // CRKR // K	BC150265
DP103 // GEMIN3	BC034953
FLJ12496 // FLJ12756 // MG	BX537394
DKFZp686L20145 // RAB11B	AK127556
HPCL // 2-HPCL // EAD // PH	AK299287
KIAA0191 // PAPD3	BC131734
KIAA1002 // MGC2793	AX775763
---	BC010172
STARD2	AK024667
SEC15L1 // DKFZp761I2124	AK128190
ST15 // hRECK	D50406
KIAA0936 // LCK2 // MGC46	BC152464
C10orf69 // SPFH1 // Erlin-1	BC031791
---	AK097048
DKFZp434N061	AK226100
KIAA0610 // TAHCCP1	AK057764
KIAA0077 // PA200	AY894755
CG018	U50527
DKFZp547F162 // FLB7527 /	AK291637
---	BC022191
DKFZp434N061	AK226100
C14orf127 // FLJ12660 // huI	BX248028
---	AK096962
ASPEP // DAP	AK301919
hMI-ER1 // KIAA1610 // MI-E	AF515448
UGCGL2 // FLJ10873 // FLJ1	AF227906
FLJ21404 // FSA // KIAA137	DQ335469
APG9L1 // EST45597 // FLJ2	AB209054
DKFZp434N061	AK226100
PRKAR1 // TSE1	BC093042
MNK	L06133
DKFZp434N061	AK226100
KIAA0077 // PA200	AY894755

Supplementary Table 2 : List of primers used

Primer name	Sequence	Application
TNNT3-ex15-FWD	5'-GACAAGGCCAAGGAGCTCT -3'	PCR
TNNT3-ex16-REV-108	5'-GGCCCGGACATTCATGAT-3'	PCR
TNNT3-ex17-REV-131	5'-TGCTTCTGGGCCTGGTC-3'	PCR
B2M-FWD	5'-CTCTCTTTCTGGCCTGGAGG-3'	qPCR
B2M-REV	5'-TGCTGGATGACGTGAGTAAACC-3'	qPCR
SC35-FWD	5'-TACGGACGCCGGAGCCGCA-3'	qPCR
SC35-REV	5'-CTGCGAGACCTGGAACGG-3'	qPCR
PABPN1-FWD	5'-TGACCCGGGGGACGGCGC-3'	qPCR
PABPN1-REV	5'-ACTCGAGCTTTGATAGCTTCCAGC-3'	qPCR
RPLP0-FWD	5'-GAGGACCTCACTGAGATTCGG-3'	qPCR
RPLP0-REV	5'-TTCTGAGCTGGCACAGTGAC-3'	qPCR
Myogenin-FWD	5'-ATCTGCACTCCCTTACGTCCA-3'	PCR
Myogenin-REV	5'-ACAGACAATCTCAGTTGGGCAT-3'	PCR
Myosin-FWD	5'-ACAAGCTGCGGGTGAAGAGC -3'	PCR
Myosin-REV	5'-CAGGACAGTGACAAAGAACG -3'	PCR
Bin-ex10-FWD	5'-GGGAGCAACACCTTCACAGT -3'	PCR
Bin-ex10-REV	5'-GATCTCAGGGGTAGCAGCAG-3'	PCR
TNNT3-ex18-FWD	5'-CAGCAAGAAGGCCGGTGCCA-3'	FISH
TNNT3-ex18-REV	5'-AGAGGGGAGTCTGATAACTT-3'	FISH
TNNT3-int15-FWD1	5'-GTGAGTCCAGGCATCTCTGG-3'	FISH
TNNT3-in15-REV1	5'-ATGCAGGGCCCTGGCTGATG-3'	FISH
TNNT3-int15-FWD2	5'-GGGCAAGGTAAGGGGCTGCA-3'	FISH
TNNT3-int15-REV2	5'-CCTCAGTGGGCATTGGAGGG-3'	FISH
TNNT3-int15-FWD3	5'-CCACCAAACAGATGCCAGGC-3'	FISH
TNNT3-int15-REV3	5'-CTAGAAAAATCAACATGGTT-3'	FISH
RECK-ex8-FWD mouse	5'-CCTGTCCTCCGTTATTTTAGTG-3'	qPCR
RECK-ex8-REV mouse	5'-TTTCCTGTCTTGTCTTCATCA-3'	qPCR
RECK-ex10-FWD mouse	5'-TCGGTTTGTTCAGTTATGC -3'	qPCR
RECK-ex10-REV mouse	5'-TATCCGTTGGGTTCCCTCATT-3'	qPCR
ZCCHCH-ex7/8-FWD	5'-CCTCCAAGATGAATCATCC-3'	qPCR
ZCCHCH-ex7/9-FWD	5'-CCTCCAAGTATTATATGTAGATGTGG-3'	qPCR
ZCCHCH-ex9-REV	5'-ATCTCTGCACACCACAACAG-3'	qPCR

Article n° 3

PABPN1 gene therapy rescues disease phenotype in oculopharyngeal muscular dystrophy

Malerba†, P. Klein†, H. Bachtarzi, S. A. Jarmin, M. Polay Espinoza, A. Ferry, V. Strings, M. Oloko, K. Mamchaoui, S. C. Blumen, J. Lacau St Guily, V. Mouly, M. Graham³, G. Butler-Browne, D. A. Suhy, C. Trollet^{2}, G. Dickson^{1*}.*

†, :equal contribution*

Soumis à Nature Communication

Contexte de l'étude

A l'heure actuelle aucun traitement curatif n'existe pour les patients OPMD et les seules thérapies offertes sont principalement de la chirurgie correctrice. De nombreuses stratégies thérapeutiques sont à l'étude au niveau pré-clinique (stratégies anti-agrégats et anti-apoptose principalement) et deux essais cliniques sont au cours. Le premier (NCT02328482) développé par la société Bioblast en Israël et au Canada, évalue l'effet d'un sucre, le tréhalose, en injection intraveineuse, sur sa capacité à diminuer l'agrégation. Cet essai est basé sur des résultats positifs obtenus chez la souris OPMD (Davies et al., 2006). Le second (NCT00773227) développé par les Pr Périé et Pr Lacau St Guily à l'Hopital Tenon à Paris évalue l'effet d'une thérapie de greffe de myoblastes autologues issus de muscles non atteints injectés au niveau des muscles du pharynx pour améliorer la déglutition (Périé et al., 2013). Même si ces essais semblent prometteurs aucun ne corrige directement la cause de la pathologie c'est à dire la mutation génétique. Pourtant, plusieurs caractéristiques font de l'OPMD un bon candidat pour le développement d'une thérapie génique efficace : 1) la mutation est courte (1 à 8 triplets) et connue, 2) le gène muté est de petite taille, compatible avec la capacité des vecteurs viraux classiquement utilisés, et 3) les muscles atteints sont de petite taille et en nombre restreint dans les premiers stades de la maladie ce qui permet de les cibler facilement. L'OPMD étant une maladie génétique dominante, il est nécessaire de diminuer ou d'éteindre l'expression de l'allèle muté. Pour cela les outils d'interférence à l'ARN permettent de cibler spécifiquement l'expression d'un gène. Cependant dans le cas de l'OPMD, la seule différence entre la forme sauvage et la forme mutée est la courte expansion de (GCN). Cette séquence (GCN) est déjà présente sur la forme sauvage et est trop riche en nucléotides GC pour envisager un ciblage spécifique. Dans ce contexte la stratégie que nous avons développée est dite de remplacement. Elle consiste 1) à éteindre l'expression de PABPN1 par ARNi en utilisant des shARN, 2) à apporter un ADNc codant une protéine PABPN1 fonctionnelle mais dont la séquence a été largement modifiée pour être résistante à l'ARNi grâce à la redondance du code génétique. La séquence en ARN est totalement différente (et donc non ciblée par les siARN/shARN) alors que la séquence protéique est similaire à la forme sauvage de la protéine PABPN1. Cette séquence est appelée PABopt. L'idée est de développer une stratégie de thérapie génique virale a) *in vivo* par injection intramusculaire AAV et/ou b) *ex-vivo* par transduction de myoblastes par des lentivirus avant injection au sein des muscles. Ce projet a été développé en collaboration avec l'équipe de

George Dickson à Londres et la société Benitec Biopharma Ltd qui possède le brevet sur les shARN.

Résultats

La première étape de cette stratégie de thérapie génique a consisté à développer des outils efficaces pour éteindre l'expression de PABPN1. Plusieurs siARN ont été sélectionnés ciblant plusieurs régions du gène *PABPN1* humain et murin. Ils ont été testés *in vitro* 1) dans des cellules de types HEK293T, ciblant la protéine endogène ou par co-transfection avec un vecteur exprimant la forme mutée de PABPN1 avec une séquence tag de type FLAG, 2) dans les cellules Ala17 modèle murin de la pathologie développé par Mike Antoniou à Londres qui surexpriment la forme mutée de PABPN1 mais aussi dans les cellule Ala10 qui surexpriment la forme sauvage de la protéine PABPN1. Les résultats ont montré une efficacité variable entre les différents siARN avec certains capables d'éteindre jusqu'à 90% de la protéine. Trois séquences de siARN ont été sélectionnées pour être ensuite développées en shARN (shARN-1 ; -2 et -3). Les séquences shARN correspondantes (soit une simple cassette contenant un shARN individuel ou une triple cassette contenant les 3 shARN) ont été clonés dans des vecteurs lentiviraux et AAV avec en aval de trois promoteurs polIII différents (U61, U69 et H1). Les plasmides correspondants ont été testés *in vitro* par transfection transitoire de la même façon que pour les séquences siARN. Une extinction a été obtenue au niveau ARN et protéique. En parallèle nous avons montré par co-transfection que la séquence PABopt est résistante aux siARN et aux shARN correspondants.

Stratégie ex vivo : Les expérimentations de transduction *in vitro* dans des myoblastes contrôles mais aussi OPMD, immortalisés ou des lignées primaires a montré une extinction du niveau de l'expression de PABPN1 variable en fonction des shARN utilisés. Dans ces vecteurs le gène rapporteur de la GFP a été rajouté afin de pouvoir suivre l'efficacité de transduction. Le suivi de la GFP nous a permis de mettre en évidence que l'extinction de PABPN1 s'accompagne d'une forte létalité cellulaire : nous observons une perte du nombre de cellules exprimant la GFP comparé à la condition contrôle (transduction d'un lentivirus exprimant un shARN contre le promoteur de l'HBV). L'utilisation conjointe d'un lentivirus exprimant la séquence PABopt résistante permet de retarder cette létalité. Le gène PABopt a ensuite été cloné dans les vecteurs exprimant la triple cassette shARN-1, 2, 3 et shARN HBV. Lorsque (et seulement lorsque) l'expression de PABPN1 est rétablie par cette séquence PABopt, il est possible de maintenir les cellules en culture.

Stratégie *in vivo*: Des injections d'AAV codant la triple cassette de shARN seule, la séquence PABopt ou une combinaison des deux virus (shARN + PABopt) ont été réalisées dans un des deux *Tibialis anterior* de la souris A17.1, modèle de l'OPMD, l'autre étant injecté avec une solution saline. Quatre mois après des mesures de forces et des études histologiques ont été réalisées. Dans un premier temps nous avons regardé le niveau de PABPN1 endogène et le niveau en ARN était faiblement diminué mais une extinction drastique au niveau protéique a été observée dans les conditions shARN seul et shARN+PABopt. En parallèle l'expression de PABopt a été confirmée au niveau ARN et protéique. La souris A17.1 récapitule un grand nombre des caractéristiques de la pathologie comme une faiblesse musculaire progressive, de la fibrose, des défauts du complexe ubiquitine-protéasome et surtout la présence d'agrégats nucléaires. Les améliorations phénotypiques retrouvées dans les différentes conditions sont résumées dans le tableau suivant :

Souris	Contrôle + Saline	OPMD + Saline	OPMD + ShARN seul	OPMD + PABopt	OPMD + shARN+PABopt
Fibrose	-	+	+	+	-
Atrophie	-	+	+	-	-
Poids du muscle	-	+	+	+	+
Force spécifique	-	+	+	+	-
Nombre d'agrégats	-	+	-	+	-

Tableau 7: Comparaison des améliorations phénotypiques dans la souris A17.1 (OPMD) injectée par différents AAV ou d'une solution saline en comparaison à une souris contrôle
+ pas de retour à une condition contrôle, - retour à une condition contrôle.

L'injection dans la souris OPMD de l'AAV contenant le shARN et la séquence PABopt conduit à un rétablissement quasi complet des caractéristiques pathologiques, contrairement à l'injection d'un shARN seul ou de la séquence PABopt seule. Nous avons effectué une analyse transcriptomique sur les ARN issus de ces injections *in vivo* et les profils obtenus ont montré une normalisation complète des ARN dérégulés (98% des gènes) de la souris A17, dans le cas du double traitement, vers un profil de souris contrôle.

Conclusion

Nous avons montré pour la première fois dans un modèle souris OPMD qu'une stratégie de thérapie génique de remplacement consistant à éteindre la protéine PABPN1 (sauvage et mutée) simultanément avec l'expression d'une protéine fonctionnelle de PABPN1 améliore les caractéristiques phénotypiques de la maladie, rétablit la force musculaire et normalise le transcriptome vers des souris contrôles. Ce traitement est aussi efficace *in vitro* dans des cellules OPMD.

Discussion

La plupart des stratégies thérapeutiques à l'étude pour l'OPMD visent à réduire les agrégats nucléaires. Bien que les agrégats soient le principal marqueur pathologique de la maladie et qu'ils présentent une certaine toxicité, ils sont néanmoins retrouvés dans les muscles cliniquement non atteints et ont aussi un effet protecteur contre la toxicité de la protéine mutée soluble. Ainsi ne s'attaquer qu'aux agrégats ne semble pas la solution idéale pour l'OPMD et les abolir complètement pourrait présenter des risques à certains stades de la maladie. La stratégie de thérapie génique que nous développons cherche à corriger directement à la cause de la pathologie. Cette stratégie est développée dans l'objectif de traiter directement et localement les muscles atteints par injection intramusculaire (d'AAV ou de myoblastes corrigés par transduction lentivirale) permettant ainsi d'éviter les problèmes liés aux injections systémiques (biodistribution, dose, toxicité, efficacité). Dans le cas d'une thérapie *ex vivo* la combinaison des deux thérapies (génique et cellulaire) permet l'apport d'un bénéfice mutuel de chaque stratégie. Ainsi l'apport de cellules permet de traiter l'atrophie musculaire et la perte des fibres déjà présente chez les patients. Ces nouvelles fibres seront génétiquement saines rétablissant l'homéostasie normale dans les muscles OPMD. Comme c'est le cas pour la plupart des thérapies géniques, un contrôle fin du niveau d'expression du transgène est essentiel. Cela semble encore plus vrai dans le cas de l'OPMD où PABPN1 est une protéine essentielle pour la survie, son extinction étant létale. Il a ainsi été rapporté chez la mouche et le ver *C.elegans* lors d'études précédentes une mortalité *in utero* pour des mutants pour la protéine PABPN1 (Chartier et al., 2006 ; Pasco et al., 2010). Nous avons aussi montré au cours de notre étude que l'extinction de PABPN1 conduit à une mortalité cellulaire *in vitro* dans les myoblastes (contrôles et OPMD) mais aussi *in vivo* dans

le muscle de souris. Chez la souris contrôle l'injection d'un AAV exprimant des shARN contre PABPN1 conduit à un processus sévère de dégénération/régénération caractérisé par la présence de centronucléation, l'expression de myosine embryonnaire et une diminution du poids du muscle et de la force absolue et spécifique. De façon étrange, nous n'avons pas pu mesurer 4 mois après injection la diminution de l'expression de PABPN1 en ARN ou en protéine dans ces souris traitées par un AAV contenant les shARN contre PABPN1. Nous savons que l'outil moléculaire d'extinction fonctionne puisque son efficacité a été vérifiée dans la souris OPMD qui surexprime PABPN1. Notre hypothèse est plutôt que 4 mois après l'injection de l'AAV-shARN, le niveau d'expression de PABPN1 est revenu à son niveau basal car il y a eu une régénération complète du muscle avec perte de l'AAV. Les cellules satellites non ciblées par l'AAV ont été activées, ont proliférées et ont rétabli un niveau endogène de PABPN1. De façon intéressante dans la souris OPMD, où l'étude a été réalisée dans les mêmes conditions, une extinction de PABPN1 au niveau protéique a été observée. Sachant que la souris OPMD surexprime PABPN1, il semblerait que les muscles injectés avec l'AAV-shARN aient conservé un niveau basal de la protéine suffisant pour ne pas activer un mécanisme de dégénération et donc la perte des AAV. Il sera intéressant de vérifier dans un autre organe si le même processus peut avoir lieu ou si il est spécifique du muscle en sachant que dans les autres organes le niveau d'expression basal PABPN1 est beaucoup plus élevé (Apponi et al., 2013). Une cinétique d'injection permettrait également de déterminer à quel instant et à partir de quel niveau de PABPN1 dans le muscle se produit le mécanisme de compensation. Il faudrait aussi étudier les fonctions de PABPN1 durant cette cinétique afin de vérifier si elle sont dérégulées et si la perte de l'une d'entre elle est l'élément déclencheur qui pourrait activer les cellules satellites. De façon intéressante, il a déjà été montré que l'extinction de PABPN1 dans des myoblastes murins peut conduire à une modification du profil de polyadénylation mais les conséquences restent limitées (Apponi et al., 2009). Même si au cours de cette étude les mécanismes moléculaires pour expliquer pourquoi l'extinction de PABPN1 ne conduit pas à une dérégulation drastique de la polyadénylation n'ont pas été investigués, il est possible que l'extinction réalisée par siARN soit transitoire et qu'un niveau résiduel de protéine soit présent dans les cellules et suffisant pour ne pas induire de dérégulation. Une autre hypothèse serait que, puisque d'autres protéines liant la queue poly(A) avec des fonctions similaires existent (telle que la protéine nucléaire ZC3H14), qu'un mécanisme de compensation fonctionnel de PABPN1 se produise. En effet un mécanisme de ce type a déjà été mis en évidence lors d'une précédente étude : il a en effet été montré que

l'extinction de PABPN1 dans des cellules non musculaires n'induit aucun changement que ce soit dans le profil de polyadénylation de certains transcrits, dans leur export ou encore concernant leur niveau de transcription et de traduction, et ceci grâce à un mécanisme de compensation par des protéines PAB cytoplasmiques dont le niveau augmente et qui transloquent dans le noyau pour compenser la perte de PABPN1 (Bhattacharjee, Bag, 2012). Ainsi il semblerait que les fonctions de PABPN1 soient suffisamment essentielles pour que la cellule ait mis en place des mécanismes de sauvegarde pour suppléer à toute perte de fonction de la protéine qui conduirait sinon à une mortalité cellulaire. Cependant nous avons montré des résultats contradictoires à ceux d'Apponi *et al* qui a effectuée ses expérimentations sur des myoblastes murins puisque nous avons montré qu'une forte extinction de PABPN1 par RNAi est létale dans des myoblastes humains *in vitro*. Il est donc possible qu'aucun mécanisme de compensation fonctionnelle n'existe pour ce type cellulaire chez l'homme conduisant à leur mort ce qui pourrait expliquer en partie l'atteinte spécifique muscle dans le cas d'une perte de fonction : les fibres plus sensibles à une perte de fonction de PABPN1 meurent alors que les autres types cellulaires sont épargnés. Il serait ainsi intéressant d'étudier comment se met en place cette compensation et quels sont les mécanismes impliqués. Si diminuer le niveau de PABPN1 est dangereux pour la cellule, en apporter plus que nécessaire n'est pas idéal non plus. PABPN1 est une protéine agrégante et même la forme sauvage conduit à des agrégats nucléaires lorsqu'elle est sur-exprimée avec des conséquences délétères pour la cellule. Afin d'éviter cela, la cellule a mis en place un système de régulation négatif d'autocontrôle de son propre niveau d'expression de PABPN1. Ainsi lorsque le niveau de PABPN1 augmente une rétention du dernier intron au niveau de son pré-ARN se produit conduisant à une dégradation du transcrit pas le NMD. Ce mécanisme a été mis en évidence *in vitro* dans de cellules non musculaires (Bergeron et al., 2015). Il aussi été montré lors d'une autre étude que l'ARN de *PABPN1* est présente sous différentes isoformes suite à un APA dans le 3'UTR. Une des isoformes est instable et semblerait dicter le niveau de PABPN1 dans le muscle. Plusieurs mécanismes moléculaires semblent ainsi exister pour contrôler le niveau de PABPN1. Il se pourrait que d'autres existent aussi dans le muscle mature. En effet dans notre étude nous n'avons pas observé de surexpression de PABPN1 dans les muscles injectés avec l'AAV exprimant PABopt bien que le promoteur soit muscle spécifique et soit censé conduire à une forte expression. Bien sûr on ne peut exclure totalement un problème de titration ou d'expression de cet AAV. Mais ceci pourrait aussi indiquer un mécanisme

différent de contrôle du niveau de l'expression mis en place puisque l'ADNc de PABopt ne contient ni séquence intronique ni sa séquence 3'UTR propre.

Le rôle de PABPN1 muté dans la pathogenèse de l'OPMD est toujours incertain. Plusieurs hypothèses existent pour expliquer comment l'expansion d'alanines conduit à cette maladie. Un modèle de gain de fonction toxique suggère que les agrégats eux mêmes sont délétères par leur présence et conduisent à des mécanismes d'apoptose ou que l'expansion en elle-même confère une nouvelle fonction toxique pour l'homéostasie cellulaire. Une seconde hypothèse penche vers une perte de fonction due à la séquestration dans les agrégats nucléaires de PABPN1 ou d'autres éléments essentiels (protéines, ARN), ou - puisque chez les patients OPMD ont sur un des deux allèles une forme mutée de la protéine – par un mécanisme d'haploinsuffisance. Ces hypothèses ne sont pas mutuellement exclusives et différents arguments existent pour les confirmer ou les infirmer. Pour réconcilier le tout, notre étude suggère que l'OPMD est à la fois dûe à une perte de fonction et à un gain de fonction toxique : en effet l'apport seul de PABopt qui compenserait une potentielle perte de fonction ou l'extinction de PABPN1 seule qui éliminerait le gain de fonction ne suffisent pas et ce n'est que la combinaison des deux traitements qui est efficace et permet de rétablir un profil contrôle dans le transcriptome de la souris traitée. Il reste maintenant à comprendre quelles sont les fonctions perdues dans l'OPMD et qu'elle est exactement le gain de fonction toxique dans la pathologie (agrégats, mutation). Cette question sur une possible perte de fonction ou un gain de fonction toxique se pose également pour de nombreuses autres maladies telles que Alzheimer, Parkinson ou encore les maladies à prion, impliquant une malformation protéique avec la présence de dépôts pathologiques. Ainsi la stratégie de remplacement que nous avons développé pourrait être applicable à ces maladies dominantes et semble idéale pour les maladies causées par la présence d'agrégats permettant de suppléer à la fois le gain de fonction toxique et la perte de fonction.

PABPN1 gene therapy rescues disease phenotype in oculopharyngeal muscular dystrophy

A. Malerba^{1†}, P. Klein^{2†}, H. Bachtarzi^{1‡}, S. A. Jarmin¹, M. Polay Espinoza², A. Ferry², V. Strings³, M. Oloko², K. Mamchaoui², S. C. Blumen⁴, J. Lacau St Guily^{2,5}, V. Mouly², M. Graham³, G. Butler-Browne², D. A. Suhy³, C. Trollet^{2*}, G. Dickson^{1*}.

¹School of Biological Sciences, Royal Holloway, University of London, Surrey, UK

²Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UM76, INSERM U974, Institut de Myologie, CNRS FRE3617, 47 bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France et Sorbonne Paris Cité, Université Paris Descartes, 75006 Paris, France

³Benitec Biopharma, Hayward, California, USA.

⁴Department of Neurology, Hillel Yaffe Medical Center, Hadera and Rappaport Faculty of Medicine, The Technion, Haifa, Israel

⁵Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Faculty of medicine and University Pierre-et-Marie-Curie, Paris VI, Tenon Hospital, Assistance Publique des Hopitaux de Paris, France

Correspondence should be sent to:

George J Dickson,

School of Biological Sciences,

Royal Holloway, University of London, Egham, Surrey, TW20 0EX, UK.

Tel: 44-(0)1784-443545;

Fax: 44-(0)1784 414224;

Email: g.dickson@rhul.ac.uk

And

Capucine Trollet,

Myology Research Center

UMRS 974 UPMC - INSERM - FRE 3617 CNRS - AIM

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

Tel: 33 (0)1 42 16 57 15

Fax: 33 (0)1 42 16 57 00

Email: capucine.trollet@upmc.fr^{Affiliations}

*: These authors contributed equally

†: These authors contributed equally

‡: current address: ERA Consulting (UK) Ltd. (European Regulatory Affairs), Twelvetrees Crescent, London, E3 3JG, UK

Abstract: Oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) is an autosomal dominant, late-onset muscle disorder characterized by ptosis, swallowing difficulties and proximal limb weakness. OPMD is caused by a trinucleotide repeat expansion in the polyA binding protein nuclear-1 (PABPN1) gene that results in an N-terminal expanded polyalanine tract in the protein. OPMD is characterized by nuclear aggregates of expanded PABPN1 (expPABPN1), fibrosis and muscle atrophy. Here we demonstrate that the treatment of a mouse model of OPMD with an AAV-based gene therapy strategy combining complete knock-down of endogenous expPABPN1 and its replacement by a wildtype PABPN1, significantly reduced the amount of insoluble aggregates, decreased muscle fibrosis, reverted the muscle strength to the level of healthy muscles and normalized the muscle transcriptome. The efficacy of the combined treatment was further confirmed in cells derived from OPMD patients. These results pave the way for the clinical application of a gene therapy approach for OPMD in humans.

Introduction

Oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) is an autosomal dominant, degenerative muscle disease affecting about 1/100,000 people in Europe that usually presents in the fifth decade of life ¹. OPMD is mainly characterised by progressive eyelid drooping, swallowing difficulties (as pharyngeal and cricopharyngeal muscles are mostly affected) and proximal limb weakness ².

Individuals affected by OPMD have a mutation in the polyA binding protein nuclear 1 (PABPN1) gene ³, which encodes an ubiquitously expressed polyadenylation factor involved in many biological processes ⁴. PABPN1 stimulates the polyA polymerase (PAP) and controls the poly(A) tail length on RNA transcripts ^{5, 6, 7, 8}. PABPN1 regulates the use of alternative polyadenylation (APA) sites ^{9, 10}, which in turn affects mRNA levels and stability. PABPN1 is

also involved in the long non-coding RNA (lncRNAs)¹¹ and small nucleolar RNA (snoRNA) processing¹², and in the nuclear surveillance that leads to hyperadenylation and decay of RNA¹³. Finally, two recent studies highlight the role for PABPN1 in splicing regulation^{14, 15}. In OPMD, mutated PABPN1 has an abnormal expansion of alanine-encoding (GCN)_n trinucleotide repeat in the coding region of exon 1 with 11-18 repeats instead of the normal 10 present in unaffected individuals^{3, 16, 17}. The resulting protein (expPABPN1) is misfolded and prone to aggregation in nuclear insoluble aggregates considered to be the main histopathological hallmark of the disease^{18, 19}. However, like in many neurodegenerative diseases^{20, 21} it is still unclear whether these nuclear aggregates have a pathological function in OPMD or a protective role as a consequence of a cellular defence mechanism^{22, 23, 24}.

No interventional cure is currently available for OPMD. The surgical cricopharyngeal myotomy is the only treatment available to improve swallowing in these patients, but the pharyngeal musculature still undergoes progressive degradation leading to death following swallowing impairment, pulmonary infections and choking^{2, 25}. A recent phase I/IIa clinical trial, which employed transplantation of unaffected autologous myoblasts in combination with the cricopharyngeal myotomy improved the swallowing of OPMD patients with a cell dose effect²⁶. However, the injected cells still carry the mutation and thus may be susceptible to the same OPMD phenotype. The A17 mouse model of OPMD expresses a bovine expPABPN1 with 17 alanine residues under the control of a muscle specific promoter. In heterozygous mice, this model recapitulates most of the features of human OPMD including a progressive atrophy and muscle weakness associated with nuclear insoluble PABPN1 aggregates^{24, 27} as well as mitochondrial defects²⁸. Molecules potentially ameliorating the OPMD phenotype (eg, Trehalose and doxycycline) have been tested in the A17 mouse, where reduced muscle weakness

was observed^{27, 29}. The use of trehalose is currently in phase II clinical trial (NCT02015481 on clinicaltrials.gov). Other pharmacological strategies currently under pre-clinical investigation include antiprion drugs like 6-aminophenanthridine and guanabenz and "intrabodies" targeting the expPABPN1^{30, 31, 32}. However, none of these strategies directly correct the genetic defect of OPMD patients.

Here we propose a dual gene therapy approach for this disease by using RNA interference (RNAi) to inhibit the expression of all endogenous (ie both wildtype and expanded) PABPN1 and expressing a sequence optimized healthy PABPN1 resistant to RNAi-induced cleavage. Indeed due to the nature of the mutation, it is not possible to specifically inhibit expPABPN1 only. A similar approach was used for Retinitis Pigmentosa where the mutated rhodopsin was knocked down in photoreceptors and replaced by a functional version^{33, 34}. OPMD, with a limited number of muscles to treat, is particularly well suited for such a gene therapy approach as only a local administration would be required. Adeno-associated virus (AAV) is currently the most promising viral vector for *in vivo* gene therapy applications due to its non-pathogenicity, the natural efficient infection in primates for some serotypes and the negligible risk of insertional mutagenesis^{35, 36}. Within the 4.7 kb vector packaging capacity, AAV vectors can accommodate both transgenes and shRNA/miRNA expression cassettes³⁷. Recent clinical studies based on localized or systemic administration of AAV vectors for gene expression in humans have shown potential for the treatment of human monogenic diseases, such as haemophilia, retinal degeneration, metabolic disorders, muscular dystrophies and degenerative diseases^{38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46}. The use of AAV-mediated RNAi therapeutics is receiving great attention in a wide range of pathologies³⁷ including dominant genetic disorders that involve gain-of-function mechanisms⁴⁷ and protein aggregate disorders for which a silencing approach has shown some

promise in pre-clinical studies^{48, 49}. As OPMD is an aggregate disorder, AAV-mediated RNAi knockdown of expanded PABPN1 is potentially an appealing approach for the treatment of this pathology. However, previous evidences obtained in drosophila, and cell culture suggest that the depletion of endogenous PABPN1 is not a viable option for the treatment of OPMD^{6, 7, 50}.

Here we show for the first time in a mouse model of OPMD that a gene therapy approach designed to fully deplete the endogenous (wild type and expanded) PABPN1 effectively abolishes the nuclear aggregates but induces muscle degeneration. Furthermore AAV mediated expression of a codon optimized human PABPN1 alone does not significantly improve the pathology either. However, the simultaneous application of the two treatments prevents muscle degeneration, markedly increases muscle strength normalizing the specific muscle force to the one of unaffected muscles, and essentially normalizes gene expression profile. The efficacy of the combined treatment was also verified in cells derived from OPMD patients where the expression of a healthy PABPN1 rescued the survival of cells where the endogenous PABPN1 was down-regulated. Overall, our data clearly demonstrate that PABPN1 aggregation induces in OPMD both a gain of toxic function and a loss of physiological function and strongly support the application of a dual gene therapy approach as a novel treatment for OPMD in humans.

Results

Tricistronic shRNA construct induces efficient knockdown of PABPN1 in vitro without affecting the human sequence optimized PABPN1 expression

DNA-directed RNA interference (RNAi) uses the cells own transcriptional machinery to produce short double-stranded hairpin RNA (shRNA), that, when processed into siRNA, can degrade specific target mRNA. In order to ensure efficient knockdown of the PABPN1, three shRNA

sequences (designated sh-1, sh-2 and sh-3) were designed. Sequences sh-1 and sh-3 target PABPN1 in regions of conserved identity between mouse, bovine and human species while sh-2 specifically binds bovine and human PABPN1. In order to provide a strong knockdown of PABPN1, we assembled the coding sequences for the three shRNAs into a tricistronic expression cassette (called shRNA3X), with each hairpin RNA driven by a different polymerase-III promoter (U61, U69 and H1 respectively) (**Figure 1a**). As, for *in vivo* muscle gene therapy applications the use of AAV vectors is very efficient, the tricistronic shRNA3X cassette was cloned into an AAV backbone. We also generated two separate plasmids harbouring a single-stranded AAV expression cassette carrying either the human codon-optimized PABPN1 sequence (optPABPN1) tagged with a MYC epitope or the mutated expanded human PABPN1 complementary DNA (cDNA) (expPABPN1) coding sequence tagged with a FLAG epitope both under the control of the muscle specific SPc5-12 promoter. With the codon-optimization, the redundancy of the genetic code was exploited to largely modify the nucleic acid sequence of PABPN1 (i.e. 230 out of 921 nucleotides mismatches, corresponding to 25% difference) and confer resistance of optPABPN1 to the expressed shRNA sequences. To verify that shRNA3X was able to knock-down PABPN1 (both wild type and mutated version of PABPN1) while maintaining unaffected levels of optPABPN1, we transfected HEK293T cells with the recombinant expression plasmid harbouring shRNA3X alone or used this plasmid in co-transfection experiments with the plasmids expressing expPABPN1 or optPABPN1. A negative control shRNA, designed to target HBV polymerase gene (HBVpol) was also transfected in parallel wells. Samples were collected 72 h post-transfection and PABPN1 expression levels were detected by western blot analysis. shRNA3X construct induced efficient knockdown of PABPN1 even when expPABPN1 was co-expressed achieving about 95% knockdown in

PABPN1 expression (**Figure 1b,c**). Importantly, detection of MYC-tag by western blot in samples treated with plasmids expressing optPABPN1 demonstrated that shRNA3X induced efficient knockdown of the expPABPN1 protein leaving the expression of optPABPN1 protein unaltered (**Figure 1d**).

Overall these data demonstrate that the tricistronic construct knocks down both wild type and expanded PABPN1. Furthermore, when co-delivered with shRNA3X, the human sequence optimized PABPN1 is resistant to degradation and results in expression of a healthy PABPN1.

In vivo administration of AAV-shRNA3X efficiently knocks down PABPN1 expression without affecting the human sequence optimized PABPN1 expression

The corresponding AAV vectors were produced in HEK293T cells by a double-transfection-based protocol and formulated for *in vivo* injection. We selected serotypes 8 and 9 AAV vectors based on previous studies that demonstrated high level of transduction and expression in skeletal muscle^{51, 52}. To ensure robust PABPN1 knock-down, shRNA3X was delivered by self complementary AAV8 (scAAV-shRNA3X) that have been demonstrated to achieve a more rapid and efficient transgene expression than their single stranded counterparts⁵³. The expression cassette for optPABPN1 was packaged as single stranded construct into AAV9 (ssAAV-optPABPN1) as this serotype has a better packaging resulting in higher titres (unpublished observations). The A17 mouse model of OPMD overexpresses bovine expPABPN1 along with the healthy murine version and displays a progressive atrophy and muscle weakness associated with nuclear PABPN1 aggregates^{24, 27}. AAVs were administered by intramuscular injection in *Tibialis anterior* (TA) muscles of 10-12 week old A17 mice at concentration of either 2.5×10^{10}

vp of scAAV-shRNA3X or 1.3×10^{11} ssAAV-optPABPN1 (respectively referred as shRNA3X and optPABPN1) or as a combination of the 2 AAVs at the same concentrations. Saline was injected in TA of age-matched A17 and FvB mice. 18 weeks post-injection, muscles were harvested and RNA and proteins extracted. Quantitative RT-PCR showed a 35% and 45% decrease in PABPN1 expression in muscles treated with either shRNA3X or shRNA3X+optPABPN1 respectively compared to saline-injected A17 muscles (**Figure 2a**). Western blot analysis detected a more profound inhibition (i.e. 80% knock-down) of expPABPN1 protein expression in muscles treated with the shRNA3X as compared to saline-injected A17 mice and even greater levels of inhibition of PABPN1 protein levels (i.e. approximately 90%), were noted upon co-delivery of shRNA3X and optPABPN1 (**Figure 2b-c**). Both RT-qPCR and Western-blot further indicated that optPABPN1-MYC was successfully expressed in muscles treated with optPABPN1 or the combination of shRNA3X and optPABPN1 (**Figure 2d-e**). We did not detect a difference in MYC-tag quantification between muscles treated with optPABPN1 and muscles treated with shRNA3X+optPABPN1 confirming that *in vivo* optPABPN1 is resistant to the PABPN1 degradation provided by shRNA3X (**Figure 2e-f**). Quantitative PCR also confirmed the expression of shRNAs from the tricistronic construct in shRNA3X and shRNA3X+optPABPN1 treated muscles. Interestingly, a statistically significant difference in shRNA levels were noted between muscles treated with shRNA3X only versus muscles treated with a combination of both vectors (**Figure 2g**). The effects of PABPN1 knockdown was also assessed by analysing the amount of insoluble aggregates in the myonuclei, the main pathological hallmark of the disease, which formation is due to expPABPN1 expression. Insoluble nuclear aggregates were readily detected in about 35% of myonuclei in A17 mice while FvB myonuclei contained virtually no aggregates. While the expression of

optPABPN1 did not modify the amount of insoluble aggregates in A17 muscles, the treatment with either shRNA3X alone or the combination of shRNA3X and optPABPN1 greatly decreased the amount of myonuclei containing aggregates to 10% and 5% of myonuclei respectively (**Figure 2h-i**).

These data show that shRNA3X delivered by AAV efficiently down-regulates PABPN1 in vivo and leads to a drastic clearance of insoluble PABPN1 aggregates. Importantly, a codon-optimized PABPN1, resistant to shRNA3X-induced degradation, can be co-delivered and expressed by AAV.

PABPN1 depletion in skeletal muscle induces muscle degeneration that can be prevented by co-expressing sequence optimized PABPN1

Analysis of shRNA3X treated muscles group, demonstrated that depletion of endogenous PABPN1 by shRNAs induced significant muscle degeneration/regeneration as indicated by the increased presence of centrally nucleated fibres (50% in shRNA3X treated muscles compared to 5% in saline injected A17 mice) (**Figure 3a-b**) as well as the increased levels of embryonic myosin (eMHC), which is expressed when muscle fibres regenerate (**Figure 3c**). Notably, the co-expression of optPABPN1 with shRNA3X in the A17 mice was able to prevent the muscle fibre degeneration and to maintain the level of centrally nucleated fibres as well as the low level of eMHC (**Figure 3a-c**). In order to further analyse the effect of *in vivo* PABPN1 depletion, TA muscles of normal C57BL/6 mouse, where only the normal endogenous level of PABPN1 is expressed, were injected with 2.5×10^{10} vp of scAAV-shRNA3X or a control ssAAV-GFP. 3 months post-injection, massive muscle degeneration was observed as evidenced by the presence

of more than 60% centrally nucleated fibres, increased eMHC expression, decreased muscle weight, and impaired muscle strength in shRNA3X-treated muscles as compared to GFP treated TA muscles (**Figure 3d-i**).

These data indicate that an approach that only involves PABPN1 depletion is detrimental in skeletal muscle and induces massive muscle degeneration. The co-expression of codon-optimized, wildtype, PABPN1 prevents the shRNA-induced muscle degeneration and normalizes the muscle phenotype to that of untreated A17 mice.

In vivo administration of AAVs expressing shRNA3X and optPABPN1 reduces muscle fibrosis, increases myofibre size and rescues specific maximal force of A17 mice

In muscles co-treated with shRNA3X and optPABPN1 we observed a significant reduction in fibrotic tissue compared with the saline injected A17 muscles as monitored by collagen VI immunostaining, one of the main components of the extracellular matrix (ECM) (**Figure 4a-b**). Myofibre cross sectional area (CSA) analysis also indicated that while injection of shRNA3X alone did not modify the size distribution of myofibres, the treatment with optPABPN1 alone or in combination with shRNA3X markedly increased the myofibre CSA (**Figure 4c** and **supplementary figure 1**). Before collecting the muscle tissues, TA muscle strength of treated mice were analysed by *in situ* force measurement. Saline injected muscles of A17 mice have a reduced muscle weight and maximal force compared with muscles of healthy mice (**Figure 4d-e**). Only the dual treatment with shRNA3X and optPABPN1 significantly increased the maximal force generated by the muscles while either the treatment with shRNA3X or optPABPN1 alone did not affect the muscle force. Surprisingly, no substantial increase of muscle weight was

observed for any of the treatments (**Figure 4d**) compared to saline injected A17 muscles. The normalization of the maximal force by the muscle weight provides a measure of the muscle strength per unit of tissue called specific maximal force (**Figure 4f**). The specific maximal force of muscles co-treated with the two vectors shRNA3X and optPABPN1 was restored to the value of healthy muscles demonstrating that myofibres of treated muscles were as strong as those of wildtype mice. The concomitant reduction in muscle fibrosis and the small, but significant, increase in myofibre CSA may explain the unchanged muscle weight and at least partially account for the muscle strength improvement we observed in treated muscles (**Figure 4f**).

Overall these results show that while single treatments inducing either the downregulation of PABPN1 or the expression of healthy PABPN1 protein do not ameliorate the pathology, the combined treatment substantially improves the overall physiology and increases muscle strength restoring the specific maximal force to the wild type level.

In vivo administration of AAVs expressing shRNA3X and optPABPN1 largely normalizes gene expression profile of A17 mice

Endogenous expPABPN1 expression in A17 mice substantially modifies the muscle transcriptome compared to wildtype mice^{24, 28}. The effect of the gene therapy strategy on the A17 muscle transcriptome was investigated using microarray analysis to identify the number of genes dysregulated (>1.5 fold change and $p < 0.05$) in the A17 model (**Figure 5a**). As compared to saline treated FVB mice, 452 genes were up-regulated (**Figure 5b**) while an additional 413 of the sampled genes were down-regulated (**Figure 5c**). Treatment with either the shRNA3X or the optPABPN1 resulted in only modest normalization of the dysregulated genes, while the

combined treatment with shRNA3X and optPABPN1 vectors completely normalized the dysregulated genes. In other words, of the original 865 genes that were dysregulated by more than 1.5 fold, only 12 genes remained significantly different following the combined shRNA3X and optPABPN1 treatment in the muscles of A17 mice (**Figure 5a-c**). This means that a greater than 98% of deregulated transcripts were normalized by the dual treatment in the muscles.

Overall these results show that the combined treatment leads to a drastic improvement of the muscle transcriptome.

Ex vivo correction of OPMD patient myoblasts validates the overall strategy in a human context

In order to verify the beneficial effect of the PABPN1 gene therapy strategy in the context of the human target, we used a similar approach in muscle cells derived from OPMD patients, where expPABPN1 is expressed. Because AAV is highly inefficient at transducing primary myoblasts in vitro, the expression cassettes from the shRNA3X and optPABPN1 constructs were subcloned in lentivirus (LV) backbones that co-expressed the GFP reporter gene to detect transduced cells. Constructs used included the tricistronic shRNA3X cassette, a construct expressing the control HBVpol-shRNA a construct expressing both the tricistronic shRNA3X and optPABPN1 and finally a construct expressing the control HBVpol-shRNA and optPABPN1 (**Supplementary Figure 2**). A strong knock-down of expPABPN1 was observed in HEK293T cells after co-transfection of the shRNA3X LV construct with expPABPN1 expression vector (**Supplementary Figure 2a**). However, PABPN1 knock-down in HEK293T cells was associated with a strong reduction in cell viability after 2 weeks in culture (**Supplementary Figure 2c-d**).

OPMD myoblasts were then transduced with the corresponding LVs. GFP epifluorescence was used to monitor transduced cells. Similarly to the transfection in HEK293T cells, PABPN1 inhibition by shRNA3X was associated to a substantial cell death of transduced cells: cell survival of OPMD myoblasts treated with shRNA3X was severely affected 4 days after transduction and reduced to undetectable levels 10 days after treatment (**Figure 6a**). On the contrary, cells transduced with the dual cassette (shRNA3X and optPABPN1) were healthy and proliferating 10 days after transduction (**Figure 6b**) showing that replacement of endogenous PABPN1 levels with optPABPN1 expression was sufficient to rescue cell survival of the human OPMD myoblasts.

These data confirm that the endogenous PABPN1 inhibition is detrimental in a human context and most importantly in human myoblasts isolated from OPMD patients. Notably human optPABPN1 expression rescues cells survival from the toxic effect of PABPN1 inhibition.

Discussion

No therapeutic intervention is currently available for patients with OPMD, a dominant genetic disease characterized by the formation of intranuclear inclusions similarly to other neurological diseases grouped as “aggropathies” (e.g. Parkinson’s, Alzheimers’s, Hungtington’s diseases). Currently, OPMD patients are surgically treated for the clinical manifestations of the disease, mainly by blepharoplasty to correct the ptosis and cricopharyngeal myotomy to improve dysphagia while, as for the mentioned other protein aggregation disorders, pre-clinical and clinical studies based on the inhibition of aggregation formation or the clearance of existing aggregates are being developed ^{29, 30, 31, 32, 54}. However none of these treatments directly corrects

the genetic defect responsible for the diseased phenotype in the OPMD patients. Gene therapy holds the promise of providing a permanent cure for such diseases untreatable or treatable but not curable with conventional medicines⁵⁵. As previously suggested by others⁵⁶, a strategy that could specifically impact the mutant allele would be suitable for OPMD but the small abnormal 100% GC-rich expansion in the mutant PABPN1 gene cannot easily be targeted without impacting the wildtype PABPN1 function. As a consequence, autosomal dominant inherited diseases such as OPMD, require a gene therapy approach that knocks-down or inhibits the pathogenic protein (i.e. PABPN1) coupled with the ability to induce expression of a functional version of the same gene. Here we used an AAV-based gene therapy approach using a combination of DNA-directed RNA interference (ddRNAi) to knockdown the endogenous wildtype and mutant forms of the PABPN1 allele, and gene addition to replace the transcript with a compensatory healthy human codon-optimized mRNA resistant to RNA interference-induced cleavage. A similar preclinical approach has been used to restore functionality of rhodopsin in photoreceptors of animal model of Retinitis pigmentosa,^{33, 34}. Here we show that this approach is very effective for OPMD, a disease model of aggregopathy, suggesting that a similar strategy could be used for common neurological gain of function aggregopathies such as Parkinson's, Alzheimer's or Huntington's diseases. The complexity of the central nervous system makes such neurological disorders very difficult diseases to treat, but successful gene therapies have now been reported with the development of integrating (LV) and non-integrating (AAV) vectors with adequate tropisms⁵⁵. Regarding muscular dystrophies, AAV is currently the most promising viral vector for *in vivo* gene therapy applications but the treatment of most muscular dystrophies has been hampered by the necessity to treat the whole musculature, which encompasses 40% of the body weight. OPMD is particularly suitable for such a gene therapy

approach as a very restricted number of muscles are clinically affected, making local intramuscular injections the most realistic approach.

It has previously been demonstrated in cultures of myoblasts that PABPN1 plays an essential role for their proliferation and differentiation ⁶. PABPN1 is considered as an essential gene involved in many biological pathways and its expression is clearly crucial for cell survival ⁵⁷. This was confirmed in drosophila where lethality was observed in *Pabp2* (homolog of human *PABPN1*) mutants and rescued with a *Pabp2* genomic transgene ⁷. Our data in mouse and patient muscle cells confirm these observations as PABPN1 depletion induced drastic muscle degeneration, myofibre turnover in mice and cell death in patient myoblasts. Interestingly we also found that bringing a healthy version of PABPN1 in affected mice and, more importantly, in human myogenic cells, prevented the toxic effect of the PABPN1 knock-down showing that lethal effects due to PABPN1 inhibition can be prevented and cell survival rescued. Furthermore we clearly demonstrated that *in vivo* PABPN1 is required for muscle maintenance. Indeed, like in wildtype mice, in A17 mice the *in vivo* depletion of PABPN1 in skeletal muscle is detrimental and induces drastic muscle turnover. In these mice the shRNA3X construct effectively silenced both normal and mutant endogenous PABPN1 and thus essentially depleted the muscle from all endogenous protein.

The difference in shRNA levels and PABPN1 expression we observed between muscles treated with shRNA3X only and muscles treated with both shRNA3X and optPABPN1 likely reflects the turnover of the shRNA3X-expressing myofibres in the acute muscle degeneration/regeneration processes observed in the group treated with shRNA3X only compared with the groups of mice treated with both vectors (**Figure 3a-c**). We propose that, in muscles treated with shRNA3X only, new endogenous satellite cells carrying the expPABPN1

activated in myoblasts, proliferated and fused to replace the shRNA3X-expressing myofibres that were cleared. During muscle regeneration myoblasts express high level of PABPN1⁵⁸, suggesting an essential role of PABPN1 during tissue repair. Muscle co-expressing shRNA3X and optPABPN1 were protected from the degeneration/regeneration process (i.e. from myofibre turnover) and so maintaining higher level of shRNA molecules and lower levels of expPABPN1. Our data on the combined treatments confirm that the simple reduction of the pathological protein and the consequent abrogation of insoluble nuclear aggregates are not sufficient to rescue the pathology and that at least a small amount of healthy protein needs to be expressed to allow cell survival and skeletal muscle stabilization.

This is consistent with published data showing that the steady-state level of PABPN1 (both protein and mRNA) is drastically lower in skeletal muscle compared to other tissues⁵⁸ which possibly explains why even if the genetic mutation is present bodywide, only the skeletal muscle tissue manifests the clinical signatures of the pathology. Accordingly, the level of PABPN1 in normal muscles of FvB mice is almost undetectable (Trollet 2010, **Figure 2b** on this study).

It has been suggested that the presence of expPABPN1 nuclear aggregates induces in OPMD a depletion of available healthy PABPN1. Therefore the simple expression of a wildtype PABPN1 may be enough to compensate for the PABPN1 segregated into the intranuclear aggregates. Interestingly, in our study, the simple expression of healthy PABPN1 alone was not sufficient to ameliorate the pathology in the A17 mouse model. To the best of our knowledge there is only one study showing the effect of wild type PABPN1 overexpression in OPMD *in vivo* models: Rubinsztein and colleagues have shown that crossing a mouse overexpressing the wildtype bovine version of PABPN1 (i.e. including 10 alanines) with the A17 affected mouse ameliorates the dystrophic pathology reducing muscle cell death due to apoptosis. In their study the amount

of wildtype bovine PABPN1 likely matched the amount of bovine expPABPN1 in A17 mice⁵⁰ However the concurrent expression of the endogenous wildtype murine version unbalanced the amount of PABPN1 towards the healthy protein. This finding confirmed that exceeding the mutated PABPN1 with a healthy version might potentially be enough in patient cells to see a small improvement. Surprisingly we did not achieve such a substantial AAV mediated overexpression *in vivo* of PABPN1 most likely because the system is tightly regulated due to feedback mechanisms that prevent the accumulation of a healthy protein in cells¹⁴ and only a small amount of functional protein can be expressed. Importantly, the expression of PABPN1 in muscles treated with both vectors likely derived only from the optPABPN1 as shown by MYC detection. Expression of optPABPN1 unbalanced the protein expression towards the healthy PABPN1 version and this was sufficient to rescue the phenotype in absence of expPABPN1. Our gene therapy treatment goes beyond the approach described by Rubinsztein and colleagues as we also abrogated the intranuclear inclusions greatly ameliorating several aspects of the disease and essentially normalizing the transcriptome of the A17 mouse to the one of the FvB mice.

To summarize, while it is well known that a short alanine expansion in the PABPN1 protein leads to OPMD, why such mutation causes the pathology is still unknown²⁰. One hypothesis is that the alanine-expansion causes a relative loss-of-function by a decreased availability of healthy PABPN1 at the protein level due, at least partially, to its sequestration in nuclear aggregates (**Figure 7a, b**). Such loss of function is supported by the fact that decreased levels of PABPN1 results in defective myogenesis^{58, 59}. The second hypothesis is that the formation of nuclear aggregates induces a toxic gain of function (**Figure 7a, b**). A pathological role of aggregate is supported by the improving effects of anti-aggregation therapies^{54, 60} and data showing that mutations in PABPN1 preventing aggregation do not lead to muscle pathology in

Drosophila model⁶¹. Our study shows that even by providing optPABPN1 there is no reduction in intranuclear aggregates, no pathology improvement and only a marginal change of muscle transcriptome (**Figure 7c**). Furthermore even abolishing the aggregates by inhibiting the endogenous PABPN1 results in no amelioration of the disease (**Figure 7d**). Only the combined treatment rescues the normal PABPN1 expression and availability (**Figure 7e**). These results demonstrate that PABPN1 aggregation induces in OPMD both a gain of function and a loss of physiological function. Interestingly, the fact that the transcriptome of shRNA3X-treated muscles is closer to the one of the FvB mice compared to the one optPABPN1-treated muscles suggests that the pathology might be more dependent from a gain of function than from a loss of function of PABPN1. This further strengthens the relevance of our study as the combined gene therapy approach counteracts both the toxic gain of function and the loss of function features of OPMD.

Cell therapy is another appealing strategy to counteract OPMD as the treatment could be performed locally so bypassing the issue of a systemic cell delivery. The local administration of autologous myoblasts in the cricopharyngeal muscle has been shown to improve swallowing function (²⁶ and NCT00773227). While safe and associated to beneficial effects on a short term, autologous cells still harbour the mutation. An *ex vivo* gene therapy approach aiming to correct the genetic defect of myoblasts before the injection would be required to guarantee a long lasting effect. We transduced cells derived from patient's biopsies using a lentiviral vector carrying both the shRNA3X and the optPABPN1 cassettes on the same backbone and we showed that the combined strategy was replicating at cellular levels the findings observed *in vivo* by AAV vectors.

The positive outcome in a relevant human model of disease suggests that the single bicistronic construct should also be tested for the AAV-gene therapy strategy, as it would greatly reduce the costs and efforts associated to the large-scale production of 2 AAV vectors. Furthermore, it paves the way for the clinical scenario where autologous myoblasts could be corrected *ex vivo* before transplantation.

In conclusion, our study suggests that OPMD is due to both a gain of toxic function and a loss of function disease. We show for the first time that the *in vivo* gene therapy approach for the treatment of OPMD, a dominant disease model of aggregopathy, efficiently abolishes the formation of nuclear aggregates, normalizes muscle transcriptome and improves crucial hallmarks of the disease such as fibrosis and muscle atrophy while increasing the muscle strength and normalizing the specific maximal force (i.e. the muscle functionality) to that of unaffected muscles in a relevant animal model of the disease. These findings suggest that a similar approach could be used to treat other more common autosomal dominant gain of function neurological diseases and pave the way for the translation of this gene therapy strategy in clinical settings for OPMD.

Materials and Methods

Cell lines and cell transfection and transduction

Human embryonic kidney cells (HEK293T, ATCC, Manassas, USA) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 20 mM HEPES, 10% foetal bovine serum (FBS) and 2 mM glutamine (PAA laboratories, Yeovil, UK) in a humidified 5% CO₂ air atmosphere at 37°C.

Human OPMD primary myoblasts isolated from a quadriceps muscle biopsy were obtained as previously described^{62,63} and provided by Myobank-AFM, France. Muscle biopsy was obtained during surgical procedure after informed consent in accordance with the French legislation on ethical rules. Cells were cultured in growth medium (i.e. 199 Medium (Life Technologies) and DMEM (Life Technologies) in a 1:4 ratio) supplemented with 20% fetal calf serum, 5 ng/ml human epithelial growth factor (Life Technologies), 0.5 ng/ml bFGF, 0.2 μ M dexamethasone (Sigma-Aldrich), 50 μ g/ml fetuin (Life Technologies) and 5 μ g/ml insulin (Life Technologies) in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C.

HEK293T cells were seeded at 300,000 cells/well. The day after, one hour before transfection, the media was replaced with DMEM, 2% serum and no Penicillin-Streptomycin (PS). Cells were transfected with a solution of DMEM without serum and PS at a ratio of 125/1 DMEM/PEI (Polyethylenimine, linear MW 25,000) using DNA plasmids for pAAV-shRNA3X alone or in combination with pAAV-optPABPN1 or pAAV-expPABPN1. As a negative control, HEK293T cells were transfected with the plasmid pAAV-HBVpol which expresses an shRNA against the HBV polymerase gene. 4 μ g per DNA plasmid was used per well. The HEK293T cells were incubated at 37°C in DMEM with 2% FCS in presence of antibiotics for 72 h. Cells were harvested and lysed for analysis by western blotting.

Human myoblasts were seeded at 50,000 cells/well into 6-well plates. The day after, cells were washed once with DMEM alone, and a 1 ml solution of DMEM, 10% FBS and polybrene was added before transducing cells at MOI 100 with lentiviral vectors. The day after, medium was changed and cells were then cultured in growth medium.

Generation of AAV and LV plasmid constructs and vectors.

Three shRNA, called sh-1, sh-2, sh-3, were initially designed to bind common sequences in human, mouse and bovine PABPN1. To generate a triple shRNA cassette (shRNA3X), these shRNAs were cloned downstream of the U61, U69 and H1 RNA polymerase III promoters respectively. The shRNA3X construct was cloned into a self-complementary pAAV2 backbone to generate pscAAV-shRNA3X.

Human PABPN1 fused with a MYC-tag (optPABPN1) and a Kozak sequence was sequence optimized by GeneArt (Waltham, US). Both optPABPN1 and a mutant human expanded PABPN1 tagged with FLAG (expPABPN1) were subcloned into a single stranded AAV2 vector backbone downstream of SPc5-12 muscle specific promoter⁶⁴ to generate pAAV-optPABPN1 and pAAV-expPABPN1. AAV vectors expressing shRNA3X or optPABPN1 (scAAV2/8-shRNA3X and ssAAV2/9-optPABPN1 respectively) were prepared with the standardized double transfection protocol. Briefly, HEK293T cells were seeded in roller bottles and cultured in DMEM at 37°C and 5% CO₂. When 50% confluent, cells were transfected using PEI with either pAAV-shRNA3X or pAAV-optPABPN1 and respectively pAAV helper cap8 (pDP8.ape) or pAAV helper cap9 plasmids (pDP9rs) and cultured in roller bottles for 3 more days. Cells were lysed and recombinant pseudotyped AAV vector particles were purified by iodixanol (Sigma-Aldrich) step-gradient ultracentrifugation. The copy number of vector genomes was quantified by dot blot hybridization and quantitative polymerase chain reaction (qPCR). The titres of the AAV batches used for the *in vivo* application in this study were 1×10^{12} viral particles (vp)/ml for scAAV2/8-shRNA3X and 5.2×10^{12} vp/ml for ssAAV2/9-optPABPN1. For local injection in C57BL/6 mice control muscles were dosed with a single strand AAV8-CMV-GFP (ssAAV8-GFP) prepared using the protocol described for the other AAV vectors. Lentivirus (LV) vectors expressing the same triple shRNA cassette (shRNA3X) driven by the same RNA polymerase III

promoters (U61, U69 and H1) were produced by subcloning the expression cassette into a LV backbone together with a PGK-eGFP expression cassette. The optPABPN1 sequence was subcloned into a LV vector backbone where its expression was driven by SPc5-12 muscle specific promoter (**suppl. Fig 1**). Unconcentrated and concentrated lentivirus were produced using HEK293T transfection⁶⁵. Briefly, HEK293T were cultured in DMEM high glucose-containing medium supplemented with 10% foetal calf serum (37°C and 5% CO₂). Lentiviral production was performed using a DNA/CaCl₂ transfection mix of a combination of the lentiviral vector, packaging plasmids and an envelope expressing plasmid. 48 h post transfection, the medium containing lentiviruses was harvested and spun down by centrifugation to remove cells debris. The supernatant was filtered (0.22 µm) to get a final clarified solution. The filtrate was transferred into ultracentrifuge tubes and centrifuged at 4°C for 1h 30 min at 22,000 rpm. Lentiviral pellets were suspended in PBS and left at 4°C for at least 2 h (up to overnight). The final clear viral solution was aliquoted and stored at -80°C until use. Titration was performed by qPCR and flux cytometry.

In vivo experiments

A17.1 transgenic mice (called here A17) have previously been described^{24,27}. A17 mice and WT FvB controls were generated by crossing the heterozygous carrier strain A17 with the FvB background mice and genotyped by PCR for bovine PABPN1 four weeks after birth. C57Bl6 mice were obtained from Janvier Labs. Animals were housed with food and water *ad libitum* in minimal disease facilities (Royal Holloway, University of London). *In vivo* experiments were conducted under statutory Home Office recommendation; regulatory, ethics, and licensing procedures and the Animals (Scientific Procedures) Act 1986. Briefly, 10-12 week old A17 mice

were anaesthetised with isoflurane and 2.5×10^{10} (vp) of scAAV8-shRNA3X or 1.3×10^{11} vp of ssAAV9-optPABPN1 or the two vector in combination were diluted in 50 μ l saline and intramuscularly administered into both *tibialis anterior* (TA) muscles. Saline injected TA of both A17 mice and FvB mice, were used as negative and healthy controls respectively. C57BL6 mice were injected in the TA muscle with 2.5×10^{10} vp of scAAV8-shRNA3X or with 2.5×10^{10} vp of ssAAV8-GFP in the contralateral TA as a control. At 18 weeks post-injection, mice were anaesthetized with pentobarbital, and *in situ* TA muscle physiology was performed. After analysis mice were weighed, sacrificed and TA muscles were excised from tendon to tendon, weighed and frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane.

Muscle force measurement

Mice were anaesthetised using a pentobarbital solution (intraperitoneus, 60 mg/kg) and contractile properties of TA muscles were analysed by *in situ* muscle electrophysiology as previously described⁶⁶. The knee and foot were fixed with clamps and the distal tendons of the muscles were attached to an isometric transducer (Harvard Bioscience) using a silk ligature. The sciatic nerves were proximally crushed and distally stimulated by a bipolar silver electrode using supramaximal square wave pulses of 0,1 ms duration. All data provided by the isometric transducer were recorded and analysed using the PowerLab system (4SP, AD Instruments). All isometric measurements were made at an initial length L₀ (length at which maximal tension was obtained during the tetanus). Response to tetanic stimulation (pulse frequency: 75-150 Hz) was recorded and the maximal force was determined. After contractile measurements muscles were collected, weighed to calculate the specific maximal force and frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen and stored at -80°C.

RT-qPCR analysis

Total RNA was extracted from skeletal muscles using Trizol (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. RNA quality and purity was determined using a ND-1000 NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies) and RNA (50-250 ng for muscle biopsies, 1-3 µg for cell pellet) was reverse transcribed using M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. cDNA was used for quantitative PCR reaction using SYBR green mix buffer (LightCycler® 480 Sybr green I Master) in a total of 9 µl reaction volume. PCR reactions were performed as follows: 8 min at 95°C followed by 50 cycles: 15 s at 95°C, 15 s at 60°C and 15 s at 72°C. The specificity of the PCR products was checked by melting curve analysis using the following program: 65°C increasing by 0.11°C/s to 97°C. The expression level of each mRNA was normalized against murine *RPLP0* mRNA (large ribosomal protein, subunit P0) expression. Expression levels were calculated according to the $\Delta\Delta C_t$ method. The sequences of primers used for RT-PCR and for qRT-PCR are included as supplementary data.

Affymetrix Mouse 2.0 ST Arrays Expression Profiling

Quality control was performed on total RNA extracted from mouse muscles using a Nanodrop and Bioanalyzer (Agilent technologies, Santa Clara, CA). RNA quality and purity was determined using a ND-1000 NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies) followed by Quality Control analysis (Agilent 2100 Bioanalyzer, Eukaryote Total RNA Nano assay, Agilent RNA 6000 Nano Kit, Agilent RNA Nano LabChip) to determine the RNA integrity number (RIN, 28S/18S ratio). Ninety ng of total RNA per sample was further processed using

the GeneChip® WT PLUS Reagent Kit for whole transcript expression profiling (Affymetrix, Santa Clara, CA). The sense strand single stranded (ss) cDNA was purified, fragmented, labeled using DNA labeled reagent and then hybridized overnight onto the Mouse 2.0 ST arrays (100 or 81/4-Format). Prior to hybridization, the arrays were registered on GeneChip® Command Console® Software (AGCC) (Affymetrix, Santa Clara, CA). After the overnight hybridization, the arrays were washed and stained using the GeneChip® Hybridization on a Fluidics 450 station (Affymetrix, Santa Clara, CA) and then scanned using the AGCC scan control software (Affymetrix, Santa Clara, CA). The raw data “cel” files were analyzed using Bioconductor (R software ⁶⁷). Raw signal intensities were quantile normalized with oligo package ⁶⁸ and differential expression analysis was performed using the limma package ⁶⁹. Principal component analysis was performed using prcomp function and rgl package.

Quantification of shRNA 1-3 copy number in muscles

For shRNA copy number analysis, custom reverse transcription (RT) and quantitative PCR (qPCR) assays were developed for each hairpin. Standard curves used for absolute quantification were generated for each sequence utilizing a 10-fold dilution series (10^8 - 10^2 copies) of HPLC-purified RNA oligos (Sigma Aldrich). Diluted RNA oligo standards and 50 ng of purified RNA from each TA muscle sample were reverse transcribed into cDNA using miScript II RT kit (Qiagen) according to manufacturers instructions and a 2 µl aliquot of the 5-fold diluted cDNA from the reverse transcription reaction was used as template in the subsequent qPCR assay (miScript SYBR Green PCR kit, Qiagen). qPCR reaction master mix and program settings were followed according to manufactures' instructions except for the use of a 4 µM forward primer specific to the hairpin sequence.

Western blot

Lysates from *in vitro* experiments were prepared by homogenising cells in RIPA buffer containing: 0.15 M NaCl, 0.1% SDS, 50 mM Tris (pH8), 2 mM EDTA and 10% Triton-X-100 with protease inhibitor cocktail (Complete, Roche Diagnostics). Muscle lysates were prepared by homogenising tissue in RIPA solution (NaCl 0.15 M, HEPES 0.05 M, NP-40 1%, sodium deoxycholate 0.5%, SDS 0.10%, EDTA 0.01 M) with protease inhibitor cocktail. Proteins were separated on 4-12% Bis-Tris gel (Invitrogen) and transferred onto a nitrocellulose membrane (Hybond ECL membrane; Amersham Biosciences) for 1 h at 30 V constant. Membrane was blocked by incubation in 5% milk in 0.1 M PBS, 0.2% Tween-20 for 1 h at room temperature (RT). Membrane was stained with primary antibodies raised against PABPN1 (Abcam rabbit monoclonal, ab75855, 1/10,000, overnight (ON)), Vinculin (Sigma-Aldrich mouse monoclonal, 1/10000, ON), GAPDH (Abcam mouse monoclonal, 1/2500, ON) MYC-tag (Abcam rabbit polyclonal, ab9106, 1/5000, ON). Membranes were then incubated with appropriate secondary antibodies conjugated either to the fluorochrome 800 (Li-cor, 1:10000, 1 h RT) or to Horseradish peroxidase (HRP). The Odyssey system (Licor) and the G:Box system (Syngene) were used to detect the signals from the membranes.

Histology and Immunofluorescence analysis

Muscles were cross-sectioned at 10 μ m thickness using a Bright OTF 5000 cryostat (Bright Instruments, Huntingdon, UK). The tissue sections were placed on coated glass slides (VWR, Lutterworth, UK) and stored at -80°C prior to use. The following antibodies were used for immunohistochemical staining: anti-PABPN1 (rabbit monoclonal, diluted 1:100, Abcam

ab75855, ON, 4°C), anti-Laminin (rat monoclonal; diluted 1:800; Sigma-Aldrich, 1 h RT) or anti-collagen VI (rabbit polyclonal, Abcam ab6588, 1:200, 1 h RT). Secondary antibodies were Alexa fluor (Molecular Probes) conjugated to 488 or 594 fluorochromes. For nuclear aggregates PABPN1 immunostaining, a published protocol^{24, 27} was modified to counterstain the sarcolemma with Laminin. Briefly, slides were fixed in Paraformaldehyde 4% and soluble proteins were removed by incubating with KCl buffer (1 M KCl, 30 mM HEPES, 65 mM PIPES, 10 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, pH 6.9) for 1 h at RT. Sections were then blocked for 1 h with 1% normal goat serum in 0.1 M PBS, 0.1% Triton X100 and then incubated overnight at 4°C with PABPN1 primary antibody diluted in the same buffer. Slides were then incubated with the anti-Laminin antibody (SIGMA, rat monoclonal 1:800, 1 h RT). After washings, sections were incubated with fluorophore-conjugated secondary antibodies. Slides were mounted with mounting medium Vector containing 4',6-diamidino-2- phenylindole (DAPI; 3 µg/ml; Sigma-Aldrich Ltd.) to visualise nuclei. For all the analyses the largest section of individual muscles was chosen and NIH imageJ analysis software was used for the analyses. A standard protocol for Haematoxylin and Eosin (H&E) staining was used to calculate the percentage of centrally nucleated fibres.

Statistical Analysis

All data are presented as mean values ± standard error of the mean. Statistical analyses were performed using the Student *t*-test, the two-way Anova with the Bonferroni post-hoc analysis or the Chi-squared analysis. GraphPad Prism (version 4.0b; GraphPad Software, San Diego California, USA) was used for the analyses. A difference was considered to be significant at **P* < 0.05, ***P* < 0.01 or ****P* < 0.001.

Supplementary Materials

Fig. S1. Distribution of myofibre cross sectional area (CSA) in treated muscles.

Fig. S2. LV constructs used for the transduction of HEK293T cells and human OPMD myoblasts.

Fig. S3. PABPN1 inhibition in human HEK293T cells induces cell death that can be prevented by optPABPN1 co-expression.

References

1. Bouchard JP, Brais B, Brunet D, Gould PV, Rouleau GA. Recent studies on oculopharyngeal muscular dystrophy in Quebec. *Neuromuscul Disord* **7 Suppl 1**, S22-29 (1997).
2. Trollet C, Gidaro T, Klein P, Perie S, Butler-Browne G, Lacau St Guily J. Oculopharyngeal Muscular Dystrophy. (1993).
3. Brais B, *et al.* Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nat Genet* **18**, 164-167 (1998).
4. Banerjee A, Apponi LH, Pavlath GK, Corbett AH. PABPN1: molecular function and muscle disease. *FEBS J* **280**, 4230-4250 (2013).
5. Eckmann CR, Rammelt C, Wahle E. Control of poly(A) tail length. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2**, 348-361 (2011).
6. Apponi LH, Leung SW, Williams KR, Valentini SR, Corbett AH, Pavlath GK. Loss of nuclear poly(A)-binding protein 1 causes defects in myogenesis and mRNA biogenesis. *Hum Mol Genet* **19**, 1058-1065 (2009).

7. Benoit B, *et al.* An essential cytoplasmic function for the nuclear poly(A) binding protein, PABP2, in poly(A) tail length control and early development in *Drosophila*. *Dev Cell* **9**, 511-522 (2005).
8. Nguyen D, Grenier St-Sauveur V, Bergeron D, Dupuis-Sandoval F, Scott MS, Bachand F. A Polyadenylation-Dependent 3' End Maturation Pathway Is Required for the Synthesis of the Human Telomerase RNA. *Cell Rep* **13**, 2244-2257 (2015).
9. de Klerk E, *et al.* Poly(A) binding protein nuclear 1 levels affect alternative polyadenylation. *Nucleic Acids Res* **40**, 9089-9101 (2012).
10. Jenal M, *et al.* The poly(a)-binding protein nuclear 1 suppresses alternative cleavage and polyadenylation sites. *Cell* **149**, 538-553 (2012).
11. Beaulieu YB, Kleinman CL, Landry-Voyer AM, Majewski J, Bachand F. Polyadenylation-dependent control of long noncoding RNA expression by the poly(A)-binding protein nuclear 1. *PLoS Genet* **8**, e1003078 (2012).
12. Lemay JF, *et al.* The nuclear poly(A)-binding protein interacts with the exosome to promote synthesis of noncoding small nucleolar RNAs. *Mol Cell* **37**, 34-45 (2010).
13. Bresson SM, Conrad NK. The human nuclear poly(a)-binding protein promotes RNA hyperadenylation and decay. *PLoS Genet* **9**, e1003893 (2013).
14. Bergeron D, Pal G, Beaulieu YB, Chabot B, Bachand F. Regulated Intron Retention and Nuclear Pre-mRNA Decay Contribute to PABPN1 Autoregulation. *Mol Cell Biol* **35**, 2503-2517 (2015).
15. Muniz L, Davidson L, West S. Poly(A) Polymerase and the Nuclear Poly(A) Binding Protein, PABPN1, Coordinate the Splicing and Degradation of a Subset of Human Pre-mRNAs. *Mol Cell Biol* **35**, 2218-2230 (2015).

16. Jouan L, *et al.* An 18 alanine repeat in a severe form of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Can J Neurol Sci* **41**, 508-511 (2014).
17. Richard P, *et al.* PABPN1 (GCN)11 as a Dominant Allele in Oculopharyngeal Muscular Dystrophy –Consequences in Clinical Diagnosis and Genetic Counselling. *Journal of Neuromuscular Diseases* **2**, 175–180 (2015).
18. Gidaro T, *et al.* Atrophy, Fibrosis, and Increased PAX7-Positive Cells in Pharyngeal Muscles of Oculopharyngeal Muscular Dystrophy Patients. *J Neuropathol Exp Neurol* **72**, 234-243 (2013).
19. Tome FM, Fardeau M. Nuclear inclusions in oculopharyngeal dystrophy. *Acta Neuropathol* **49**, 85-87 (1980).
20. Winklhofer KF, Tatzelt J, Haass C. The two faces of protein misfolding: gain- and loss-of-function in neurodegenerative diseases. *EMBO J* **27**, 336-349 (2008).
21. Eisele YS, *et al.* Targeting protein aggregation for the treatment of degenerative diseases. *Nat Rev Drug Discov* **14**, 759-780 (2015).
22. Becher MW, Kotzuk JA, Davis LE, Bear DG. Intranuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy contain poly(A) binding protein 2. *Ann Neurol* **48**, 812-815 (2000).
23. Harish P, Malerba A, Dickson G, Bachtarzi H. Progress on gene therapy, cell therapy, and pharmacological strategies toward the treatment of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Hum Gene Ther* **26**, 286-292 (2015).
24. Trollet C, *et al.* Molecular and phenotypic characterization of a mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy reveals severe muscular atrophy restricted to fast glycolytic fibres. *Hum Mol Genet* **19**, 2191-2207 (2010).

25. Palmer PM, Neel AT, Sprouls G, Morrison L. Swallow characteristics in patients with oculopharyngeal muscular dystrophy. *J Speech Lang Hear Res* **53**, 1567-1578 (2010).
26. Perie S, *et al.* Autologous myoblast transplantation for oculopharyngeal muscular dystrophy: a Phase I/IIa clinical study. *Mol Ther*, (2013).
27. Davies JE, *et al.* Doxycycline attenuates and delays toxicity of the oculopharyngeal muscular dystrophy mutation in transgenic mice. *Nat Med* **11**, 672-677 (2005).
28. Chartier A, *et al.* Mitochondrial dysfunction reveals the role of mRNA poly(A) tail regulation in oculopharyngeal muscular dystrophy pathogenesis. *PLoS Genet* **11**, e1005092 (2015).
29. Davies JE, Berger Z, Rubinsztein DC. Oculopharyngeal muscular dystrophy: potential therapies for an aggregate-associated disorder. *Int J Biochem Cell Biol* **38**, 1457-1462 (2006).
30. Barbezier N, *et al.* Antiprion drugs 6-aminophenanthridine and guanabenz reduce PABPN1 toxicity and aggregation in oculopharyngeal muscular dystrophy. *EMBO Mol Med* **3**, 35-49.
31. Davies JE, Rose C, Sarkar S, Rubinsztein DC. Cystamine suppresses polyalanine toxicity in a mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Sci Transl Med* **2**, 34ra40 (2010).
32. Verheesen P, *et al.* Prevention of oculopharyngeal muscular dystrophy-associated aggregation of nuclear polyA-binding protein with a single-domain intracellular antibody. *Hum Mol Genet* **15**, 105-111 (2006).

33. Millington-Ward S, *et al.* Suppression and replacement gene therapy for autosomal dominant disease in a murine model of dominant retinitis pigmentosa. *Mol Ther* **19**, 642-649 (2011).
34. O'Reilly M, *et al.* RNA interference-mediated suppression and replacement of human rhodopsin in vivo. *Am J Hum Genet* **81**, 127-135 (2007).
35. Kaepffel C, *et al.* A largely random AAV integration profile after LPLD gene therapy. *Nat Med* **19**, 889-891 (2013).
36. Mingozzi F, High KA. Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood* **122**, 23-36 (2013).
37. Borel F, Kay MA, Mueller C. Recombinant AAV as a platform for translating the therapeutic potential of RNA interference. *Mol Ther* **22**, 692-701 (2014).
38. Bennett J, *et al.* AAV2 gene therapy readministration in three adults with congenital blindness. *Sci Transl Med* **4**, 120ra115 (2012).
39. MacLaren RE, *et al.* Retinal gene therapy in patients with choroideremia: initial findings from a phase 1/2 clinical trial. *Lancet* **383**, 1129-1137 (2014).
40. Maguire AM, *et al.* Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* **358**, 2240-2248 (2008).
41. Nathwani AC, *et al.* Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N Engl J Med* **371**, 1994-2004 (2014).
42. Tardieu M, *et al.* Intracerebral administration of adeno-associated viral vector serotype rh.10 carrying human SGSH and SUMF1 cDNAs in children with mucopolysaccharidosis type IIIA disease: results of a phase I/II trial. *Hum Gene Ther* **25**, 506-516 (2014).

43. Hwu WL, *et al.* Gene therapy for aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Sci Transl Med* **4**, 134ra161 (2014).
44. Mendell JR, *et al.* A phase 1/2a follistatin gene therapy trial for becker muscular dystrophy. *Mol Ther* **23**, 192-201 (2015).
45. Herson S, *et al.* A phase I trial of adeno-associated virus serotype 1-gamma-sarcoglycan gene therapy for limb girdle muscular dystrophy type 2C. *Brain* **135**, 483-492 (2012).
46. Bowles DE, *et al.* Phase 1 gene therapy for Duchenne muscular dystrophy using a translational optimized AAV vector. *Mol Ther* **20**, 443-455 (2012).
47. Bisset DR, *et al.* Therapeutic impact of systemic AAV-mediated RNA interference in a mouse model of myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* **24**, 4971-4983 (2015).
48. Li C, Xiao P, Gray SJ, Weinberg MS, Samulski RJ. Combination therapy utilizing shRNA knockdown and an optimized resistant transgene for rescue of diseases caused by misfolded proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 14258-14263 (2011).
49. Stanek LM, *et al.* Silencing mutant huntingtin by adeno-associated virus-mediated RNA interference ameliorates disease manifestations in the YAC128 mouse model of Huntington's disease. *Hum Gene Ther* **25**, 461-474 (2014).
50. Davies JE, Sarkar S, Rubinsztein DC. Wild-type PABPN1 is anti-apoptotic and reduces toxicity of the oculopharyngeal muscular dystrophy mutation. *Hum Mol Genet* **17**, 1097-1108 (2008).
51. Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, Rabinowitz JE. Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther* **16**, 1073-1080 (2008).

52. Wang Z, *et al.* Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nat Biotechnol* **23**, 321-328 (2005).
53. McCarty DM. Self-complementary AAV vectors; advances and applications. *Mol Ther* **16**, 1648-1656 (2008).
54. Davies JE, Sarkar S, Rubinsztein DC. Trehalose reduces aggregate formation and delays pathology in a transgenic mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* **15**, 23-31 (2006).
55. Kumar SR, Markusic DM, Biswas M, High KA, Herzog RW. Clinical development of gene therapy: results and lessons from recent successes. *Molecular therapy Methods & clinical development* **3**, 16034 (2016).
56. Kharma N, *et al.* Automated design of hammerhead ribozymes and validation by targeting the PABPN1 gene transcript. *Nucleic Acids Res*, (2015).
57. Zhang R, Lin Y. DEG 5.0, a database of essential genes in both prokaryotes and eukaryotes. *Nucleic Acids Res* **37**, D455-458 (2009).
58. Apponi LH, Corbett AH, Pavlath GK. Control of mRNA stability contributes to low levels of nuclear poly(A) binding protein 1 (PABPN1) in skeletal muscle. *Skelet Muscle* **3**, 23 (2013).
59. Riaz M, *et al.* PABPN1-Dependent mRNA Processing Induces Muscle Wasting. *PLoS Genet* **12**, e1006031 (2016).
60. Abu-Baker A, Messaed C, Laganiere J, Gaspar C, Brais B, Rouleau GA. Involvement of the ubiquitin-proteasome pathway and molecular chaperones in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* **12**, 2609-2623 (2003).

61. Chartier A, Benoit B, Simonelig M. A *Drosophila* model of oculopharyngeal muscular dystrophy reveals intrinsic toxicity of PABPN1. *Embo J* **25**, 2253-2262 (2006).
62. Bigot A, *et al.* Large CTG repeats trigger p16-dependent premature senescence in myotonic dystrophy type 1 muscle precursor cells. *Am J Pathol* **174**, 1435-1442 (2009).
63. Mamchaoui K, *et al.* Immortalized pathological human myoblasts: towards a universal tool for the study of neuromuscular disorders. *Skelet Muscle* **1**, 34 (2011).
64. Li X, Eastman EM, Schwartz RJ, Draghia-Akli R. Synthetic muscle promoters: activities exceeding naturally occurring regulatory sequences. *Nat Biotechnol* **17**, 241-245 (1999).
65. Zennou V, *et al.* The HIV-1 DNA flap stimulates HIV vector-mediated cell transduction in the brain. *Nat Biotechnol* **19**, 446-450 (2001).
66. Vignaud A, Ramond F, Hourde C, Keller A, Butler-Browne G, Ferry A. Diabetes provides an unfavorable environment for muscle mass and function after muscle injury in mice. *Pathobiology* **74**, 291-300 (2007).
67. Team RC. *R: A language and environment for statistical computing* (2016).
68. Carvalho BS, Irizarry RA. A framework for oligonucleotide microarray preprocessing. *Bioinformatics* **26**, 2363-2367 (2010).
69. Ritchie ME, *et al.* limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* **43**, e47 (2015).

Acknowledgments: We thank the iVector ICM Vectorology Core facility for lentiviral productions (ICM, Brain and Spine Institute, F-75013, Paris, France). MYOBANK-AFM from the Institute of Myology, (Eurobiobank, code BB-0033-00012) for providing the human OPMD myoblasts. We thank Karuna Panchapakesan and Susan Knobloch from the Children's National

Medical Center (Washington, USA) for the arrays expression profiling. We thank Ludovic Arandel for technical support. The authors acknowledge the OPMD patients for their collaboration. **Funding:** This work was supported by Benitec Biopharma LTD, the Centre National pour la Recherche Scientifique, the Association Française contre les Myopathies [Research Programs 15123 and 17110], the University Paris VI Pierre et Marie Curie, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Fondation de l'Avenir [project ET1-622]. PK has a salary from the Ministère de l'Éducation Nationale de la Recherche et de Technologie. **Author contributions:** GD, CT conceived and designed the study. AM, PK, HB, SAJ, MPE, AF, VS, MO, KM performed research and AM, PK, SCB, JLSG, VM, MG, GBB, DAS, GD, CT analyzed the research. AM, PK, GD, CT wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript. **Competing interests:** A patent named "Reagents for treatment of oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) and use thereof" has been filed by Benitec biopharma". David A Suhy, Vanessa Strings and Michael Graham are employees of Benitec biopharma. The authors declare that they have no other conflict of interest other than those listed above.

Figures:

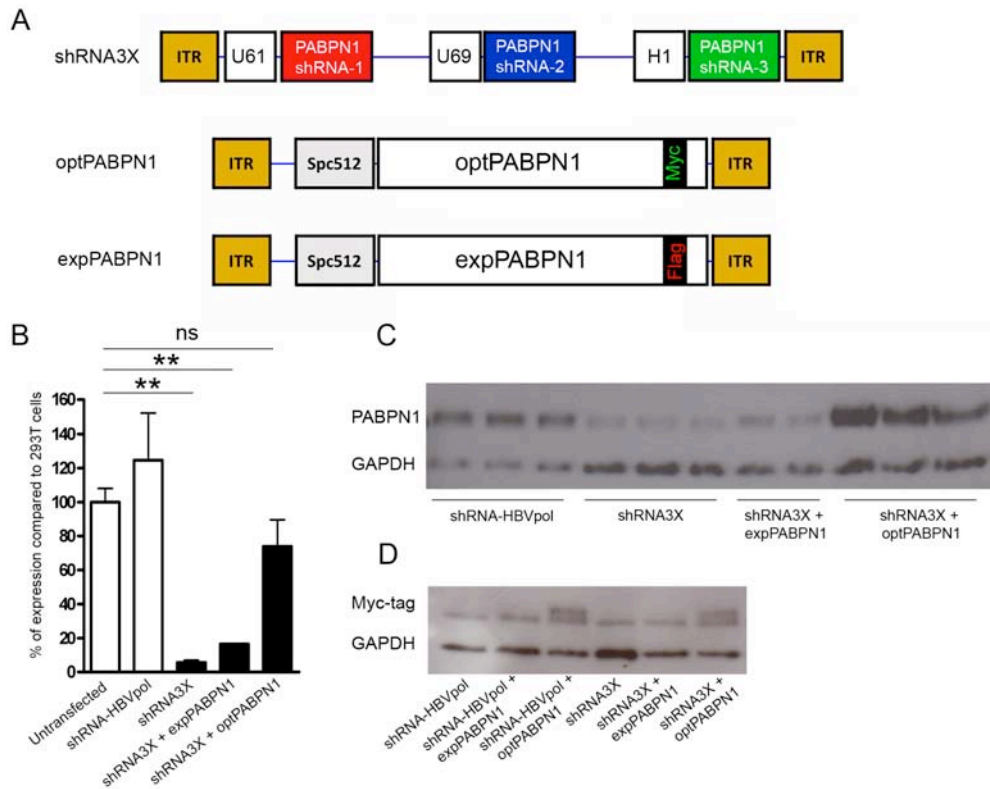


Figure 1: The tricistronic construct efficiently silences endogenous healthy and expanded PABPN1 without affecting optPABPN1 expression in vitro.

(a) 3 constructs were cloned into pAAV vectors and used in this study: a tricistronic shRNA construct including hairpins sh-1, sh-2, sh-3 driven each by a different polymerase-III promoter (U61, U69 and H1 respectively), the sequence optimized PABPN1 (optPABPN1) driven by the SPc5-12 promoter and tagged with a MYC-tag and the human expanded PABPN1 (expPABPN1) driven by the SPc5-12 promoter and tagged with a FLAG-tag. (b) HEK293T cells were transfected with 4 μ g/well of pAAV-shRNA3X in triplicate with or without AAV plasmids expressing expPABPN1 or optPABPN1. Untransfected cells and cells transfected with AAV plasmid expressing shRNA for HBV polymerase gene (HBVpol) were used as a control. 72 h

post-transfection, samples were collected and PABPN1 was detected by western blot and quantified by densitometric analysis using ImageJ software. PABPN1 expression in each condition was normalized by GAPDH expression level and then by the value of untransfected cells. Transfection with a plasmid expressing shRNA3X induced efficient PABPN1 knockdown. The co-expression with optPABPN1 restored PABPN1 expression to the normal level. **(c)** Representative image of a western blot used for these analyses. **(d)** Only in samples prepared from cells transfected with pAAV-opPABPN1, the MYC-Tag is detected by western blot. Detection of MYC-Tag shows that optPABPN1 is resistant to degradation by shRNA3X *in vitro*. One-way Anova test with Bonferroni post-hoc test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ns: not significant.

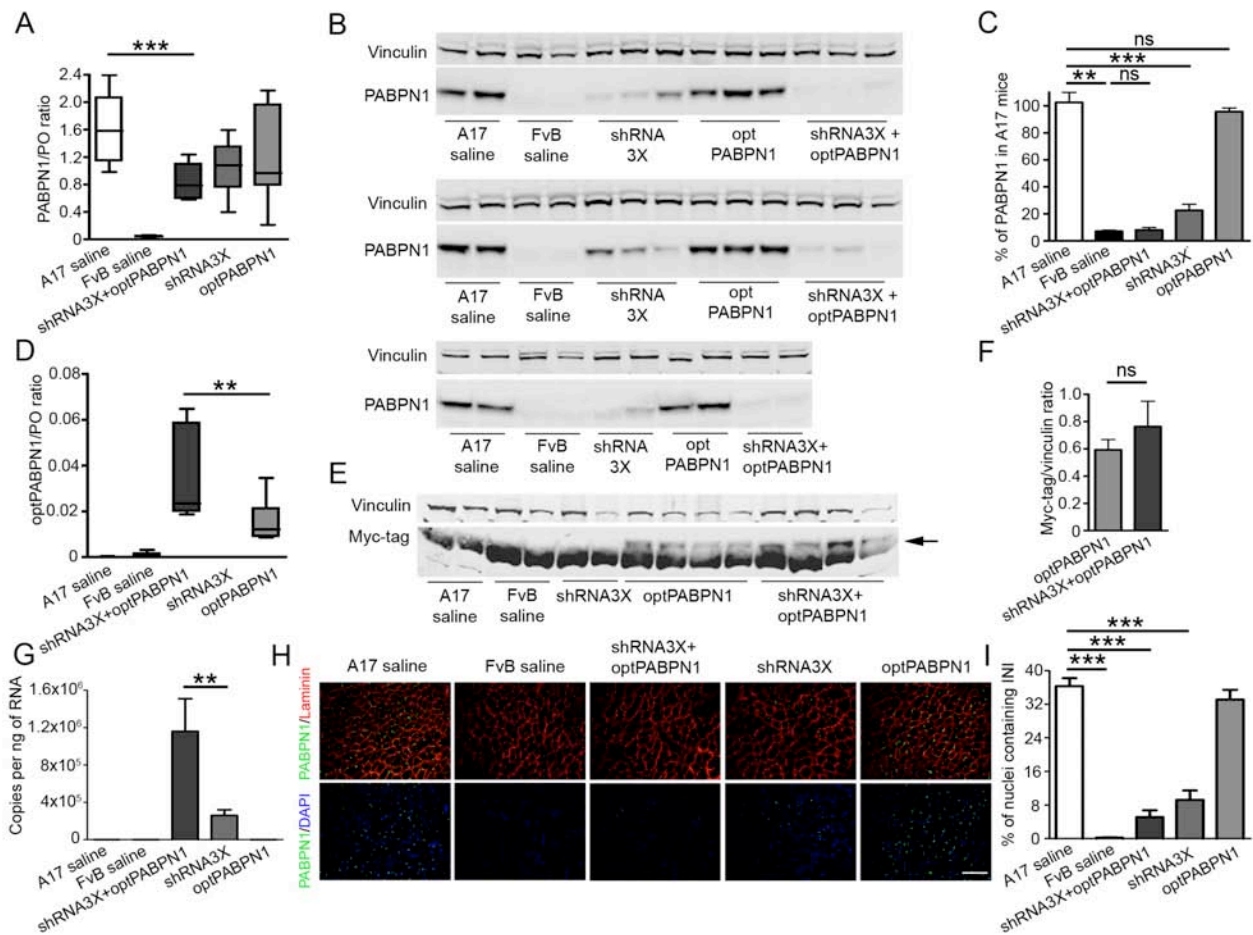


Figure 2: Tricistronic shRNA delivered in vivo by AAV vectors efficiently down-regulates endogenous PABPN1 without affecting optPABPN1 expression in vivo.

Eighteen weeks after intramuscular AAV injections, muscles were collected and expression of PABPN1 was analysed. (a) qRT-PCR analysis of *PABPN1* mRNA normalized to the housekeeping gene *Rplp0* mRNA shows decrease in PABPN1 expression in muscles injected with shRNA3X or both shRNA3X and optPABPN1 (mean \pm SEM). (b) Western blot for PABPN1 expression shows that the treatments with AAV-shRNA3X alone or in combination

with AAV-optPABPN1 efficiently knockdown the endogenous PABPN1. **(c)** Densitometric analysis of western blot for PABPN1 detection shows statistically significant reduction in protein expression when muscles are treated with shRNA3X compared to the level of A17 muscles. PABPN1 expression was normalized to the relative vinculin expression. **(d)** qRT-PCR analysis for *optPABPN1* mRNA normalized to the housekeeping gene *Rplp0* mRNA shows increased expression in muscles where AAV-optPABPN1 was injected. **(e)** Representative western blot for MYC-tag shows that the epitope is detected in all muscles treated with AAV-optPABPN1 alone or in combination with AAV-shRNA3X. The arrow shows the band detected at the correct molecular weight. The lower band represents the endogenous MYC expressed by muscle tissue. **(f)** Averages obtained by densitometric analysis of MYC-tag detected in samples treated with AAV-optPABN1 only (n=8) or with both AAV-shRNA3X and optPABPN1 viral vectors (n=8) indicates that shRNA3X does not affect optPABPN1 protein amount when co-expressed in muscles injected with both vectors. **(g)** Quantification of shRNA expression by qRT-PCR shows the expression of shRNAs in muscles treated with the tricistronic cassette and tricistronic cassette with optPABPN1. **(h)** Detection of PABPN1 and Laminin by Immunofluorescence in sections of treated muscles. Sections were pre-treated with 1 M KCl to discard all soluble aggregates from the tissue. **(i)** Quantification of percentage of nuclei containing intranuclear inclusions (INIs) in muscle sections indicates that treatments with either AAV-shRNA3X or both AAV-shRNA3X and optPABPN1 reduce the amount of INIs to about 10% and 5% respectively compared to saline injected A17, whereas expression of optPABPN1 only does not have any effect. One-way Anova test with Bonferroni post-doc test **p<0.01, ***p<0.001, ns: not significant.

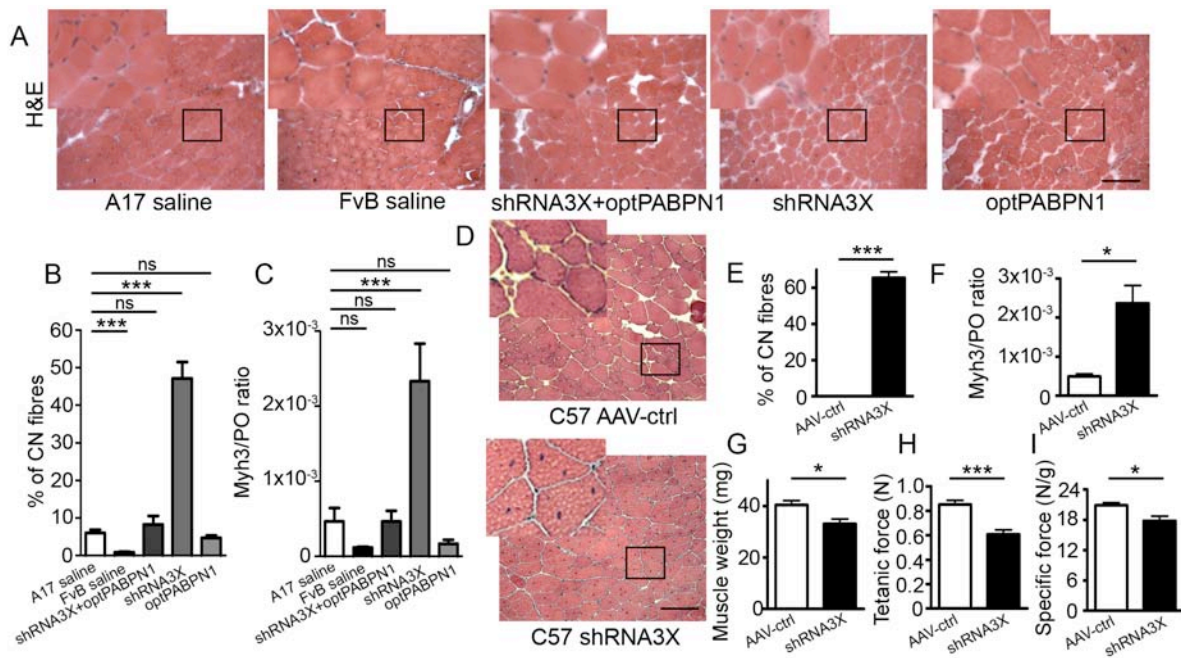


Figure 3: In vivo PABPN1 depletion induces muscle degeneration that can be prevented by co-optPABPN1 expression

(a) Haematoxylin and Eosin staining of sections from treated muscles shows that depleting endogenous PABPN1 in A17 muscles increases the amount of centrally nucleated fibres. (b) Quantification of centrally nucleated fibres indicates that co-injecting AAV-optPABPN1 preserves the amount of fibres with central nuclei to the same level observed in saline injected A17 muscles so preventing muscle degeneration. (c) qRT-PCR analysis of *Myh3* mRNA encoding embryonic MHC normalized to the housekeeping gene *RplP0* mRNA. (mean ± SEM) confirms the regeneration process in shRNA3X treated muscles. (d) Haematoxylin and Eosin staining of sections from treated muscles shows that depleting endogenous PABPN1 in WT muscles increases the amount of centrally nucleated fibres. (e) Quantification of centrally nucleated fibres in treated muscles indicated that PABPN1 depletion in WT muscles induce muscle degeneration as for A17 treated muscles. (f) qRT-PCR analysis of *Myh3* mRNA encoding embryonic MHC normalized to the housekeeping gene *RplP0* mRNA (mean ± SEM)

shows that a regeneration process is ongoing in shRNA3X treated muscles. **(g)** PABPN1 depletion in WT muscles reduced muscle weight compared to contralateral muscles, **(h, i)** PABPN1 inhibition decreased both maximal tetanic and specific force generated by TA muscles of wild type mice. (mean \pm SEM n = 6) One-way Anova test with Bonferroni post-doc test, *p<0.05, ***p<0.001, ns: not significant.

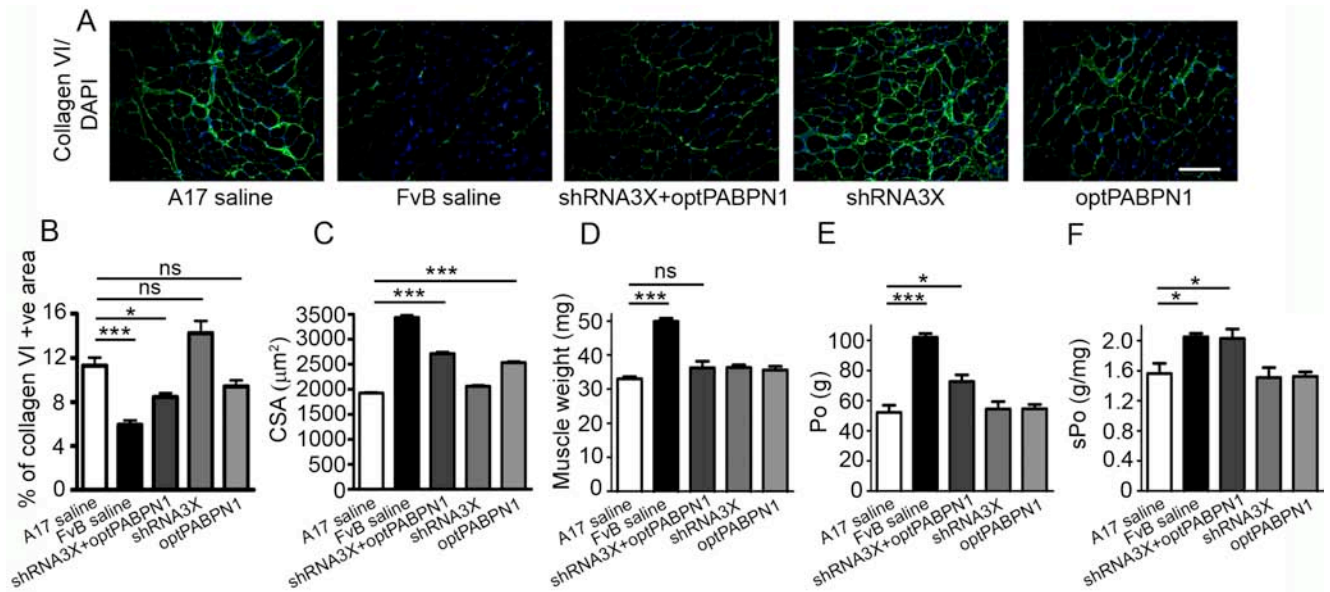


Figure 4: in vivo co-administration of AAV-shRNA3X and AAV-optPABPN1 prevents muscle fibrosis and myofibre atrophy and improves the functionality of treated muscles

(a) Representative images of immunostaining for Collagen VI in treated muscles **(b)** Morphometric evaluation of collagen VI immunostaining in treated muscles shows a significant reduction in fibrosis in muscles treated with AAVs expressing either optPABPN1 or a combination of shRNA3X and optPABPN1 compared to saline treated muscles. **(c)** The average of myofibre sizes per group shows that myofibres of muscles treated with AAV-optPABPN1 only or in combination with AAV-shRNA3X are larger than myofibres of muscles treated with saline. **(d)** Eighteen weeks after AAVs injection no difference was detected in muscle weight of AAV-treated muscles compared to saline injected TA of A17 mice. **(e)** Maximal force generated

by TA muscles of treated mice was measured by *in situ* muscle physiology: co-injecting AAV-shRNA3X and AAV-optPABPN1 significantly increased the maximal force generated by TA muscles. (f) Normalization of maximal force by muscle weight provides a measure of the muscle strength per unit of skeletal muscle called specific maximal force. The co-injection of the two AAVs normalized the specific maximal force of TA muscles to the level detected by wild type muscles. Mean \pm SEM n = 5-8, One-way Anova test with Bonferroni post-doc test, or Chi-squared analysis, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ns: not significant.

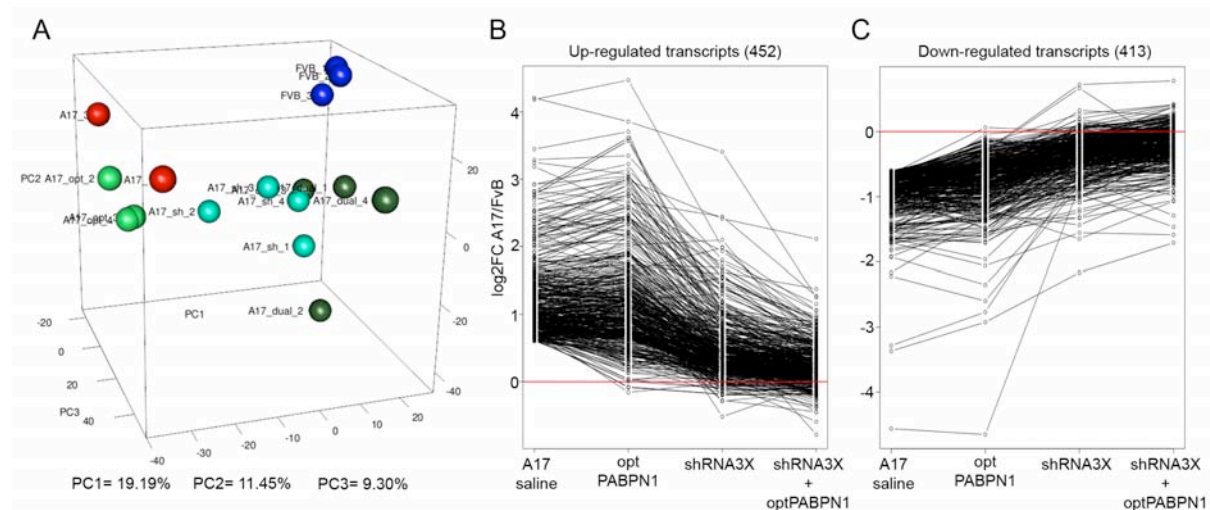


Figure 5: transcriptome of A17 muscles treated with the combined approach is normalized to the one of WT mice

(a) Principle component analysis (PCA) of microarray data shows wide segregation of A17 mice clusters (in red) away from wild-type FvB mice clusters (in blue). Muscles treated with combined AAVs (shRNA3X and optPABPN1, in dark green) clustered very close to wild-type mice, while muscles treated with shRNA3X only (in light blue) clustered closer to FvB muscles than optPABPN1 injected muscles (light green). (b, c) 452 and 413 transcripts were up- and down- regulated respectively. 98% of these dysregulated (either up- or down- regulated) transcripts showed a complete return to normal expression after the gene therapy treatment.

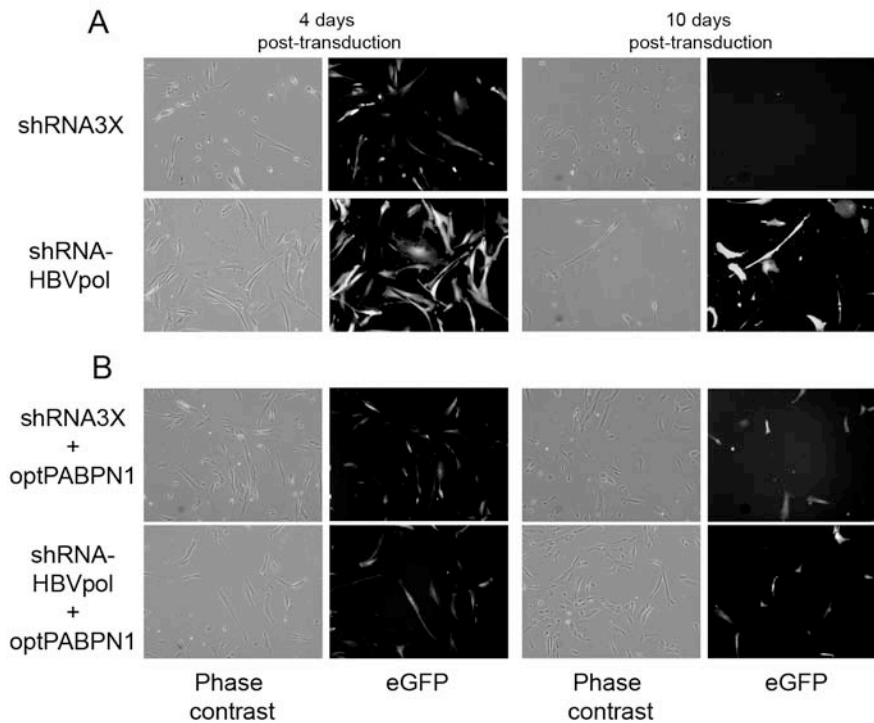


Figure 6: PABPN1 inhibition in human OPMD myoblasts induces cell death that can be prevented by optPABPN1 co-expression.

(a-b) Primary OPMD myoblast cells were transduced with shRNA3X tricistronic cassette, shRNA-HBVpol, shRNA3X-optPABPN1 or shRNA HBVpol-optPABPN1 lentivirus vectors. GFP observed 4 and 10 days post-transduction demonstrates that no GFP+ cells survived on the condition transduced with shRNA3X. However co-transduction with shRNA-HBVpol-optPABPN1 prevented cell death.

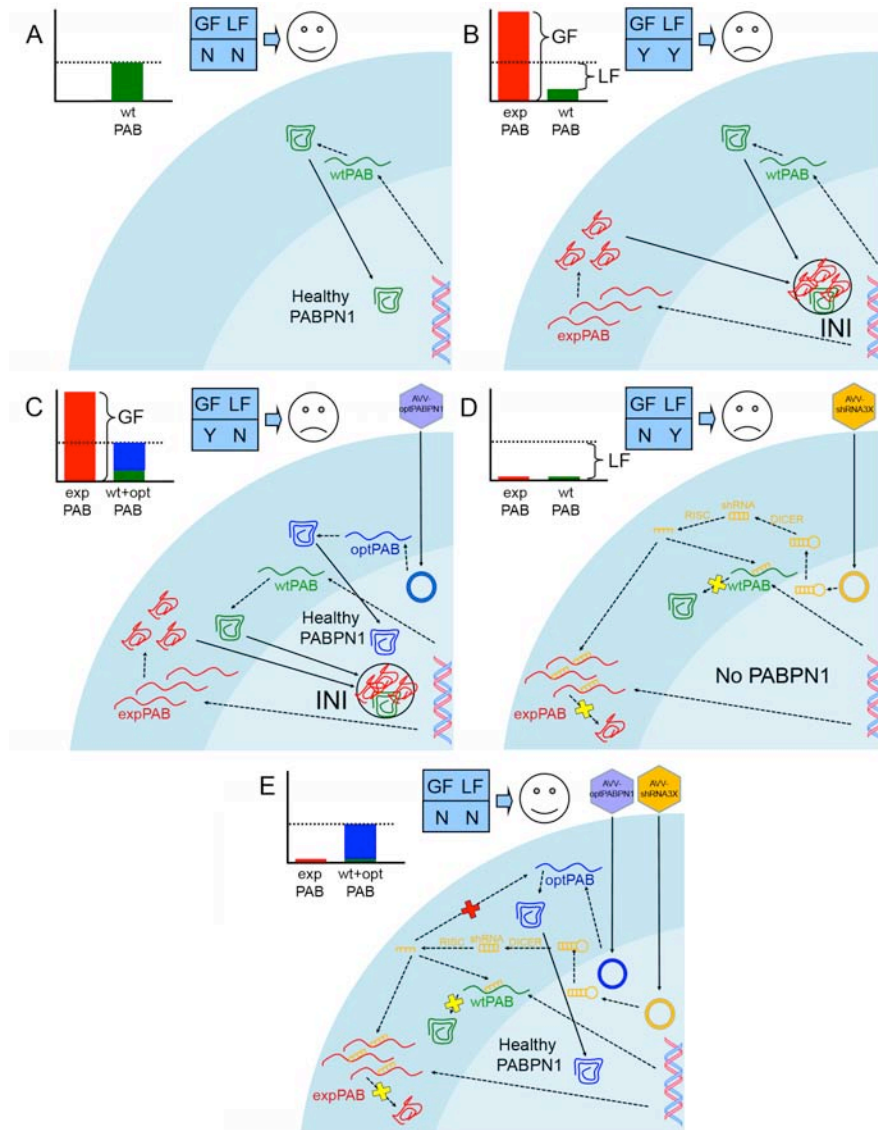


Figure 7: PABPN1 aggregation induces in OPMD both a gain of toxic function (GF) and a loss of physiological function (LF)

(a) Wild type PABPN1 (green) expression in FvB skeletal muscle is optimal for cell survival and functionality. (b) In A17 mice the expression of expPABPN1 (red) and the consequent aggregate formation induce both a toxic gain of function and a loss of function associated with the pathology. (c) Expression of expPABPN1 in A17 mice induces a toxic gain of function. optPABPN1 (blue) expression counteracts the lack of available healthy PABPN1 but does not

improve the pathology. **(d)** Endogenous PABPN1 depletion abrogates the gain of function provided by expPABPN1 but worsens the loss of function promoting muscle degeneration. **(e)** Only the combined treatment rescues the normal expression and functionality of PABPN1 erasing both the gain of toxic function and the loss of function from A17 muscles.

Discussion générale

Une mutation au niveau d'une protéine ubiquitaire essentielle au métabolisme de l'ARN ne conduit pas forcément à un dysfonctionnement généralisé. C'est le cas de la dystrophie musculaire oculopharyngée pour laquelle une expansion de triplets dans PABPN1 conduit à une atteinte restreinte à certains muscles. A l'heure actuelle, les mécanismes moléculaires impliqués dans cette maladie génétique restent encore mal connus. De nouvelles fonctions de PABPN1 ont été mises en évidence démontrant son rôle prépondérant dans les mécanismes de surveillance des ARN. Mais très peu d'études ont été réalisées spécifiquement dans le muscle, le seul tissu affecté dans la maladie, et au sein duquel le niveau de PABPN1 est très faible comparé aux autres tissus du corps. Par ailleurs, parmi toutes les fonctions connues à l'heure actuelle, seule l'APA a pour l'instant été confirmé comme dérégulée dans l'OPMD (et même uniquement chez la souris OPMD) et cette dérégulation ne permet pas d'expliquer la spécificité d'atteinte. Plusieurs questions restent ainsi ouvertes sur les rôles de PABPN1 dans le muscle strié squelettique (dont aucune fonction spécifique du muscle n'a pour l'instant été mise en évidence) et leurs possibles implications dans la pathogenèse de l'OPMD. Cette maladie est également caractérisée par la présence d'agrégats retrouvés à la fois dans les muscles atteints et non atteints et dont la contribution exacte au phénotype pathologique reste encore à élucider puisque qu'ils semblent avoir à la fois un rôle bénéfique et toxique.

Ainsi, pour tenter de comprendre cette spécificité d'atteinte plusieurs hypothèses qui ne sont pas mutuellement exclusives peuvent être proposées : 1) une ou plusieurs fonctions de PABPN1 sont spécifiquement dérégulées dans les muscles atteints ; 2) ces dérégulations fonctionnelles concernent l'ensemble du tissu musculaire mais le phénotype est dû à une plus grande susceptibilité des muscles atteints; 3) une cible spécifique du muscle directement régulée par la protéine PABPN1 (ARN codant, non codant, protéine) est modifiée, 4) la présence des agrégats par elle même est toxique dans les muscles atteints ou encore 5) les agrégats dérégulent de façon spécifique un mécanisme et/ou l'expression d'un gène dont la conséquence serait observable uniquement dans les muscles atteints. Ces possibilités peuvent être regroupées sous les modèles de gain de fonction toxique ou de perte de fonction. Enfin parmi les différentes hypothèses pouvant expliquer la plus grande susceptibilité des muscles atteints, la plus vraisemblable tiendrait à des caractéristiques intrinsèques de ces muscles liées à leur structure et à leur fonction même. L'origine embryonnaire différente des muscles du

pharynx et des paupières par rapport aux muscles du tronc est à priori à exclure puisque d'autres muscles de la même origine ne sont pas touchés. L'étude des fonctions de PABPN1 dans le muscle sain et pathologique et du rôle potentiel des agrégats apparaît aujourd'hui essentielle pour mieux comprendre la pathologie et envisager une stratégie thérapeutique ciblée et efficace.

Fonctions cellulaires de PABPN1

La protéine PABPN1 participe à de nombreux mécanismes indispensables pour la cellule et la première fonction découverte fût son rôle dans la polyadénylation et le contrôle de la longueur de la queue poly(A) des ARNm. Ces dernières années ont vu se multiplier les démonstrations de la participation de PABPN1 à d'autres mécanismes liés à l'ARN : maturation, surveillance, contrôle qualité et dégradation (RNA decay) et il est probable que d'autres fonctions de PABPN1 restent encore à découvrir. En effet les molécules d'ARN sont recouvertes de très nombreuses protéines de liaison à l'ARN. Bien que la plupart soient présentes ponctuellement à des étapes bien précises de la maturation des transcrits, d'autres comme la protéine PABPN1 restent présentes au cours de plusieurs de ces étapes, ce qui pourrait traduire un rôle privilégié dans le contrôle et la coordination des différentes étapes de maturation. Elles peuvent alors être considérées comme des molécules centrales parmi les RBP (Figure 33). La protéine PABPN1 est capable de se fixer au niveau de la queue poly(A) de tous les ARN polyadénylés ce qui fait qu'elle est retrouvée dans toutes les RNP et ceci dès les premiers stades de la transcription et jusqu'à l'export dans le cytoplasme et son remplacement par la protéine PAB cytoplasmique. Ces protéines centrales semblent pouvoir coordonner les différentes étapes de la maturation d'un ARN, étapes qui ne sont pas dissociées les unes des autres mais couplées entre elles. Ainsi nous proposons que le défaut d'épissage retrouvé dans les muscles des patients OPMD est directement lié au fait que PABPN1 en tant que RBP soit capable de fixer les ARN polyadénylés alors même que la réaction d'épissage n'est pas totalement terminée ce qui conduit un pré-ARN à se retrouver délocalisé de son facteur d'épissage naturel. Plus généralement cela signifie qu'une mutation d'une protéine impliquée dans un mécanisme X peut induire un défaut dans un mécanisme Y alors que la protéine n'y participe pas directement, complexifiant ainsi le champ d'investigation.

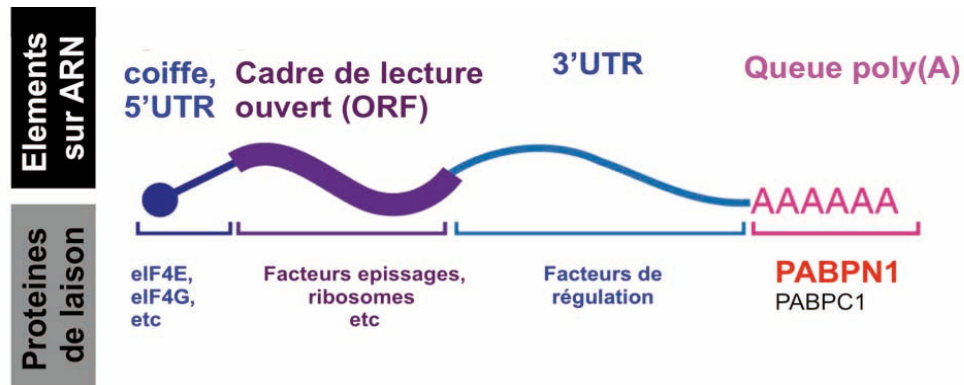


Figure 33 : Organisation et régulation des complexes ARNm-RBP.

Représentation des différents éléments présents sur l'ARNm et de certaines protéines de liaisons associées formant une particule ribonucléique. Les facteurs de traduction (*eIF4E* et *eIF4G*) interagissent avec la partie 5'UTR et la coiffe, alors que les protéines PABP (*PABPN1* et *PABPC1*) lient la queue poly(A). Ces deux structures sont retrouvées sur la quasi totalité des ARNm, les protéines qui les lient peuvent être considérées comme des facteurs cœurs de l'ARN. Modifié d'après (Rissland, 2016)

Malgré la position centrale de PABPN1 au sein du mécanisme général de maturation de l'ARN, il est peu probable qu'une fonction cellulaire essentielle soit dérégulée par la mutation, mais plus vraisemblablement une fonction secondaire entraînant l'apparition progressive de défauts musculaires. D'ailleurs, l'expansion pathologique d'alanine dans la protéine PABPN1 n'est pas dans les domaines qui lient l'ARN et ne participent pas à des fonctions métaboliques connues. Au cours de l'étude de la dérégulation des mitochondries nous avons mis en évidence un défaut dans le clivage au niveau du 3'UTR, mais ce dysfonctionnement général est silencieux car il n'induit pas de défaut dans le niveau d'équilibre de l'expression des ARNm. Nous avons aussi mis en évidence un raccourcissement de la longueur de la queue poly(A) spécifique des ARNm mitochondriaux impliquant la protéine de déadénylation Smaug, comme conséquence secondaire de la mutation de PABPN1 et qui apparaît à un stade précoce avant même l'observation des premiers symptômes. Cet exemple montre ainsi que même si l'expansion pathologique d'alanine peut modifier des voies métaboliques, ces modifications ont des effets limités mais qui s'accumulent au cours du temps et/ou dépendent d'un mécanisme lié à l'âge puisque les premiers symptômes apparaissent à un âge tardif.

Contribution des agrégats nucléaires de PABPN1

Le rôle des agrégats dans la pathologie est encore aujourd'hui controversé. Dans notre étude sur les défauts mitochondriaux, le phénotype pathologique a été inversé chez la drosophile OPMD sans corrélation avec la présence des agrégats (voire ils étaient plus gros après le sauvetage). Par ailleurs, une étude récente a montré la présence d'agrégats nucléaires de PABPN1 à un stade pré-symptomatique chez les patients OPMD (van der Sluijs et al., 2016) et ils sont retrouvés aussi nombreux dans les muscles non atteints de patients OPMD (Gidaro et al., 2013). S'il a déjà été montré que ces agrégats ont un rôle toxique *in vitro* et *in vivo*, les résultats précédemment cités suggèrent également un effet neutre ou même bénéfique à un stade précoce de la pathologie dans les muscles non atteints. Leur présence deviendrait toxique au cours du temps. De plus nous avons aussi montré *in vivo* dans le muscle de la souris OPMD, que l'extinction de PABPN1 par RNAi et la diminution drastique du nombre d'agrégats pathologiques ne conduisent pas à une amélioration du phénotype dystrophique. Cependant pour alimenter le débat nous avons aussi montré qu'ils peuvent aussi avoir un effet toxique en séquestrant un pré-ARN conduisant à un défaut d'épissage et à la diminution d'une isoforme musculaire essentielle conduisant à un dysfonctionnement de contraction du muscle. Ce défaut montre que le rôle des agrégats dans la pathogenèse de la maladie peut être différent en fonction du muscle considéré, voire du stade de développement de la maladie. Au vu de ces résultats et de ceux de la littérature l'explication la plus probable serait que les agrégats existent sous différentes conformations dans un cas ayant un effet neutre/protecteur ou dans l'autre un effet pathogène. Cette hypothèse a déjà été proposée pour d'autres pathologies. Plus de 30 maladies humaines sont caractérisées par la présence d'agrégats pathologiques. Comme pour l'OPMD les mécanismes moléculaires pouvant conduire à une toxicité sont encore mal connus, et peuvent être multiples (De Baets et al., 2015). Les maladies causées par des expansions d'acides aminés de type glutamine sont aussi caractérisées par des agrégats. Bien que considérés comme participant à la pathogenèse de la maladie, ils peuvent aussi avoir un rôle non toxique pour la cellule, voire même protecteur. Dans le cas des expansions de glutamines plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ce mécanisme : 1) leur localisation jouerait un rôle dans l'effet toxique, 2) leur cinétique de formation pourrait aussi intervenir : les agrégats se formant rapidement seraient plus toxiques que ceux nécessitant un temps de formation relativement plus lent, 3) la conformation serait aussi un point essentiel pour expliquer un effet toxique : ainsi les agrégats peuvent exister sous différentes formes avec une structure plus ou moins rigides. Pour ce dernier point par

exemple, dans le cas la maladie de Huntington, les agrégats compacts seraient plus toxiques que des agrégats plus lâches. Cette capacité à se trouver sous une forme plus ou moins dense serait dépendante du contexte cellulaire, pouvant être lié à un changement de l'expression de la machinerie de conformation protéique de la cellule ou au niveau d'expression d'un composant interagissant avec les agrégats (Todd, Lim, 2013). Dans le cas de l'OPMD ces mêmes hypothèses pourraient aussi être appliquées :

1) les agrégats sont exclusivement nucléaires mais bien qu'ils soient délocalisés des speckles, certains pourraient se retrouver préférentiellement dans des zones particulière du nucléoplasme proches de sites de transcription actifs entraînant une dérégulation spécifique de l'expression de certains transcrits ou dans des domaines particuliers du noyau comme les paraspeckles qui sont des corps nucléaires aussi retrouvées à proximité des speckles ce qui pourrait conduire à leur déstructuration.

2) *in vitro* des études ont montré que les agrégats ne sont pas statiques mais évoluent au cours du cycle cellulaire : après la mitose les premiers agrégats sont retrouvés à des temps précoces dans les cellules filles. Dans l'OPMD il est donc possible que la composition des agrégats évolue elle aussi cours du temps et qu'un élément essentiel à la cellule (ARN ou protéine) se retrouve piégé à partir d'un stade précis ou voir progressivement au cours du vieillissement, induisant des défauts dans l'homéostasie musculaire.

3) il été montré dans les coupes de patients OPMD que la surface du noyau occupé par des agrégats est variable avec un volume pouvant aller de moins de 1% à la majorité du nucléoplasme (Tomé et al., 1997). Leur nombre aussi est variable pouvant être retrouvé dans 2 à 16% des myonucléi (Gidaro et al., 2013). Tomé *et al* expliquent en 1997 que les agrégats nucléaires de PABPN1 sont des structures relativement petites et qu'il est difficile de les détecter et qu'il se pourrait en fait qu'ils soient présents dans tous les noyaux. A l'époque la détection d'agrégats dans les muscles de patients se faisait par microscopie électronique. De nos jours l'utilisation d'immunofluorescences avec un anticorps contre PABPN1 a simplifier leur détection mais il est aussi possible que les structures plus petites ne soient pas considérées comme des agrégats. De plus le protocole d'immunodétection implique un traitement au chlorure de potassium (KCl) afin d'enlever tous les protéines non solubles du noyau et de ne laisser que la protéine PABPN1 sous forme agrégée. Ce traitement a ainsi des limites puisqu'il est possible qu'il masque la présence d'agrégats plus labiles qui seraient éliminés par le prétraitement.

Comprendre la formation de ces agrégats et connaître de façon exhaustive leur composition dans les différents muscles apparaît essentiel pour appréhender leur rôle exact et leur double fonction éventuelle. Cela permettra de comprendre pourquoi bien que la mutation de PABPN1 soit présente dans le corps entier, les agrégats ne se forment que dans les fibres musculaires. L'implication de l'ARN de *TNNT3* dont l'expression est spécifique au muscle pourrait être une piste à explorer. Ce dernier pouvant servir à leur formation comme c'est le cas de nombreux domaines nucléaires comme par exemple les paraspeckles dont la formation et la structuration est dépendante d'un lncARN appelé *Neat1*.

Dérégulations physiopathologiques dans l'OPMD

Il existe des pathologies où le lien entre la mutation et les conséquences phénotypiques est facilement compréhensible comme dans le cas de la dystrophie musculaire de Duchenne où une protéine structurelle du muscle est inexistante, ou encore pour les autres maladies à expansion d'alanines qui se produisent dans des protéines essentielles au fonctionnement cellulaire (facteurs de transcription) et qui conduisent à des pathologies développementales dramatiques. Concernant l'OPMD, les choses ne sont pas aussi simples. Plusieurs grandes voies métaboliques ont été montrées comme dérégulées (l'ubiquitine-protéasome, l'atrophie, l'apoptose) mais aucune ne permet d'expliquer le phénotype pathologique. Une dérégulation de l'APA a aussi été mise en évidence dans l'OPMD mais ceci ne semble pas entraîner de modifications importantes de l'homéostasie de l'ARN et cette dérégulation reste à confirmer chez l'homme. Nous avons montré que les mitochondries présentent des défauts dans l'OPMD. Il a été précédemment montré que le phénotype pathologique dans le modèle de souris OPMD était prépondérant dans les fibres rapides (glycolytiques) qui contiennent moins de mitochondries, comparé aux fibres lentes (oxydatives), et sont caractérisées par une atrophie et un nombre d'agrégats supérieur, ce qui suggère que ces fibres seraient plus sensibles à une dérégulation du métabolisme mitochondrial. Comme chaque muscle contient un ratio variable de fibres rapides et lentes cela pourrait en partie participer à expliquer la spécificité d'atteinte. Ainsi chez l'homme les muscles squelettiques sont mixtes, mais ceux de la tête et du cou ont en plus une spécialisation fonctionnelle particulière avec une expression atypique de certains types de fibres non retrouvée dans le tronc. Les muscles extra-oculaires expriment des myosines normalement retrouvées seulement pendant le développement (néonatale et embryonnaire), une isoforme lente et particulière présente exclusivement dans des fibres dites de faible tonicité ou encore une myosine retrouvée exclusivement dans la

couche orbitale du muscle (Schiaffino, Reggiani, 2011). Un effet cumulatif pourrait aussi avoir lieu avec le défaut d'épissage retrouvé dans la protéine TNNT3. Le pré-ARN de *TNNT3* subit un épissage intensif conduisant à plus de 100 isoformes. La partie N-terminale de la protéine est dite hypervariable avec de nombreux événements d'épissages alternatifs. La partie C-terminale contient les exons mutuellement exclusifs. La partie centrale et la partie C-terminale sont fortement conservées parmi les espèces. Elle contiennent les sites de fixation pour la Troponine I, la Troponine C, et la Tropomyosine, et jouent un rôle essentiel pour l'activation de l'actomyosine. De plus, les formes avec les exons 16 ou 17 n'ont pas la même affinité pour le calcium. Cette diversité dans les formes d'épissage participe à la plasticité musculaire et elles sont finement régulées au cours du développement, parmi les différents groupes musculaires, et dans différentes espèces. Cette importance dans le ratio de chaque isoforme pourrait expliquer la spécificité d'atteinte musculaire. La diminution de l'expression de la forme contenant l'exon 16 de *TNNT3* pourrait avoir un rôle essentiel dans les muscles atteints dans l'OPMD, comparés aux autres muscles. Enfin, le muscle cricopharyngien est en condition physiologique très fibrotique et cette fibrose est augmentée dans l'OPMD ce qui signifie que très peu de fibres musculaires sont présentes. Tout dysfonctionnement dans leur homéostasie (défaut mitochondriaux, contraction) pourrait logiquement les impacter de manière plus importante.

Même si les études que nous avons réalisées ne permettent toujours pas de comprendre totalement les mécanismes moléculaires impliqués dans cette spécificité d'atteinte, ils soulèvent de nouvelles interrogations mais apportent aussi des pistes pour la compréhension de la maladie. L'OPMD est une maladie complexe et comme nous l'avons aussi montré multifactorielle. De nombreux dysfonctionnements sont présents et participent à la pathogénèse. Les résultats obtenus au cours de ce travail suggèrent une accumulation de défauts moléculaires dont les symptômes seraient visibles à un certain âge et dans certains muscles. Nous avons mis en évidence une dérégulation des ARN mitochondriaux dans les premiers stades de la maladie. Nous avons aussi montré que la mutation et la présence des agrégats conduisent à un défaut d'épissage d'un transcrite spécifique du muscle. Ainsi le défaut dans les mitochondries impacterait la quantité d'énergie disponible pour les muscles pour se contracter. Ce dysfonctionnement est exacerbé par le défaut d'épissage dans la protéine *TNNT3* qui régule la contraction musculaire et interagit avec de nombreuses autres protéines qui composent les myofilaments. Enfin nous avons montré que l'unique stratégie de thérapie

génique efficace est une stratégie combinant à la fois l'extinction de PABPN1 et l'ajout par une protéine sauvage pour suppléer les fonctions cellulaires. D'une manière plus large, les défauts mitochondriaux sont une caractéristique de nombreuses maladies et il serait intéressant d'étudier si le mécanisme moléculaire que nous avons trouvé est partagé par d'autres pathologies. De plus l'étude du rôle de l'ARN de *TNNT3* dans la formation des agrégats semble être une piste d'investigation intéressante pour comprendre les mécanismes de formation/présence des agrégats nucléaires de PABPN1.

Bibliographie

ABU-BAKER, Aida, LAGANIERE, Simon, FAN, Xueping, LAGANIERE, Janet, BRAIS, Bernard et ROULEAU, Guy A., 2005. Cytoplasmic Targeting of Mutant Poly(A)-Binding Protein Nuclear 1 Suppresses Protein Aggregation and Toxicity in Oculopharyngeal Muscular Dystrophy: Protein Subcellular Localization in OPMD Pathogenesis. In : *Traffic*. septembre 2005. Vol. 6, n° 9, p. 766-779. DOI 10.1111/j.1600-0854.2005.00315.x.

ABU-BAKER, Aida, MESSAED, Christiane, LAGANIERE, Janet, GASPARD, Claudia, BRAIS, Bernard et ROULEAU, Guy A., 2003. Involvement of the ubiquitin-proteasome pathway and molecular chaperones in oculopharyngeal muscular dystrophy. In : *Human molecular genetics*. 15 octobre 2003. Vol. 12, n° 20, p. 2609-2623. DOI 10.1093/hmg/ddg293.

ABU-BAKER, Aida et ROULEAU, Guy A., 2007. Oculopharyngeal muscular dystrophy: recent advances in the understanding of the molecular pathogenic mechanisms and treatment strategies. In : *Biochimica et biophysica acta*. février 2007. Vol. 1772, n° 2, p. 173-185. DOI 10.1016/j.bbadis.2006.10.003.

ALBRECHT, Andrea et MUNDLOS, Stefan, 2005. The other trinucleotide repeat: polyalanine expansion disorders. In : *Current Opinion in Genetics & Development*. juin 2005. Vol. 15, n° 3, p. 285-293. DOI 10.1016/j.gde.2005.04.003.

AMYOT, R., 1948a. Hereditary, familial and acquired ptosis of late onset. In : *Canadian Medical Association Journal*. novembre 1948. Vol. 59, n° 5, p. 434-438.

AMYOT, R., 1948b. Ptosis héréditaire familial et tardif des paupières supérieures. In : *L'union Médicale Du Canada*. novembre 1948. Vol. 77, n° 11, p. 1287-1294.

ANDERSON, James T. et WANG, Xuying, 2009. Nuclear RNA surveillance: no sign of substrates tailing off. In : *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. février 2009. Vol. 44, n° 1, p. 16-24. DOI 10.1080/10409230802640218.

ANDERSON, Paul et KEDERSHA, Nancy, 2006. RNA granules: Figure 1. In : *The Journal of Cell Biology*. 13 mars 2006. Vol. 172, n° 6, p. 803-808. DOI 10.1083/jcb.200512082.

ANVAR, Seyed Yahya, RAZ, Yotam, VERWAY, Nisha, VAN DER SLUIJS, Barbara, VENEMA, Andrea, GOEMAN, Jelle J, VISSING, John, VAN DER MAAREL, Silvere M, 'T HOEN, Peter A C, VAN ENGELLEN, Baziel G M et RAZ, Vered, 2013. A decline in PABPN1 induces progressive muscle weakness in oculopharyngeal muscle dystrophy and in muscle aging. In : *Aging*. juin 2013. Vol. 5, n° 6, p. 412-426.

ANVAR, Seyed Yahya, 'T HOEN, Peter Ac, VENEMA, Andrea, VAN DER SLUIJS, Barbara, VAN ENGELLEN, Baziel, SNOECK, Marc, VISSING, John, TROLLET, Capucine, DICKSON, George, CHARTIER, Aymeric, SIMONELIG, Martine, VAN OMMEN, Gert-Jan B, VAN DER MAAREL, Silvere M et RAZ, Vered, 2011. Deregulation of the ubiquitin-proteasome system is the predominant molecular pathology in OPMD animal models and patients. In : *Skeletal muscle*. 2011. Vol. 1, n° 1, p. 15. DOI 10.1186/2044-5040-1-15.

APPONI, L. H., LEUNG, S. W., WILLIAMS, K. R., VALENTINI, S. R., CORBETT, A. H. et PAVLATH, G. K., 2009. Loss of nuclear poly(A)-binding protein 1 causes defects in myogenesis and mRNA biogenesis. In : *Human Molecular Genetics*. 24 décembre 2009. Vol. 19, n° 6, p. 1058-1065. DOI 10.1093/hmg/ddp569.

APPONI, Luciano H, CORBETT, Anita H et PAVLATH, Grace K, 2013. Control of mRNA stability contributes to low levels of nuclear poly(A) binding protein 1 (PABPN1) in skeletal muscle. In : *Skeletal muscle*. 1 octobre 2013. Vol. 3, n° 1, p. 23. DOI 10.1186/2044-5040-3-23.

BANERJEE, Ayan, APPONI, Luciano H., PAVLATH, Grace K. et CORBETT, Anita H., 2013. PABPN1: molecular function and muscle disease. In : *FEBS Journal*. 1 septembre 2013. Vol. 280, n° 17, p. 4230-4250. DOI 10.1111/febs.12294.

BAO, Y. P., SARKAR, S., UYAMA, E. et RUBINSZTEIN, D. C., 2004. Congo red, doxycycline, and HSP70 overexpression reduce aggregate formation and cell death in cell models of oculopharyngeal muscular dystrophy. In : *Journal of Medical Genetics*. 1 janvier 2004. Vol. 41, n° 1, p. 47-51. DOI 10.1136/jmg.2003.014548.

BAO, Yi Ping, COOK, Lynnette J, O'DONOVAN, Dominic, UYAMA, Eiichiro et RUBINSZTEIN, David C, 2002. Mammalian, yeast, bacterial, and chemical chaperones reduce aggregate formation and death in a cell model of oculopharyngeal muscular dystrophy. In : *The Journal of biological chemistry*. 5 avril 2002. Vol. 277, n° 14, p. 12263-12269. DOI 10.1074/jbc.M109633200.

BARBEAU, André, 1966. The Syndrome of Hereditary Late Onset Ptosis and Dysphagia in French Canada. In : KUHN, Erich (éd.), *Progressive Muskeldystrophie Myotonie · Myasthenie* [en ligne]. S.l. : Springer Berlin Heidelberg. p. 102-109. [Consulté le 23 mars 2016]. ISBN 9783642929212 9783642929205. Disponible à l'adresse : http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-92920-5_14.

BARBEZIER, Nicolas, CHARTIER, Aymeric, BIDEY, Yannick, BUTTSTEDT, Anja, VOISSET, Cécile, GALONS, Hervé, BLONDEL, Marc, SCHWARZ, Elisabeth et SIMONELIG, Martine, 2011. Antiprion drugs 6-aminophenanthridine and guanabenz reduce PABPN1 toxicity and aggregation in oculopharyngeal muscular dystrophy. In : *EMBO molecular medicine*. janvier 2011. Vol. 3, n° 1, p. 35-49. DOI 10.1002/emmm.201000109.

BAREJA, Akshay, HOLT, Jason A., LUO, Guizhen, CHANG, Calvin, LIN, Junyu, HINKEN, Aaron C., FREUDENBERG, Johannes M., KRAUS, William E., EVANS, William J. et BILLIN, Andrew N., 2014. Human and Mouse Skeletal Muscle Stem Cells: Convergent and Divergent Mechanisms of Myogenesis. In : *PLOS ONE*. févr 2014. Vol. 9, n° 2, p. e90398. DOI 10.1371/journal.pone.0090398.

BEAULIEU, Yves B., KLEINMAN, Claudia L., LANDRY-VOYER, Anne-Marie, MAJEWSKI, Jacek et BACHAND, François, 2012. Polyadenylation-Dependent Control of Long Noncoding RNA Expression by the Poly(A)-Binding Protein Nuclear 1. In : LEE, Jeannie T. (éd.), *PLoS Genetics*. 15 novembre 2012. Vol. 8, n° 11, p. e1003078. DOI 10.1371/journal.pgen.1003078.

BENGOECHEA, Rocío, TAPIA, Olga, CASAFONT, Iñigo, BERCIANO, José, LAFARGA, Miguel et BERCIANO, María T, 2012. Nuclear speckles are involved in nuclear aggregation

of PABPN1 and in the pathophysiology of oculopharyngeal muscular dystrophy. In : *Neurobiology of disease*. avril 2012. Vol. 46, n° 1, p. 118-129. DOI 10.1016/j.nbd.2011.12.052.

BENOIT, Béatrice, MITOU, Géraldine, CHARTIER, Aymeric, TEMME, Claudia, ZAESSINGER, Sophie, WAHLE, Elmar, BUSSEAU, Isabelle et SIMONELIG, Martine, 2005. An Essential Cytoplasmic Function for the Nuclear Poly(A) Binding Protein, PABP2, in Poly(A) Tail Length Control and Early Development in *Drosophila*. In : *Developmental Cell*. octobre 2005. Vol. 9, n° 4, p. 511-522. DOI 10.1016/j.devcel.2005.09.002.

BERGERON, Danny, PAL, Gheorghe, BEAULIEU, Yves B., CHABOT, Benoit et BACHAND, François, 2015. Regulated Intron Retention and Nuclear Pre-mRNA Decay Contribute to PABPN1 Autoregulation. In : *Molecular and Cellular Biology*. 15 juillet 2015. Vol. 35, n° 14, p. 2503-2517. DOI 10.1128/MCB.00070-15.

BHATTACHARJEE, Rumpa Biswas et BAG, Jnanankur, 2012. Depletion of Nuclear Poly(A) Binding Protein PABPN1 Produces a Compensatory Response by Cytoplasmic PABP4 and PABP5 in Cultured Human Cells. In : KIM, Yoon Ki (éd.), *PLoS ONE*. 31 décembre 2012. Vol. 7, n° 12, p. e53036. DOI 10.1371/journal.pone.0053036.

BHATTACHARJEE, Rumpa Biswas, ZANNAT, Thangima et BAG, Jnanankur, 2012. Expression of the polyalanine expansion mutant of nuclear poly(A)-binding protein induces apoptosis via the p53 pathway. In : *Cell biology international*. 1 août 2012. Vol. 36, n° 8, p. 697-704. DOI 10.1042/CBI20110348.

BIENROTH, S, KELLER, W et WAHLE, E, 1993. Assembly of a processive messenger RNA polyadenylation complex. In : *The EMBO Journal*. février 1993. Vol. 12, n° 2, p. 585-594.

BIONE, S., MAESTRINI, E., RIVELLA, S., MANCINI, M., REGIS, S., ROMEO, G. et TONIOLO, D., 1994. Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. In : *Nature Genetics*. décembre 1994. Vol. 8, n° 4, p. 323-327. DOI 10.1038/ng1294-323.

BLOBEL, Günter, 1973. A protein of molecular weight 78,000 bound to the polyadenylate region of eukaryotic messenger RNAs. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1973. Vol. 70, n° 3, p. 924-928.

BLUMEN, S C, BRAIS, B, KORCZYN, A D, MEDINSKY, S, CHAPMAN, J, ASHEROV, A, NISIPEANU, P, CODÈRE, F, BOUCHARD, J P, FARDEAU, M, TOMÉ, F M et ROULEAU, G A, 1999. Homozygotes for oculopharyngeal muscular dystrophy have a severe form of the disease. In : *Annals of neurology*. juillet 1999. Vol. 46, n° 1, p. 115-118.

BLUMEN, S C, NISIPEANU, P, SADEH, M, ASHEROV, A, TOMÉ, F M et KORCZYN, A D, 1993. Clinical features of oculopharyngeal muscular dystrophy among Bukhara Jews. In : *Neuromuscular disorders: NMD*. novembre 1993. Vol. 3, n° 5-6, p. 575-577.

BLUMEN, S, SADEH, M et TOME, F M, 1992. Oculopharyngeal muscular dystrophy among Bukhara Jew : a new cluster with Typical intranuclear inclusions (abstract). In : 1992. Vol. 32, p. 279-280.

BODINE, S. C., LATRES, E., BAUMHUETER, S., LAI, V. K., NUNEZ, L., CLARKE, B. A., POUHEYMIROU, W. T., PANARO, F. J., NA, E., DHARMARAJAN, K., PAN, Z. Q., VALENZUELA, D. M., DECHIARA, T. M., STITT, T. N., YANCOPOULOS, G. D. et GLASS, D. J., 2001. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. In : *Science (New York, N.Y.)*. 23 novembre 2001. Vol. 294, n° 5547, p. 1704-1708. DOI 10.1126/science.1065874.

BONALDO, P. et SANDRI, M., 2013. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. In : *Disease Models & Mechanisms*. 1 janvier 2013. Vol. 6, n° 1, p. 25-39. DOI 10.1242/dmm.010389.

BONNE, G., DI BARLETTA, M. R., VARNOUS, S., BÉCANE, H. M., HAMMOUDA, E. H., MERLINI, L., MUNTONI, F., GREENBERG, C. R., GARY, F., URTIZBEREA, J. A., DUBOC, D., FARDEAU, M., TONIOLO, D. et SCHWARTZ, K., 1999. Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. In : *Nature Genetics*. mars 1999. Vol. 21, n° 3, p. 285-288. DOI 10.1038/6799.

BOUAZZA, Belaid, KRATASSIOUK, Gueorgui, GJATA, Bernard, PERIE, Sophie, LACAU ST GUILY, Jean, BUTLER-BROWNE, Gillian S et SVINARTCHOUK, Fedor, 2009. Analysis of growth factor expression in affected and unaffected muscles of oculo-pharyngeal muscular dystrophy (OPMD) patients: a pilot study. In : *Neuromuscular disorders: NMD*. mars 2009. Vol. 19, n° 3, p. 199-206. DOI 10.1016/j.nmd.2008.12.003.

BOUCHARD, Jean-Pierre, 1997. André Barbeau and the oculopharyngeal muscular dystrophy in French Canada and North America. In : *Neuromuscular Disorders*. octobre 1997. Vol. 7, Supplement 1, p. S5-S11. DOI 10.1016/S0960-8966(97)00074-6.

BRAIS, B, 2003. Oculopharyngeal muscular dystrophy: a late-onset polyalanine disease. In : *Cytogenetic and genome research*. 2003. Vol. 100, n° 1-4, p. 252-260. DOI 72861.

BRAIS, B, BOUCHARD, J P, GOSSELIN, F, XIE, Y G, FARDEAU, M, TOMÉ, F M et ROULEAU, G A, 1997. Using the full power of linkage analysis in 11 French Canadian families to fine map the oculopharyngeal muscular dystrophy gene. In : *Neuromuscular disorders: NMD*. octobre 1997. Vol. 7 Suppl 1, p. S70-74.

BRAIS, B, BOUCHARD, J P, XIE, Y G, ROCHEFORT, D L, CHRÉTIEN, N, TOMÉ, F M, LAFRENIÈRE, R G, ROMMENS, J M, UYAMA, E, NOHIRA, O, BLUMEN, S, KORCZYN, A D, HEUTINK, P, MATHIEU, J, DURANCEAU, A, CODÈRE, F, FARDEAU, M, ROULEAU, G A et KORCYN, A D, 1998. Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. In : *Nature genetics*. février 1998. Vol. 18, n° 2, p. 164-167. DOI 10.1038/ng0298-164.

BRAIS, B, ROULEAU, G A, BOUCHARD, J P, FARDEAU, M et TOMÉ, F M, 1999. Oculopharyngeal muscular dystrophy. In : *Seminars in neurology*. 1999. Vol. 19, n° 1, p. 59-66. DOI 10.1055/s-2008-1040826.

BRAIS, B, XIE, Y G, SANSON, M, MORGAN, K, WEISSENBACH, J, KORCZYN, A D, BLUMEN, S C, FARDEAU, M, TOMÉ, F M et BOUCHARD, J P, 1995. The oculopharyngeal muscular dystrophy locus maps to the region of the cardiac alpha and beta

myosin heavy chain genes on chromosome 14q11.2-q13. In : *Human molecular genetics*. mars 1995. Vol. 4, n° 3, p. 429-434.

BRATIC, Ana et LARSSON, Nils-Göran, 2013. The role of mitochondria in aging. In : *Journal of Clinical Investigation*. 1 mars 2013. Vol. 123, n° 3, p. 951-957. DOI 10.1172/JCI64125.

BRESSON, Stefan M. et CONRAD, Nicholas K., 2013. The Human Nuclear Poly(A)-Binding Protein Promotes RNA Hyperadenylation and Decay. In : *PLoS Genetics* [en ligne]. octobre 2013. Vol. 9, n° 10. [Consulté le 4 décembre 2013]. DOI 10.1371/journal.pgen.1003893. Disponible à l'adresse : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3798265/>.

BRESSON, Stefan M., HUNTER, Olga V., HUNTER, Allyson C. et CONRAD, Nicholas K., 2015. Canonical Poly(A) Polymerase Activity Promotes the Decay of a Wide Variety of Mammalian Nuclear RNAs. In : *PLoS genetics*. octobre 2015. Vol. 11, n° 10, p. e1005610. DOI 10.1371/journal.pgen.1005610.

BROW, David A., 2002. Allosteric cascade of spliceosome activation. In : *Annual Review of Genetics*. 2002. Vol. 36, p. 333-360. DOI 10.1146/annurev.genet.36.043002.091635.

BURGE, C. B., PADGETT, R. A. et SHARP, P. A., 1998. Evolutionary fates and origins of U12-type introns. In : *Molecular Cell*. décembre 1998. Vol. 2, n° 6, p. 773-785.

CALADO, A, KUTAY, U, KÜHN, U, WAHLE, E et CARMO-FONSECA, M, 2000. Deciphering the cellular pathway for transport of poly(A)-binding protein II. In : *RNA*. février 2000. Vol. 6, n° 2, p. 245-256.

CALADO, A, TOMÉ, F M, BRAIS, B, ROULEAU, G A, KÜHN, U, WAHLE, E et CARMO-FONSECA, M, 2000. Nuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy consist of poly(A) binding protein 2 aggregates which sequester poly(A) RNA. In : *Human molecular genetics*. 22 septembre 2000. Vol. 9, n° 15, p. 2321-2328.

CALADO, A. et CARMO-FONSECA, M., 2000. Localization of poly(A)-binding protein 2 (PABP2) in nuclear speckles is independent of import into the nucleus and requires binding to poly(A) RNA. In : *Journal of Cell Science*. juin 2000. Vol. 113 (Pt 12), p. 2309-2318.

CARMO-FONSECA, Maria et RINO, José, 2011. RNA seeds nuclear bodies. In : *Nature Cell Biology*. février 2011. Vol. 13, n° 2, p. 110-112. DOI 10.1038/ncb0211-110.

CARTEGNI, Luca, CHEW, Shern L. et KRAINER, Adrian R., 2002. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. In : *Nature Reviews. Genetics*. avril 2002. Vol. 3, n° 4, p. 285-298. DOI 10.1038/nrg775.

CASAFONT, Iñigo, BERCIANO, Maria T et LAFARGA, Miguel, 2010. Bortezomib induces the formation of nuclear poly(A) RNA granules enriched in Sam68 and PABPN1 in sensory ganglia neurons. In : *Neurotoxicity research*. février 2010. Vol. 17, n° 2, p. 167-178. DOI 10.1007/s12640-009-9086-1.

CATOIRE, Hélène, PASCO, Matthieu Y, ABU-BAKER, Aida, HOLBERT, Sébastien, TOURETTE, Cendrine, BRAIS, Bernard, ROULEAU, Guy A, PARKER, J Alex et NÉRI,

- Christian, 2008. Sirtuin inhibition protects from the polyalanine muscular dystrophy protein PABPN1. In : *Human molecular genetics*. 15 juillet 2008. Vol. 17, n° 14, p. 2108-2117. DOI 10.1093/hmg/ddn109.
- CHABOT, Benoit et SHKRETA, Lulzim, 2016. Defective control of pre-messenger RNA splicing in human disease. In : *The Journal of Cell Biology*. 4 janvier 2016. Vol. 212, n° 1, p. 13-27. DOI 10.1083/jcb.201510032.
- CHAN, Serena, CHOI, Eun-A et SHI, Yongsheng, 2011a. Pre-mRNA 3'-end processing complex assembly and function. In : *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. mai 2011. Vol. 2, n° 3, p. 321-335. DOI 10.1002/wrna.54.
- CHAN, Serena, CHOI, Eun-A et SHI, Yongsheng, 2011b. Pre-mRNA 3'-end processing complex assembly and function. In : *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. mai 2011. Vol. 2, n° 3, p. 321-335. DOI 10.1002/wrna.54.
- CHARTIER, Aymeric, BENOIT, Béatrice et SIMONELIG, Martine, 2006. A Drosophila model of oculopharyngeal muscular dystrophy reveals intrinsic toxicity of PABPN1. In : *The EMBO journal*. 17 mai 2006. Vol. 25, n° 10, p. 2253-2262. DOI 10.1038/sj.emboj.7601117.
- CHARTIER, Aymeric, RAZ, Vered, STERRENBURG, Ellen, VERRIPS, C Theo, VAN DER MAAREL, Silvère M et SIMONELIG, Martine, 2009. Prevention of oculopharyngeal muscular dystrophy by muscular expression of Llama single-chain intrabodies in vivo. In : *Human molecular genetics*. 15 mai 2009. Vol. 18, n° 10, p. 1849-1859. DOI 10.1093/hmg/ddp101.
- CHEN, F, MACDONALD, C C et WILUSZ, J, 1995. Cleavage site determinants in the mammalian polyadenylation signal. In : *Nucleic Acids Research*. 25 juillet 1995. Vol. 23, n° 14, p. 2614-2620.
- CHEN, Jin-Qiang, YAGER, James D. et RUSSO, Jose, 2005. Regulation of mitochondrial respiratory chain structure and function by estrogens/estrogen receptors and potential physiological/pathophysiological implications. In : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. octobre 2005. Vol. 1746, n° 1, p. 1-17. DOI 10.1016/j.bbamcr.2005.08.001.
- CHILDERS, M. K., JOUBERT, R., POULARD, K., MOAL, C., GRANGE, R. W., DOERING, J. A., LAWLOR, M. W., RIDER, B. E., JAMET, T., DANIELE, N., MARTIN, S., RIVIERE, C., SOKER, T., HAMMER, C., VAN WITTENBERGHE, L., LOCKARD, M., GUAN, X., GODDARD, M., MITCHELL, E., BARBER, J., WILLIAMS, J. K., MACK, D. L., FURTH, M. E., VIGNAUD, A., MASURIER, C., MAVILIO, F., MOULLIER, P., BEGGS, A. H. et BUJ-BELLO, A., 2014. Gene Therapy Prolongs Survival and Restores Function in Murine and Canine Models of Myotubular Myopathy. In : *Science Translational Medicine*. 22 janvier 2014. Vol. 6, n° 220, p. 220ra10-220ra10. DOI 10.1126/scitranslmed.3007523.
- CHUJO, Takeshi, YAMAZAKI, Tomohiro et HIROSE, Tetsuro, 2016. Architectural RNAs (arcRNAs): A class of long noncoding RNAs that function as the scaffold of nuclear bodies. In : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. janvier 2016. Vol. 1859, n° 1, p. 139-146. DOI 10.1016/j.bbagr.2015.05.007.

- COIFFIER, Laurent, PÉRIÉ, Sophie, LAFORÊT, Pascal, EYMARD, Bruno et ST GUILY, Jean Lacau, 2006. Long-term results of cricopharyngeal myotomy in oculopharyngeal muscular dystrophy. In : *Otolaryngology--Head and Neck Surgery: Official Journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. août 2006. Vol. 135, n° 2, p. 218-222. DOI 10.1016/j.otohns.2006.03.015.
- COMBARET, Lydie, DARDEVET, Dominique, BÉCHET, Daniel, TAILLANDIER, Daniel, MOSONI, Laurent et ATTAIX, Didier, 2009. Skeletal muscle proteolysis in aging: In : *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. janvier 2009. Vol. 12, n° 1, p. 37-41. DOI 10.1097/MCO.0b013e32831b9c31.
- COMPSTON, A., 2008. Progressive dystrophy of the external ocular muscles (ocular myopathy). By L. G. Kiloh and S. Nevin (From the Neurological Department, King's College Hospital.) *Brain* 1951: 74; 115-143. In : *Brain*. 1 février 2008. Vol. 131, n° 2, p. 311-313. DOI 10.1093/brain/awn002.
- CORBEIL-GIRARD, Louis-Philippe, KLEIN, Arnaud F, SASSEVILLE, A Marie-Josée, LAVOIE, Hugo, DICAIRE, Marie-Josée, SAINT-DENIS, Anik, PAGÉ, Martin, DURANCEAU, André, CODÈRE, François, BOUCHARD, Jean-Pierre, KARPATI, George, ROULEAU, Guy A, MASSIE, Bernard, LANGELIER, Yves et BRAIS, Bernard, 2005. PABPN1 overexpression leads to upregulation of genes encoding nuclear proteins that are sequestered in oculopharyngeal muscular dystrophy nuclear inclusions. In : *Neurobiology of disease*. avril 2005. Vol. 18, n° 3, p. 551-567. DOI 10.1016/j.nbd.2004.10.019.
- DAGUENET, E., DUJARDIN, G. et VALCARCEL, J., 2015. The pathogenicity of splicing defects: mechanistic insights into pre-mRNA processing inform novel therapeutic approaches. In : *EMBO reports*. 1 décembre 2015. Vol. 16, n° 12, p. 1640-1655. DOI 10.15252/embr.201541116.
- DAVIES, J. E., ROSE, C., SARKAR, S. et RUBINSZTEIN, D. C., 2010. Cystamine Suppresses Polyalanine Toxicity in a Mouse Model of Oculopharyngeal Muscular Dystrophy. In : *Science Translational Medicine*. 2 juin 2010. Vol. 2, n° 34, p. 34ra40-34ra40. DOI 10.1126/scitranslmed.3000723.
- DAVIES, J. E. et RUBINSZTEIN, D. C., 2011. Over-expression of BCL2 rescues muscle weakness in a mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy. In : *Human Molecular Genetics*. 3 janvier 2011. Vol. 20, n° 6, p. 1154-1163. DOI 10.1093/hmg/ddq559.
- DAVIES, Janet E, SARKAR, Sovan et RUBINSZTEIN, David C, 2006. Trehalose reduces aggregate formation and delays pathology in a transgenic mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy. In : *Human molecular genetics*. 1 janvier 2006. Vol. 15, n° 1, p. 23-31. DOI 10.1093/hmg/ddi422.
- DAVIES, Janet E, WANG, Lin, GARCIA-OROZ, Lourdes, COOK, Lynnette J, VACHER, Coralie, O'DONOVAN, Dominic G et RUBINSZTEIN, David C, 2005. Doxycycline attenuates and delays toxicity of the oculopharyngeal muscular dystrophy mutation in transgenic mice. In : *Nature medicine*. juin 2005. Vol. 11, n° 6, p. 672-677. DOI 10.1038/nm1242.

DAVIES, Kay E et NOWAK, Kristen J, 2006. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. In : *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. octobre 2006. Vol. 7, n° 10, p. 762-773. DOI 10.1038/nrm2024.

DAVIS, Ryan et SHI, Yongsheng, 2014. The polyadenylation code: a unified model for the regulation of mRNA alternative poly adenylation. In : *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. mai 2014. Vol. 15, n° 5, p. 429-437. DOI 10.1631/jzus.B1400076.

DE BAETS, Greet, VAN DOORN, Loic, ROUSSEAU, Frederic et SCHYMKOWITZ, Joost, 2015. Increased Aggregation Is More Frequently Associated to Human Disease-Associated Mutations Than to Neutral Polymorphisms. In : WEI, Guanghong (éd.), *PLOS Computational Biology*. 4 septembre 2015. Vol. 11, n° 9, p. e1004374. DOI 10.1371/journal.pcbi.1004374.

DE KLERK, Eleonora, VENEMA, Andrea, ANVAR, S Yahya, GOEMAN, Jelle J, HU, Ouhua, TROLLET, Capucine, DICKSON, George, DEN DUNNEN, Johan T, VAN DER MAAREL, Silvère M, RAZ, Vered et 'T HOEN, Peter A C, 2012. Poly(A) binding protein nuclear 1 levels affect alternative polyadenylation. In : *Nucleic acids research*. octobre 2012. Vol. 40, n° 18, p. 9089-9101. DOI 10.1093/nar/gks655.

DE LA GRANGE, P., GRATADOU, L., DELORD, M., DUTERTRE, M. et AUBOEUF, D., 2010. Splicing factor and exon profiling across human tissues. In : *Nucleic Acids Research*. 1 mai 2010. Vol. 38, n° 9, p. 2825-2838. DOI 10.1093/nar/gkq008.

DE SANDRE-GIOVANNOLI, Annachiara et LÉVY, Nicolas, 2006. Altered splicing in prelamin A-associated premature aging phenotypes. In : *Progress in Molecular and Subcellular Biology*. 2006. Vol. 44, p. 199-232.

DION, Patrick, SHANMUGAM, Vijayalakshmi, GASPARD, Claudia, MESSAED, Christiane, MEIJER, Inge, TOULOUSE, André, LAGANIERE, Janet, ROUSSEL, Julie, ROCHEFORT, Daniel, LAGANIERE, Simon, ALLEN, Carol, KARPATI, George, BOUCHARD, Jean-Pierre, BRAIS, Bernard et ROULEAU, Guy A, 2005. Transgenic expression of an expanded (GCG)₁₃ repeat PABPN1 leads to weakness and coordination defects in mice. In : *Neurobiology of disease*. avril 2005. Vol. 18, n° 3, p. 528-536. DOI 10.1016/j.nbd.2004.09.021.

DOMINOV, Janice A., KRAVETZ, Amanda J., ARDELT, Magdalena, KOSTEK, Christine A., BEERMANN, Mary Lou et MILLER, Jeffrey B., 2005. Muscle-specific BCL2 expression ameliorates muscle disease in laminin {alpha}₂-deficient, but not in dystrophin-deficient, mice. In : *Human Molecular Genetics*. 15 avril 2005. Vol. 14, n° 8, p. 1029-1040. DOI 10.1093/hmg/ddi095.

DURANCEAU, A., FORAND, M. D. et FAUTEUX, J. P., 1980. Surgery in oculopharyngeal muscular dystrophy. In : *American Journal of Surgery*. janvier 1980. Vol. 139, n° 1, p. 33-39.

DUTIL, A, 1892. Note sur une forme de ptosis non congénital et héréditaire. In : *Progr. méd.* 1892.

ECKMANN, Christian R., RAMMELT, Christiane et WAHLE, Elmar, 2011. Control of poly(A) tail length. In : *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. mai 2011. Vol. 2, n° 3, p. 348-361. DOI 10.1002/wrna.56.

- EDMONDS, M. et ABRAMS, R., 1960. Polynucleotide biosynthesis: formation of a sequence of adenylate units from adenosine triphosphate by an enzyme from thymus nuclei. In : *The Journal of Biological Chemistry*. avril 1960. Vol. 235, p. 1142-1149.
- EMERY, Alan EH, 2002. The muscular dystrophies. In : *The Lancet*. février 2002. Vol. 359, n° 9307, p. 687-695. DOI 10.1016/S0140-6736(02)07815-7.
- ERKELENZ, S., MUELLER, W. F., EVANS, M. S., BUSCH, A., SCHONEWEIS, K., HERTEL, K. J. et SCHAAAL, H., 2013. Position-dependent splicing activation and repression by SR and hnRNP proteins rely on common mechanisms. In : *RNA*. 1 janvier 2013. Vol. 19, n° 1, p. 96-102. DOI 10.1261/rna.037044.112.
- FAN, X, DION, P, LAGANIERE, J, BRAIS, B et ROULEAU, G A, 2001. Oligomerization of polyalanine expanded PABPN1 facilitates nuclear protein aggregation that is associated with cell death. In : *Human molecular genetics*. 1 octobre 2001. Vol. 10, n° 21, p. 2341-2351.
- FAN, Xueping, MESSAED, Christiane, DION, Patrick, LAGANIERE, Janet, BRAIS, Bernard, KARPATI, George et ROULEAU, Guy A, 2003. HnRNP A1 and A/B interaction with PABPN1 in oculopharyngeal muscular dystrophy. In : *The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques*. août 2003. Vol. 30, n° 3, p. 244-251.
- FOX, M. S. et LITTLEFIELD, J. W., 1971. Reservations Concerning Gene Therapy. In : *Science*. 16 juillet 1971. Vol. 173, n° 3993, p. 195-195. DOI 10.1126/science.173.3993.195.
- FRANTZ, C., STEWART, K. M. et WEAVER, V. M., 2010. The extracellular matrix at a glance. In : *Journal of Cell Science*. 15 décembre 2010. Vol. 123, n° 24, p. 4195-4200. DOI 10.1242/jcs.023820.
- GIDARO, Teresa, NEGRONI, Elisa, PERIÉ, Sophie, MIRABELLA, Massimiliano, LAINÉ, Jeanne, LACAU ST GUILY, Jean, BUTLER-BROWNE, Gillian, MOULY, Vincent et TROLLET, Capucine, 2013. Atrophy, fibrosis, and increased PAX7-positive cells in pharyngeal muscles of oculopharyngeal muscular dystrophy patients. In : *Journal of neuropathology and experimental neurology*. mars 2013. Vol. 72, n° 3, p. 234-243. DOI 10.1097/NEN.0b013e3182854c07.
- GIRARD, Cyrille, WILL, Cindy L., PENG, Jianhe, MAKAROV, Evgeny M., KASTNER, Berthold, LEMM, Ira, URLAUB, Henning, HARTMUTH, Klaus et LÜHRMANN, Reinhard, 2012. Post-transcriptional spliceosomes are retained in nuclear speckles until splicing completion. In : *Nature Communications*. 7 août 2012. Vol. 3, p. 994. DOI 10.1038/ncomms1998.
- GONATOPOULOS-POURNATZIS, Thomas et COWLING, Victoria H., 2014. Cap-binding complex (CBC). In : *Biochemical Journal*. 15 janvier 2014. Vol. 457, n° 2, p. 231-242. DOI 10.1042/BJ20131214.
- GÖRLACH, Matthias, BURD, Christopher G. et DREYFUSS, Gideon, 1994. The mRNA Poly(A)-Binding Protein: Localization, Abundance, and RNA-Binding Specificity. In : *Experimental Cell Research*. avril 1994. Vol. 211, n° 2, p. 400-407. DOI 10.1006/excr.1994.1104.

GROUNDS, M. D., SOROKIN, L. et WHITE, J., 2005. Strength at the extracellular matrix-muscle interface. In : *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*. décembre 2005. Vol. 15, n° 6, p. 381-391. DOI 10.1111/j.1600-0838.2005.00467.x.

HANNON, Gregory J., 2002. RNA interference. In : *Nature*. 11 juillet 2002. Vol. 418, n° 6894, p. 244-251. DOI 10.1038/418244a.

HARISH, Pradeep, MALERBA, Alberto, DICKSON, George et BACHTARZI, Houria, 2015. Progress on gene therapy, cell therapy, and pharmacological strategies toward the treatment of oculopharyngeal muscular dystrophy. In : *Human gene therapy*. 2015. Vol. 26, n° 5, p. 286-292.

HAWKE, Thomas J. et GARRY, Daniel J., 2001. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. In : *Journal of Applied Physiology*. 1 août 2001. Vol. 91, n° 2, p. 534-551.

HAYES, R., LONDON, W., SEIDMAN, J. et EMBREEL, null, 1963. Oculopharyngeal muscular dystrophy. In : *The New England Journal of Medicine*. 17 janvier 1963. Vol. 268, p. 163. DOI 10.1056/NEJM196301172680319.

HEGELE, Anna, KAMBUROV, Atanas, GROSSMANN, Arndt, SOURLIS, Chrysovalantis, WOWRO, Sylvia, WEIMANN, Mareike, WILL, Cindy L., PENA, Vlad, LÜHRMANN, Reinhard et STELZL, Ulrich, 2012. Dynamic Protein-Protein Interaction Wiring of the Human Spliceosome. In : *Molecular Cell*. février 2012. Vol. 45, n° 4, p. 567-580. DOI 10.1016/j.molcel.2011.12.034.

HIGHLEY, J. Robin, KIRBY, Janine, JANSWEIJER, Joeri A., WEBB, Philip S., HEWAMADDUMA, Channa A., HEATH, Paul R., HIGGINBOTTOM, Adrian, RAMAN, Rohini, FERRAIUOLO, Laura, COOPER-KNOCK, Johnathan, MCDERMOTT, Christopher J., WHARTON, Stephen B., SHAW, Pamela J. et INCE, Paul G., 2014. Loss of nuclear TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) causes altered expression of splicing machinery and widespread dysregulation of RNA splicing in motor neurons. In : *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 1 octobre 2014. Vol. 40, n° 6, p. 670-685. DOI 10.1111/nan.12148.

HINO, Hirotake, ARAKI, Kimi, UYAMA, Eiichiro, TAKEYA, Motohiro, ARAKI, Masatake, YOSHINOBU, Kumiko, MIKE, Koichiro, KAWAZOE, Yasuhiro, MAEDA, Yasushi, UCHINO, Makoto et YAMAMURA, Ken-ichi, 2004. Myopathy phenotype in transgenic mice expressing mutated PABPN1 as a model of oculopharyngeal muscular dystrophy. In : *Human molecular genetics*. 15 janvier 2004. Vol. 13, n° 2, p. 181-190. DOI 10.1093/hmg/ddh017.

HOPKINS, Philip M., 2006. Skeletal muscle physiology. In : *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*. février 2006. Vol. 6, n° 1, p. 1-6. DOI 10.1093/bjaceaccp/mki062.

HOSKINS, Aaron A. et MOORE, Melissa J., 2012. The spliceosome: a flexible, reversible macromolecular machine. In : *Trends in Biochemical Sciences*. mai 2012. Vol. 37, n° 5, p. 179-188. DOI 10.1016/j.tibs.2012.02.009.

HUI, JingYi, 2009. Regulation of mammalian pre-mRNA splicing. In : *Science in China Series C: Life Sciences*. mars 2009. Vol. 52, n° 3, p. 253-260. DOI 10.1007/s11427-009-0037-0.

ISHIGAKI, Y, LI, X, SERIN, G et MAQUAT, L E, 2001. Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. In : *Cell*. 7 septembre 2001. Vol. 106, n° 5, p. 607-617.

JACOBSON, Allan et PELTZ, Stuart W., 1996. Interrelationships of the Pathways of mRNA Decay and Translation in Eukaryotic Cells. In : *Annual Review of Biochemistry*. 1996. Vol. 65, n° 1, p. 693-739. DOI 10.1146/annurev.bi.65.070196.003401.

JENAL, Mathias, ELKON, Ran, LOAYZA-PUCH, Fabricio, VAN HAAFTEN, Gijs, KÜHN, Uwe, MENZIES, Fiona M, OUDE VRIELINK, Joachim A F, BOS, Arnold J, DROST, Jarno, ROOIJERS, Koos, RUBINSZTEIN, David C et AGAMI, Reuven, 2012. The poly(A)-binding protein nuclear 1 suppresses alternative cleavage and polyadenylation sites. In : *Cell*. 27 avril 2012. Vol. 149, n° 3, p. 538-553. DOI 10.1016/j.cell.2012.03.022.

JI, G., GUAN, J., ZENG, Y., LI, Q. Q. et WU, X., 2015. Genome-wide identification and predictive modeling of polyadenylation sites in eukaryotes. In : *Briefings in Bioinformatics*. 1 mars 2015. Vol. 16, n° 2, p. 304-313. DOI 10.1093/bib/bbu011.

JOUAN, L., ROCHEFORD, D., SZUTO, A., CARNEY, E., DAVID, K., DION, P. A. et ROULEAU, G. A., 2014. An 18 alanine repeat in a severe form of oculopharyngeal muscular dystrophy. In : *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*. juillet 2014. Vol. 41, n° 4, p. 508-511.

JULIEN, J., VITAL, C., VALLAT, J. M., VALLAT, M. et LE BLANC, M., 1974. Oculopharyngeal muscular dystrophy. A case with abnormal mitochondria and « fingerprint » inclusions. In : *Journal of the Neurological Sciences*. février 1974. Vol. 21, n° 2, p. 165-169.

KELLER, Rebecca W., KÜHN, Uwe, ARAGÓN, Mateo, BORNÍKOVA, Larissa, WAHLE, Elmar et BEAR, David G., 2000. The nuclear poly(A) binding protein, PABP2, forms an oligomeric particle covering the length of the poly(A) tail. In : *Journal of Molecular Biology*. mars 2000. Vol. 297, n° 3, p. 569-583. DOI 10.1006/jmbi.2000.3572.

KERWITZ, Yvonne, KÜHN, Uwe, LILIE, Hauke, KNOTH, Anne, SCHEUERMANN, Till, FRIEDRICH, Henning, SCHWARZ, Elisabeth et WAHLE, Elmar, 2003. Stimulation of poly(A) polymerase through a direct interaction with the nuclear poly(A) binding protein allosterically regulated by RNA. In : *The EMBO journal*. 15 juillet 2003. Vol. 22, n° 14, p. 3705-3714. DOI 10.1093/emboj/cdg347.

KIM, Daniel H. et ROSSI, John J., 2007. Strategies for silencing human disease using RNA interference. In : *Nature Reviews Genetics*. mars 2007. Vol. 8, n° 3, p. 173-184. DOI 10.1038/nrg2006.

KIM, Daniel et ROSSI, John, 2008. RNAi mechanisms and applications. In : *BioTechniques*. avril 2008. Vol. 44 Supplement, n° 4, p. 613-616. DOI 10.2144/000112792.

KIM, Y J, NOGUCHI, S, HAYASHI, Y K, TSUKAHARA, T, SHIMIZU, T et ARAHATA, K, 2001. The product of an oculopharyngeal muscular dystrophy gene, poly(A)-binding protein 2, interacts with SKIP and stimulates muscle-specific gene expression. In : *Human molecular genetics*. 15 mai 2001. Vol. 10, n° 11, p. 1129-1139.

KLEIN, Arnaud F, EBIHARA, Mitsuru, ALEXANDER, Christine, DICAIRE, Marie-Josée, SASSEVILLE, A Marie-Josée, LANGELIER, Yves, ROULEAU, Guy A et BRAIS, Bernard, 2008. PABPN1 polyalanine tract deletion and long expansions modify its aggregation pattern and expression. In : *Experimental cell research*. 1 mai 2008. Vol. 314, n° 8, p. 1652-1666. DOI 10.1016/j.yexcr.2008.02.005.

KOEBIS, Michinori, OHSAWA, Natsumi, KINO, Yoshihiro, SASAGAWA, Noboru, NISHINO, Ichizo et ISHIURA, Shoichi, 2011. Alternative splicing of myomesin 1 gene is aberrantly regulated in myotonic dystrophy type 1. In : *Genes to Cells*. 1 septembre 2011. Vol. 16, n° 9, p. 961-972. DOI 10.1111/j.1365-2443.2011.01542.x.

KRAUSE, S., FAKAN, S., WEIS, K. et WAHLE, E., 1994. Immunodetection of poly(A) binding protein II in the cell nucleus. In : *Experimental Cell Research*. septembre 1994. Vol. 214, n° 1, p. 75-82. DOI 10.1006/excr.1994.1235.

KÜHN, Uwe, GÜNDEL, Miriam, KNOTH, Anne, KERWITZ, Yvonne, RÜDEL, Sabine et WAHLE, Elmar, 2009. Poly(A) tail length is controlled by the nuclear poly(A)-binding protein regulating the interaction between poly(A) polymerase and the cleavage and polyadenylation specificity factor. In : *The Journal of biological chemistry*. 21 août 2009. Vol. 284, n° 34, p. 22803-22814. DOI 10.1074/jbc.M109.018226.

KÜHN, Uwe, NEMETH, Anne, MEYER, Sylke et WAHLE, Elmar, 2003. The RNA binding domains of the nuclear poly(A)-binding protein. In : *The Journal of biological chemistry*. 9 mai 2003. Vol. 278, n° 19, p. 16916-16925. DOI 10.1074/jbc.M209886200.

KÜHN, Uwe et WAHLE, Elmar, 2004. Structure and function of poly(A) binding proteins. In : *Biochimica et biophysica acta*. 25 mai 2004. Vol. 1678, n° 2-3, p. 67-84. DOI 10.1016/j.bbaexp.2004.03.008.

KWONG, Jennifer Q., HENNING, Matthew S., STARKOV, Anatoly A. et MANFREDI, Giovanni, 2007. The mitochondrial respiratory chain is a modulator of apoptosis. In : *The Journal of Cell Biology*. 17 décembre 2007. Vol. 179, n° 6, p. 1163-1177. DOI 10.1083/jcb.200704059.

LAMOND, Angus I. et SPECTOR, David L., 2003. Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. In : *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. août 2003. Vol. 4, n° 8, p. 605-612. DOI 10.1038/nrm1172.

LE BIHAN, Marie-Catherine, BIGOT, Anne, JENSEN, Søren Skov, DENNIS, Jayne L., ROGOWSKA-WRZESINSKA, Adelina, LAINÉ, Jeanne, GACHE, Vincent, FURLING, Denis, JENSEN, Ole Nørregaard, VOIT, Thomas, MOULY, Vincent, COULTON, Gary R. et BUTLER-BROWNE, Gillian, 2012. In-depth analysis of the secretome identifies three major independent secretory pathways in differentiating human myoblasts. In : *Journal of Proteomics*. décembre 2012. Vol. 77, p. 344-356. DOI 10.1016/j.jprot.2012.09.008.

LEE, Yeon et RIO, Donald C., 2015a. Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. In : *Annual Review of Biochemistry*. 2015. Vol. 84, p. 291-323. DOI 10.1146/annurev-biochem-060614-034316.

LEE, Yeon et RIO, Donald C., 2015b. Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. In : *Annual Review of Biochemistry*. 2 juin 2015. Vol. 84, n° 1, p. 291-323. DOI 10.1146/annurev-biochem-060614-034316.

LEE, Young Jae, LEE, Jaehyouk, YANG, In Chul, HAHN, Yoonsoo, LEE, Younghoon et CHUNG, Jae Hoon, 1998. Genomic structure and expression of murine poly(A) binding protein II gene. In : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*. janvier 1998. Vol. 1395, n° 1, p. 40-46. DOI 10.1016/S0167-4781(97)00147-4.

LEMAY, Jean-François, D'AMOURS, Annie, LEMIEUX, Caroline, LACKNER, Daniel H, ST-SAUVEUR, Valérie G, BÄHLER, Jürg et BACHAND, François, 2010. The nuclear poly(A)-binding protein interacts with the exosome to promote synthesis of noncoding small nucleolar RNAs. In : *Molecular cell*. 15 janvier 2010. Vol. 37, n° 1, p. 34-45. DOI 10.1016/j.molcel.2009.12.019.

LEUNG, Sara W., APPONI, Luciano H., CORNEJO, Omar E., KITCHEN, Chad M., VALENTINI, Sandro R., PAVLATH, Grace K., DUNHAM, Christine M. et CORBETT, Anita H., 2009. Splice variants of the human ZC3H14 gene generate multiple isoforms of a zinc finger polyadenosine RNA binding protein. In : *Gene*. 15 juin 2009. Vol. 439, n° 1-2, p. 71-78. DOI 10.1016/j.gene.2009.02.022.

LEZZA, Angela M.S, CORMIO, Antonella, GERARDI, Patrizia, SILVESTRI, Gabriella, SERVIDEI, Serena, SERLENGA, Luigi, CANTATORE, Palmiro et GADALETA, Maria Nicola, 1997. Mitochondrial DNA deletions in oculopharyngeal muscular dystrophy. In : *FEBS Letters*. 24 novembre 1997. Vol. 418, n° 1-2, p. 167-170. DOI 10.1016/S0014-5793(97)01374-4.

LI, Yun R., KING, Oliver D., SHORTER, James et GITLER, Aaron D., 2013. Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis. In : *The Journal of Cell Biology*. 29 avril 2013. Vol. 201, n° 3, p. 361-372. DOI 10.1083/jcb.201302044.

LIEBER, R. L. et WARD, S. R., 2013. Cellular Mechanisms of Tissue Fibrosis. 4. Structural and functional consequences of skeletal muscle fibrosis. In : *AJP: Cell Physiology*. 1 août 2013. Vol. 305, n° 3, p. C241-C252. DOI 10.1152/ajpcell.00173.2013.

LIN, Michael T. et BEAL, M. Flint, 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. In : *Nature*. 19 octobre 2006. Vol. 443, n° 7113, p. 787-795. DOI 10.1038/nature05292.

LITTLE, B. W. et PERL, D. P., 1982. Oculopharyngeal muscular dystrophy. An autopsied case from the French-Canadian kindred. In : *Journal of the Neurological Sciences*. février 1982. Vol. 53, n° 2, p. 145-158.

LODDERSTEDT, Grit, SACHS, Rolf, FAUST, Jürgen, BORDUSA, Frank, KÜHN, Uwe, GOLBIK, Ralph, KERTH, Andreas, WAHLE, Elmar, BALBACH, Jochen et SCHWARZ, Elisabeth, 2008. Hofmeister salts and potential therapeutic compounds accelerate in vitro fibril formation of the N-terminal domain of PABPN1 containing a disease-causing alanine extension. In : *Biochemistry*. 19 février 2008. Vol. 47, n° 7, p. 2181-2189. DOI 10.1021/bi701322g.

LUIGETTI, Marco, LO MONACO, Mauro, MIRABELLA, Massimiliano, PRIMIANO, Guido, LUCCHINI, Matteo, MONFORTE, Mauro et SERVIDEI, Serenella, 2015. Oculopharyngeal muscular dystrophy: Clinical and neurophysiological features. In : *Clinical Neurophysiology*. décembre 2015. Vol. 126, n° 12, p. 2406-2408. DOI 10.1016/j.clinph.2015.03.005.

MAGNER, Martin, KOLÁŘOVÁ, Hana, HONZIK, Tomáš, ŠVANDOVÁ, Ivana et ZEMAN, Jiří, 2015. Clinical manifestation of mitochondrial diseases. In : *Developmental Period Medicine*. décembre 2015. Vol. 19, n° 4, p. 441-449.

MANKODI, Ami, WHEELER, Thurman M, SHETTY, Reena, SALCEIES, Kelly M, BECHER, Mark W et THORNTON, Charles A, 2012. Progressive myopathy in an inducible mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy. In : *Neurobiology of disease*. janvier 2012. Vol. 45, n° 1, p. 539-546. DOI 10.1016/j.nbd.2011.09.010.

MAO, Yuntao S., ZHANG, Bin et SPECTOR, David L., 2011. Biogenesis and function of nuclear bodies. In : *Trends in genetics: TIG*. août 2011. Vol. 27, n° 8, p. 295-306. DOI 10.1016/j.tig.2011.05.006.

MAQUAT, Lynne E., 2004. Nonsense-Mediated mRNA Decay: Splicing, Translation And mRNP Dynamics. In : *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. février 2004. Vol. 5, n° 2, p. 89-99. DOI 10.1038/nrm1310.

MAQUAT, Lynne E., TARN, Woan-Yuh et ISKEN, Olaf, 2010. The Pioneer Round of Translation: Features and Functions. In : *Cell*. août 2010. Vol. 142, n° 3, p. 368-374. DOI 10.1016/j.cell.2010.07.022.

MARIE-JOSÉE SASSEVILLE, A., CARON, Antoine W., BOURGET, Lucie, KLEIN, Arnaud F., DICAIRE, Marie-Josée, ROULEAU, Guy A., MASSIE, Bernard, LANGELIER, Yves et BRAIS, Bernard, 2006. The dynamism of PABPN1 nuclear inclusions during the cell cycle. In : *Neurobiology of Disease*. septembre 2006. Vol. 23, n° 3, p. 621-629. DOI 10.1016/j.nbd.2006.05.015.

MASSON, Elsevier, [sans date]. Dystrophie musculaire oculopharyngée. In : *EM-Consulte* [en ligne]. [Consulté le 4 juillet 2016]. Disponible à l'adresse : <http://www.em-consulte.com/article/1062160/dystrophie-musculaire-oculopharyngee>.

MERCURI, Eugenio et MUNTONI, Francesco, 2013. Muscular dystrophies. In : *Lancet (London, England)*. 9 mars 2013. Vol. 381, n° 9869, p. 845-860. DOI 10.1016/S0140-6736(12)61897-2.

MESSAED, C et ROULEAU, G A, 2009. Molecular mechanisms underlying polyalanine diseases. In : *Neurobiology of disease*. juin 2009. Vol. 34, n° 3, p. 397-405. DOI 10.1016/j.nbd.2009.02.013.

MESSAED, Christiane, DION, Patrick A, ABU-BAKER, Aida, ROCHEFORT, Daniel, LAGANIERE, Janet, BRAIS, Bernard et ROULEAU, Guy A, 2007. Soluble expanded PABPN1 promotes cell death in oculopharyngeal muscular dystrophy. In : *Neurobiology of disease*. juin 2007. Vol. 26, n° 3, p. 546-557. DOI 10.1016/j.nbd.2007.02.004.

MEYER, Sylke, URBANKE, Claus et WAHLE, Elmar, 2002. Equilibrium studies on the association of the nuclear poly(A) binding protein with poly(A) of different lengths. In : *Biochemistry*. 14 mai 2002. Vol. 41, n° 19, p. 6082-6089.

MÜLLER-MCNICOLL, Michaela et NEUGEBAUER, Karla M., 2013. How cells get the message: dynamic assembly and function of mRNA–protein complexes. In : *Nature Reviews Genetics*. 12 mars 2013. Vol. 14, n° 4, p. 275-287. DOI 10.1038/nrg3434.

MUNIZ, Lisa, DAVIDSON, Lee et WEST, Steven, 2015. Poly(A) Polymerase and the Nuclear Poly(A) Binding Protein, PABPN1, Coordinate the Splicing and Degradation of a Subset of Human Pre-mRNAs. In : *Molecular and Cellular Biology*. 1 juillet 2015. Vol. 35, n° 13, p. 2218-2230. DOI 10.1128/MCB.00123-15.

MUQIT, M M K, LARNER, A J, SWEENEY, M G, SEWRY, C, STINTON, V J, DAVIS, M B, HEALY, D G, PAYNE, S J, CHOTAI, K, WOOD, N W et LANE, R J M, 2008. Multiple mitochondrial DNA deletions in monozygotic twins with OPMD. In : *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 1 janvier 2008. Vol. 79, n° 1, p. 68-71. DOI 10.1136/jnnp.2006.112250.

NAKAMOTO, Mika, NAKANO, Satoshi, KAWASHIMA, Shingo, IHARA, Masafumi, NISHIMURA, Yo, SHINDE, Akiyo et KAKIZUKA, Akira, 2002. Unequal crossing-over in unique PABP2 mutations in Japanese patients: a possible cause of oculopharyngeal muscular dystrophy. In : *Archives of neurology*. mars 2002. Vol. 59, n° 3, p. 474-477.

NAYEROSSADAT, Nouri, ALI, PalizbanAbas et MAEDEH, Talebi, 2012. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. In : *Advanced Biomedical Research*. 2012. Vol. 1, n° 1, p. 27. DOI 10.4103/2277-9175.98152.

NEGRONI, Elisa, BIGOT, Anne, BUTLER-BROWNE, Gillian S., TROLLET, Capucine et MOULY, Vincent, 2016. Cellular Therapies for Muscular Dystrophies: Frustrations and Clinical Successes. In : *Human Gene Therapy*. février 2016. Vol. 27, n° 2, p. 117-126. DOI 10.1089/hum.2015.139.

NEGRONI, Elisa, GIDARO, Teresa, BIGOT, Anne, BUTLER-BROWNE, Gillian S., MOULY, Vincent et TROLLET, Capucine, 2015. Invited review: Stem cells and muscle diseases: advances in cell therapy strategies: Advances in cell therapy strategies. In : *Neuropathology and Applied Neurobiology*. avril 2015. Vol. 41, n° 3, p. 270-287. DOI 10.1111/nan.12198.

NEMETH, A., KRAUSE, S., BLANK, D., JENNY, A., JENÖ, P., LUSTIG, A. et WAHLE, E., 1995. Isolation of genomic and cDNA clones encoding bovine poly(A) binding protein II. In : *Nucleic Acids Research*. 25 octobre 1995. Vol. 23, n° 20, p. 4034-4041.

NGUYEN, Duy, GRENIER ST-SAUVEUR, Valérie, BERGERON, Danny, DUPUIS-SANDOVAL, Fabien, SCOTT, Michelle S. et BACHAND, François, 2015. A Polyadenylation-Dependent 3' End Maturation Pathway Is Required for the Synthesis of the Human Telomerase RNA. In : *Cell Reports*. 15 décembre 2015. Vol. 13, n° 10, p. 2244-2257. DOI 10.1016/j.celrep.2015.11.003.

PAN, Qun, SHAI, Ofer, LEE, Leo J., FREY, Brendan J. et BLENCOWE, Benjamin J., 2008. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-

throughput sequencing. In : *Nature Genetics*. décembre 2008. Vol. 40, n° 12, p. 1413-1415. DOI 10.1038/ng.259.

PASCO, Matthieu Y, ROTILI, Dante, ALTUCCI, Lucia, FARINA, Francesca, ROULEAU, Guy A, MAI, Antonello et NÉRI, Christian, 2010. Characterization of sirtuin inhibitors in nematodes expressing a muscular dystrophy protein reveals muscle cell and behavioral protection by specific sirtinol analogues. In : *Journal of medicinal chemistry*. 11 février 2010. Vol. 53, n° 3, p. 1407-1411. DOI 10.1021/jm9013345.

PAUWS, E., VAN KAMPEN, A. H. C., VAN DE GRAAF, S. A. R., DE VIJLDER, J. J. M. et RIS-STALPERS, C., 2001. Heterogeneity in polyadenylation cleavage sites in mammalian mRNA sequences: implications for SAGE analysis. In : *Nucleic Acids Research*. 15 avril 2001. Vol. 29, n° 8, p. 1690-1694.

PAUZNER, R, BLATT, I, MOUALLEM, M, BEN-DAVID, E, FARFEL, Z et SADEH, M, 1991. Mitochondrial abnormalities in oculopharyngeal muscular dystrophy. In : *Muscle & nerve*. octobre 1991. Vol. 14, n° 10, p. 947-952. DOI 10.1002/mus.880141004.

PÉRIÉ, Sophie, MAMCHAOU, Kamel, MOULY, Vincent, BLOT, Stéphane, BOUAZZA, Belaïd, THORNELL, Lars-Eric, ST GUILY, Jean Lacau et BUTLER-BROWNE, Gillian, 2006. Premature proliferative arrest of cricopharyngeal myoblasts in oculo-pharyngeal muscular dystrophy: Therapeutic perspectives of autologous myoblast transplantation. In : *Neuromuscular disorders: NMD*. novembre 2006. Vol. 16, n° 11, p. 770-781. DOI 10.1016/j.nmd.2006.07.022.

PÉRIÉ, Sophie, TROLLET, Capucine, MOULY, Vincent, VANNEAUX, Valérie, MAMCHAOU, Kamel, BOUAZZA, Belaïd, PIERRE MAROLLEAU, Jean, LAFORÊT, Pascal, CHAPON, Françoise, EYMARD, Bruno, BUTLER-BROWNE, Gillian, LARGHERO, Jérôme et ST GUILY, Jean Lacau, 2013. Autologous myoblast transplantation for oculopharyngeal muscular dystrophy: a Phase I/IIa clinical study. In : *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*. 8 juillet 2013. DOI 10.1038/mt.2013.155.

PICARD, M., HEPPLER, R. T. et BURELLE, Y., 2012. Mitochondrial functional specialization in glycolytic and oxidative muscle fibers: tailoring the organelle for optimal function. In : *AJP: Cell Physiology*. 15 février 2012. Vol. 302, n° 4, p. C629-C641. DOI 10.1152/ajpcell.00368.2011.

PISTONI, Mariaelena, GHIGNA, Claudia et GABELLINI, Davide, 2010. Alternative splicing and muscular dystrophy. In : *RNA biology*. 2010. Vol. 7, n° 4, p. 441-452.

PRATT, Michael F. et MEYERS, Peter K., 1986. Oculopharyngeal muscular dystrophy: Recent ultrastructural evidence for mitochondrial abnormalities. In : *The Laryngoscope*. avril 1986. Vol. 96, n° 4, p. 368-373. DOI 10.1288/00005537-198604000-00006.

PROUDFOOT, N. J., 2011. Ending the message: poly(A) signals then and now. In : *Genes & Development*. 1 septembre 2011. Vol. 25, n° 17, p. 1770-1782. DOI 10.1101/gad.17268411.

PROUDFOOT, Nick J., FURGER, Andre et DYE, Michael J., 2002. Integrating mRNA Processing with Transcription. In : *Cell*. février 2002. Vol. 108, n° 4, p. 501-512. DOI 10.1016/S0092-8674(02)00617-7.

RAGHOW, R., 1994. The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. In : *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. août 1994. Vol. 8, n° 11, p. 823-831.

RAZ, Vered, BUIJZE, Hellen, RAZ, Yotam, VERWEY, Nisha, ANVAR, Seyed Yahya, AARTSMA-RUS, Annemieke et VAN DER MAAREL, Silvère M., 2014. A novel feed-forward loop between ARIH2 E3-ligase and PABPN1 regulates aging-associated muscle degeneration. In : *The American Journal of Pathology*. avril 2014. Vol. 184, n° 4, p. 1119-1131. DOI 10.1016/j.ajpath.2013.12.011.

RAZ, Vered, ROUTLEDGE, Samantha, VENEMA, Andrea, BUIJZE, Hellen, VAN DER WAL, Erik, ANVAR, Seyedyahya, STRAASHEIJM, Kirsten R, KLOOSTER, Rinse, ANTONIOU, Michael et VAN DER MAAREL, Silvère M, 2011. Modeling oculopharyngeal muscular dystrophy in myotube cultures reveals reduced accumulation of soluble mutant PABPN1 protein. In : *The American journal of pathology*. octobre 2011. Vol. 179, n° 4, p. 1988-2000. DOI 10.1016/j.ajpath.2011.06.044.

RAZ, Vered, STERRENBURG, Ellen, ROUTLEDGE, Samantha, VENEMA, Andrea, VAN DER SLUIJS, Barbara M, TROLLET, Capucine, DICKSON, George, VAN ENGELEN, Baziel G M, VAN DER MAAREL, Silvère M et ANTONIOU, Michael N, 2013. Nuclear entrapment and extracellular depletion of PCOLCE is associated with muscle degeneration in oculopharyngeal muscular dystrophy. In : *BMC neurology*. 2013. Vol. 13, p. 70. DOI 10.1186/1471-2377-13-70.

RIAZ, Muhammad, RAZ, Yotam, VAN PUTTEN, Maaike, PANIAGUA-SORIANO, Guillem, KROM, Yvonne D., FLOREA, Bogdan I. et RAZ, Vered, 2016. PABPN1-Dependent mRNA Processing Induces Muscle Wasting. In : COX, Gregory A. (éd.), *PLOS Genetics*. 6 mai 2016. Vol. 12, n° 5, p. e1006031. DOI 10.1371/journal.pgen.1006031.

RICHARD, Pascale, TROLLET, Capucine, GIDARO, Teresa, DEMAY, Laurence, BROCHIER, Guy, MALFATTI, Edoardo, TOM, Fernando MS, FARDEAU, Michel, LAFOR, Pascal, ROMERO, Norma, MARTIN-N, Marie-Laure, SOL, Guilhem, FERRER-MONASTERIO, Xavier, SAINT-GUILY, Jean Lacau et EYMARD, Bruno, 2015. PABPN1 (GCN)11 as a Dominant Allele in Oculopharyngeal Muscular Dystrophy – Consequences in Clinical Diagnosis and Genetic Counselling. In : *Journal of Neuromuscular Diseases*. 14 mai 2015. Vol. 2, n° 2, p. 175-180. DOI 10.3233/JND-140060.

RISSLAND, Olivia S., 2016. The organization and regulation of mRNA–protein complexes. In : *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. juin 2016. p. n/a-n/a. DOI 10.1002/wrna.1369.

ROTH, K. M., WOLF, M. K., ROSSI, M. et BUTLER, J. S., 2005. The Nuclear Exosome Contributes to Autogenous Control of NAB2 mRNA Levels. In : *Molecular and Cellular Biology*. 1 mars 2005. Vol. 25, n° 5, p. 1577-1585. DOI 10.1128/MCB.25.5.1577-1585.2005.

SACKEWITZ, Mirko, VON EINEM, Sabrina, HAUSE, Gerd, WUNDERLICH, Michael, SCHMID, Franz-Xaver et SCHWARZ, Elisabeth, 2008. A folded and functional protein domain in an amyloid-like fibril. In : *Protein science: a publication of the Protein Society*. juin 2008. Vol. 17, n° 6, p. 1044-1054. DOI 10.1110/ps.073276308.

SAEZ, Isabel et VILCHEZ, David, 2014. The Mechanistic Links Between Proteasome Activity, Aging and Age-related Diseases. In : *Current Genomics*. 31 mars 2014. Vol. 15, n° 1, p. 38-51. DOI 10.2174/138920291501140306113344.

SANDRI, M, 1999. Apoptosis of skeletal muscles during development and disease. In : *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. décembre 1999. Vol. 31, n° 12, p. 1373-1390. DOI 10.1016/S1357-2725(99)00063-1.

SCHIAFFINO, S. et REGGIANI, C., 2011. Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles. In : *Physiological Reviews*. 1 octobre 2011. Vol. 91, n° 4, p. 1447-1531. DOI 10.1152/physrev.00031.2010.

SCHILDER, Rudolf J., KIMBALL, Scot R. et JEFFERSON, Leonard S., 2012. Cell-autonomous regulation of fast troponin T pre-mRNA alternative splicing in response to mechanical stretch. In : *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. 1 août 2012. Vol. 303, n° 3, p. C298-307. DOI 10.1152/ajpcell.00400.2011.

SCHON, Eric A. et PRZEDBORSKI, Serge, 2011. Mitochondria: The Next (Neurode)Generation. In : *Neuron*. juin 2011. Vol. 70, n° 6, p. 1033-1053. DOI 10.1016/j.neuron.2011.06.003.

SCHRÖDER, J M, KRABBE, B et WEIS, J, 1995. Oculopharyngeal muscular dystrophy: clinical and morphological follow-up study reveals mitochondrial alterations and unique nuclear inclusions in a severe autosomal recessive type. In : *Neuropathology and applied neurobiology*. février 1995. Vol. 21, n° 1, p. 68-73.

SEMMLER, Alexander, KRESS, Wolfram, VIELHABER, Stefan, SCHRÖDER, Rolf et KORNBLUM, Cornelia, 2007. Variability of the recessive oculopharyngeal muscular dystrophy phenotype. In : *Muscle & nerve*. mai 2007. Vol. 35, n° 5, p. 681-684. DOI 10.1002/mus.20726.

SHEETS, Michael D. et WICKENS, Marvin, 1989. Two phases in the addition of a poly (A) tail. In : *Genes & development*. 1989. Vol. 3, n° 9, p. 1401-1412.

SHI, Yongsheng, DI GIAMMARTINO, Dafne Campigli, TAYLOR, Derek, SARKESHIK, Ali, RICE, William J., YATES, John R., FRANK, Joachim et MANLEY, James L., 2009. Molecular architecture of the human pre-mRNA 3' processing complex. In : *Molecular Cell*. 13 février 2009. Vol. 33, n° 3, p. 365-376. DOI 10.1016/j.molcel.2008.12.028.

SIMONELIG, Martine, 2012. PABPN1 shuts down alternative poly(A) sites. In : *Cell Research*. 29 mai 2012. Vol. 22, n° 10, p. 1419-1421. DOI 10.1038/cr.2012.86.

SLEEMAN, Judith E et TRINKLE-MULCAHY, Laura, 2014. Nuclear bodies: new insights into assembly/dynamics and disease relevance. In : *Current Opinion in Cell Biology*. juin 2014. Vol. 28, p. 76-83. DOI 10.1016/j.ceb.2014.03.004.

SOUQUERE, Sylvie, WEIL, Dominique et PIERRON, Gérard, 2015. Comparative ultrastructure of CRM1-Nucleolar bodies (CNoBs), Intranucleolar bodies (INBs) and hybrid PML/p62 bodies uncovers new facets of nuclear body dynamic and diversity. In : *Nucleus*. 4 juillet 2015. Vol. 6, n° 4, p. 326-338. DOI 10.1080/19491034.2015.1082695.

ST GUILY, J. L., MOINE, A., PÉRIÉ, S., BOKOWY, C., ANGELARD, B. et CHAUSSADE, S., 1995. Role of pharyngeal propulsion as an indicator for upper esophageal sphincter myotomy. In : *The Laryngoscope*. juillet 1995. Vol. 105, n° 7 Pt 1, p. 723-727. DOI 10.1288/00005537-199507000-00010.

SU, Jing, EKMAN, Carl, OSKOLKOV, Nikolay, LAHTI, Leo, STRÖM, Kristoffer, BRAZMA, Alvis, GROOP, Leif, RUNG, Johan et HANSSON, Ola, 2015. A novel atlas of gene expression in human skeletal muscle reveals molecular changes associated with aging. In : *Skeletal Muscle* [en ligne]. décembre 2015. Vol. 5, n° 1. [Consulté le 12 juillet 2016]. DOI 10.1186/s13395-015-0059-1. Disponible à l'adresse : <http://www.skeletalmusclejournal.com/content/5/1/35>.

TAILLANDIER, Daniel, COMBARET, Lydie, POUCH, Marie-Noëlle, SAMUELS, Susan E., BÉCHET, Daniel et ATTAIX, Didier, 2004. The role of ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in the remodelling of skeletal muscle. In : *The Proceedings of the Nutrition Society*. mai 2004. Vol. 63, n° 2, p. 357-361. DOI 10.1079/PAR2004358.

TAVANEZ, João Paulo, CALADO, Patricia, BRAGA, José, LAFARGA, Miguel et CARMO-FONSECA, Maria, 2005. In vivo aggregation properties of the nuclear poly(A)-binding protein PABPN1. In : *RNA (New York, N.Y.)*. mai 2005. Vol. 11, n° 5, p. 752-762. DOI 10.1261/rna.7217105.

TAYLOR EW, 1915. Progressive vagus-glossopharyngeal paralysis with ptosis, A contribution to the group of family diseases. In : *Journal of nervous and mental disease*. 1915. Vol. 42, 3, p. p. 129-139.

TAZI, Jamal, BAKKOUR, Nadia et STAMM, Stefan, 2009. Alternative splicing and disease. In : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. janvier 2009. Vol. 1792, n° 1, p. 14-26. DOI 10.1016/j.bbadis.2008.09.017.

TODD, Tiffany W. et LIM, Janghoo, 2013. Aggregation formation in the polyglutamine diseases: Protection at a cost? In : *Molecules and Cells*. septembre 2013. Vol. 36, n° 3, p. 185-194. DOI 10.1007/s10059-013-0167-x.

TOMÉ, F M, CHATEAU, D, HELBLING-LECLERC, A et FARDEAU, M, 1997. Morphological changes in muscle fibers in oculopharyngeal muscular dystrophy. In : *Neuromuscular disorders: NMD*. octobre 1997. Vol. 7 Suppl 1, p. S63-69.

TOMÉ, F M et FARDEAU, M, 1980. Nuclear inclusions in oculopharyngeal dystrophy. In : *Acta neuropathologica*. 1980. Vol. 49, n° 1, p. 85-87.

TROLLET, Capucine, ANVAR, Seyed Yahya, VENEMA, Andrea, HARGREAVES, Iain P, FOSTER, Keith, VIGNAUD, Alban, FERRY, Arnaud, NEGRONI, Elisa, HOURDE, Christophe, BARAIBAR, Martin A, 'T HOEN, Peter A C, DAVIES, Janet E, RUBINSZTEIN, David C, HEALES, Simon J, MOULY, Vincent, VAN DER MAAREL, Silvère M, BUTLER-BROWNE, Gillian, RAZ, Vered et DICKSON, George, 2010. Molecular and phenotypic characterization of a mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy reveals severe muscular atrophy restricted to fast glycolytic fibres. In : *Human molecular genetics*. 1 juin 2010. Vol. 19, n° 11, p. 2191-2207. DOI 10.1093/hmg/ddq098.

VALSALAKUMARI, Janardhanan, BABY, JomonN, BIJIN, ElambilanN, CONSTANTINE, Icey, MANJILA, SteffyB et PRAMOD, Kannissery, 2013. Novel gene delivery systems. In : *International Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2013. Vol. 3, n° 1, p. 1. DOI 10.4103/2230-973X.108958.

VAN DER SLUIJS, B.M., RAZ, V., LAMMENS, M., VAN DEN HEUVEL, L.P., VOERMANS, N.C. et VAN ENGELEN, B.G.M., 2016. Intranuclear Aggregates Precede Clinical Onset in Oculopharyngeal Muscular Dystrophy. In : *Journal of Neuromuscular Diseases*. 3 mars 2016. Vol. 3, n° 1, p. 101-109. DOI 10.3233/JND-150118.

VARGAS, Diana Y., SHAH, Khyati, BATISH, Mona, LEVANDOSKI, Michael, SINHA, Sourav, MARRAS, Salvatore A.E., SCHEDL, Paul et TYAGI, Sanjay, 2011. Single-Molecule Imaging of Transcriptionally Coupled and Uncoupled Splicing. In : *Cell*. novembre 2011. Vol. 147, n° 5, p. 1054-1065. DOI 10.1016/j.cell.2011.10.024.

VERHEESEN, P., 2005. Prevention of oculopharyngeal muscular dystrophy-associated aggregation of nuclear poly(A)-binding protein with a single-domain intracellular antibody. In : *Human Molecular Genetics*. 30 novembre 2005. Vol. 15, n° 1, p. 105-111. DOI 10.1093/hmg/ddi432.

VICTOR, M., HAYES, R. et ADAMS, R. D., 1962. Oculopharyngeal muscular dystrophy. A familial disease of late life characterized by dysphagia and progressive ptosis of the eyelids. In : *The New England Journal of Medicine*. 20 décembre 1962. Vol. 267, p. 1267-1272. DOI 10.1056/NEJM196212202672501.

VIGNAUD, Alban, FERRY, Arnaud, HUGUET, Aline, BARAIBAR, Martin, TROLLET, Capucine, HYZEWICZ, Janek, BUTLER-BROWNE, Gillian, PUYMIRAT, Jack, GOURDON, Genevieve et FURLING, Denis, 2010. Progressive skeletal muscle weakness in transgenic mice expressing CTG expansions is associated with the activation of the ubiquitin-proteasome pathway. In : *Neuromuscular disorders: NMD*. mai 2010. Vol. 20, n° 5, p. 319-325. DOI 10.1016/j.nmd.2010.03.006.

WAHLE, E., 1991. A novel poly(A)-binding protein acts as a specificity factor in the second phase of messenger RNA polyadenylation. In : *Cell*. 23 août 1991. Vol. 66, n° 4, p. 759-768.

WAHLE, E., 1992. The end of the message: 3'-end processing leading to polyadenylated messenger RNA. In : *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*. février 1992. Vol. 14, n° 2, p. 113-118. DOI 10.1002/bies.950140208.

WAHLE, E., 1995. Poly(A) tail length control is caused by termination of processive synthesis. In : *The Journal of Biological Chemistry*. 10 février 1995. Vol. 270, n° 6, p. 2800-2808.

WAHLE, E. et KELLER, W., 1992. The biochemistry of 3'-end cleavage and polyadenylation of messenger RNA precursors. In : *Annual Review of Biochemistry*. 1992. Vol. 61, p. 419-440. DOI 10.1146/annurev.bi.61.070192.002223.

WAHLE, E., LUSTIG, A., JENÖ, P. et MAURER, P., 1993. Mammalian poly(A)-binding protein II. Physical properties and binding to polynucleotides. In : *The Journal of Biological Chemistry*. 5 février 1993. Vol. 268, n° 4, p. 2937-2945.

WANG, Dan et GAO, Guangping, [sans date]. State-Of-The-Art Human Gene Therapy: Part I. Gene Delivery Technologies. In : *Discovery Medicine*. Vol. 18, n° 97, p. 67-77.

WANG, Qishan et BAG, Jnanankur, 2008. Induction of expression and co-localization of heat shock polypeptides with the polyalanine expansion mutant of poly(A)-binding protein N1 after chemical stress. In : *Biochemical and biophysical research communications*. 23 mai 2008. Vol. 370, n° 1, p. 11-15. DOI 10.1016/j.bbrc.2008.02.162.

WANG, Qishan, MOSSER, Dick D et BAG, Jnanankur, 2005. Induction of HSP70 expression and recruitment of HSC70 and HSP70 in the nucleus reduce aggregation of a polyalanine expansion mutant of PABPN1 in HeLa cells. In : *Human molecular genetics*. 1 décembre 2005. Vol. 14, n° 23, p. 3673-3684. DOI 10.1093/hmg/ddi395.

WANG, Z. et BURGE, C. B., 2008. Splicing regulation: From a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. In : *RNA*. 27 mars 2008. Vol. 14, n° 5, p. 802-813. DOI 10.1261/rna.876308.

WIGINGTON, Callie P., WILLIAMS, Kathryn R., MEERS, Michael P., BASSELL, Gary J. et CORBETT, Anita H., 2014a. Poly(A) RNA-binding proteins and polyadenosine RNA: new members and novel functions. In : *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. 1 septembre 2014. Vol. 5, n° 5, p. 601-622. DOI 10.1002/wrna.1233.

WIGINGTON, Callie P., WILLIAMS, Kathryn R., MEERS, Michael P., BASSELL, Gary J. et CORBETT, Anita H., 2014b. Poly(A) RNA-binding proteins and polyadenosine RNA: new members and novel functions. In : *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*. octobre 2014. Vol. 5, n° 5, p. 601-622. DOI 10.1002/wrna.1233.

WILL, Cindy L. et LÜHRMANN, Reinhard, 2011. Spliceosome structure and function. In : *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. juillet 2011. Vol. 3, n° 7. DOI 10.1101/cshperspect.a003707.

WINTER, Reno, LIEBOLD, Jens et SCHWARZ, Elisabeth, 2013. The unresolved puzzle why alanine extensions cause disease. In : *Biological Chemistry*. août 2013. Vol. 394, n° 8, p. 951-963. DOI 10.1515/hsz-2013-0112. 23612654

ZHAO, Jing, HYMAN, Linda et MOORE, Claire, 1999a. Formation of mRNA 3' Ends in Eukaryotes: Mechanism, Regulation, and Interrelationships with Other Steps in mRNA Synthesis. In : *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1 juin 1999. Vol. 63, n° 2, p. 405-445.

ZHAO, Jing, HYMAN, Linda et MOORE, Claire, 1999b. Formation of mRNA 3' Ends in Eukaryotes: Mechanism, Regulation, and Interrelationships with Other Steps in mRNA Synthesis. In : *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1 juin 1999. Vol. 63, n° 2, p. 405-445.

ZHOU, Zhaolan, LICKLIDER, Lawrence J., GYGI, Steven P. et REED, Robin, 2002. Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. In : *Nature*. 12 septembre 2002. Vol. 419, n° 6903, p. 182-185. DOI 10.1038/nature01031.

Résumé :

PABPN1 est une protéine de liaison à l'ARN nucléaire et ubiquitaire impliquée dans de nombreux mécanismes de régulation post-transcriptionnelle des ARN. Une expansion anormale de triplets (GCN) dans l'exon 1 du gène *PABPN1* (1 à 8 triplets supplémentaires) conduit à une dystrophie musculaire appelée Dystrophie Musculaire OculoPharyngée (OPMD). Il s'agit d'une maladie autosomique dominante dont les premiers symptômes apparaissent vers 50-60 ans. L'atteinte est exclusivement musculaire et touche plus spécifiquement les muscles du pharynx et des paupières conduisant respectivement à une dysphagie et un ptosis. A l'heure actuelle les mécanismes moléculaires conduisant d'une expansion de quelques triplets dans le gène d'une protéine ubiquitaire vers une atteinte limitée de seulement certains muscles sont encore mal connus. Par ailleurs, la caractéristique phénotypique majeure de la maladie est la présence d'agrégats intranucléaires dans les noyaux des muscles atteints et non atteints. Ils contiennent des protéines agrégées dont PABPN1, mais aussi des ARN polyadénylés. Cependant le rôle exact de ces agrégats et leur implication dans la pathologie reste encore incertain. Il n'existe pas à l'heure actuelle de traitement curatif pour l'OPMD. Généralement les patients ont recours à des traitements chirurgicaux, telle qu'une myotomie cricopharyngienne pour la dysphagie. Des études expérimentales sont actuellement en cours et consistent en l'étude de molécules anti-agrégation ou anti-apoptotiques. Le laboratoire a initié un essai clinique de thérapie cellulaire autologue pour l'OPMD chez l'homme. Même si les premiers résultats sont positifs et encourageants les cellules injectées portent toujours la mutation génétique. Dans ce contexte, ce projet de thèse a porté sur 1) l'étude des mécanismes moléculaire dérégulés dans la pathologie, 2) l'étude de la contribution des agrégats nucléaires et 3) le développement d'une stratégie de thérapie génique. Au cours de ce travail il a été mis en évidence un défaut dans l'étape de clivage des ARNm, première étape de leur maturation en 3', ainsi qu'une grande sensibilité des ARN mitochondriaux due leur déadénylation active médiée par la protéine Smaug. Ces défauts conduisent à des altérations mitochondriales dans l'OPMD telle qu'une diminution de l'expression et de l'activité des protéines de la chaîne respiratoire et un stress oxydatif. L'étude de l'implication des agrégats dans la maladie a révélé la présence de défauts d'épissage et en particulier celui de l'ARN codant la protéine spécifique du muscle *TNNT3* au niveau de ses exons mutuellement exclusifs (16 et 17). Cette régulation est causée par la séquestration de son pré-ARN dans les agrégats de PABPN1 qui se trouvent délocalisés des speckles nucléaires, structure contenant le facteur épissage SC35 qui régule l'exon 16. Dans l'OPMD cette délocalisation spatiale entre le pré-ARN et son facteur épissage conduit à une diminution de l'isoforme contenant l'exon 16 de *TNNT3*. Ce défaut entraîne un dysfonctionnement de la contraction des fibres musculaires. Le projet de thérapie génique dit de remplacement consiste à éteindre PABPN1 (sauvage et muté) par RNAi et amener un ADNc (PABopt) qui code la forme saine et qui est non ciblée par les outils interférence grâce à la redondance du code génétique. Le projet développé *in vitro* sur des myoblaste avec des lentivirus et *in vivo* chez la souris avec des AAV a montré d'une part une létalité de l'extinction de PABPN1 en culture abrogée par l'ajout de la séquence PABopt, et d'autre part le sauvetage quasi total du phénotype pathologique de la souris OPMD lorsque l'extinction de PABPN1 et l'expression de PABopt ont lieu conjointement dans le muscle indiquant que la mutation de PABPN1 cause à la fois une perte de fonction et un gain de fonction toxique de la protéine.

[PABPN1 functions in Oculopharyngeal muscular dystrophy]

Abstract :

PABPN1 is an RNA binding protein involved in many post-transcriptional RNA regulation mechanisms. A pathological expansion of the (GCN) triplet in the first exon of the gene leads to a muscular dystrophy called OculoPharyngeal Muscular Dystrophy (OPMD). It is a late onset autosomal dominant inherited disorder. Symptoms first appear at around 50 years old and consist of an impairment of two small muscles in the first stages of the disease: the eyelid muscle and the pharyngeal muscle leading respectively to ptosis and dysphagia. The molecular mechanisms leading to a small expansion in an ubiquitous protein to an impairment of specific muscles are still not fully understood. The main pathological hallmark of the disease is the presence in the myonuclei of affected but also unaffected muscle of nuclear aggregates of the PABPN1 protein. They contain PABPN1 itself but also other proteins and polyadenylated RNA. The exact role and the contribution of these aggregates to the pathogenesis is still under debate as it has been shown they could both have a protective and/or a pathological role. Today there is no cure for OPMD patients. The main treatment is a corrective surgery in order to alleviate the ptosis and ameliorate the swallowing. Several experimental strategies are studied using anti-aggregate and anti-apoptotic drugs. The laboratory has been involved in an autologous cell therapy clinical trial, consisting of the graft of cells from unaffected muscle into the pharyngeal muscle of OPMD patients. Results are very promising but injected cells still carry the pathological mutation. In this context the projects developed during this thesis have been to 1) study the molecular mechanisms involved in OPMD, 2) study the contribution of the nuclear aggregates in the physiopathology of the disease and 3) develop a gene therapy strategy. We found that the cleavage step during the 3' end maturation of mRNA is impaired and leads to an active deadenylation of specific nuclear RNA encoding mitochondrial protein in OPMD. This leads to mitochondrial dysfunctions with a decrease in the level of proteins of the respiratory chain and also oxidative stress. Study of PABPN1 aggregates in OPMD has highlighted splicing deregulation events. Among them *TNNT3*, a RNA which encodes a muscle specific protein is deregulated. We have found that its pre-RNA is trapped in nuclear aggregates of PABPN1, outside nuclear speckles that contain the splicing factor SC35, leading to an imbalance of the ratio of two mutually exclusive exons on the transcript. This splicing deregulation leads to a defect in the contraction of fibres of OPMD muscles. The gene therapy strategy developed is a replacement strategy that consists of silencing PABPN1 using RNAi and also bringing a novel version of the protein using a cDNA, untargeted by RNAi thanks to the genetic code redundancy, which encodes a wild-type form of PABPN1 (PABopt). The project developed both *in vitro* in myoblasts with lentivirus tools and *in vivo* in muscles with AAV tools has shown 1) a cell lethality in OPMD cells when PABPN1 is silenced that can be rescued with PABopt expression, 2) an almost complete rescue of the pathological OPMD phenotype in mice when both shRNA and PABopt tools are used suggesting that OPMD involves both a loss of function and a gain of toxic function of the protein.

Keywords : [PABPN1, OPMD, nuclear aggregates, gene therapy, splicing defect, mitochondrial defects, deadenylation, SC35, Smaug, RNA, AAV, lentivirus]