



**HAL**  
open science

# Utilisation d'un modèle drosophile pour l'identification de marqueurs moléculaires responsables des symptômes musculaires et cardiaques de la maladie de Steinert

Émilie Plantié

## ► To cite this version:

Émilie Plantié. Utilisation d'un modèle drosophile pour l'identification de marqueurs moléculaires responsables des symptômes musculaires et cardiaques de la maladie de Steinert. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2016. Français. NNT : 2016CLF1MM19 . tel-01877244

**HAL Id: tel-01877244**

**<https://theses.hal.science/tel-01877244>**

Submitted on 19 Sep 2018

**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.

UNIVERSITE BLAISE PASCAL

UNIVERSITE D'AUVERGNE

Année 2016

N° d'ordre

*ÉCOLE DOCTORALE  
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ*

N° d'ordre

*Thèse*

Présentée à l'Université d'Auvergne  
Pour l'obtention du grade de DOCTEUR  
(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité Génétique et modèle de maladie humaine

Soutenue publiquement le Jeudi 22 Septembre 2016

**PLANTIÉ Emilie**

---

**Utilisation d'un modèle de drosophile de la  
Dystrophie Myotonique de Type 1  
pour l'identification de marqueurs moléculaires  
responsables des symptômes musculaires et cardiaques**

---

**Membres du JURY**

Président du jury	Dr COUDERC Jean-Louis
Directeur de thèse	Dr JAGLA Krzysztof
Rapportrice	Dr GOURDON Geneviève
Rapportrice	Dr MONNIER Véronique
Examineur	Pr BODMER Rolf

Laboratoire GReD (Génétique, Reproduction et Développement)  
CNRS (UMR6293) – INSERM (U1103)  
Université Clermont Auvergne



A mon papa parti trop tôt,  
A ma maman pour son soutien infallible,





## Remerciements

Mes tous premiers remerciements vont à Krzysztof JAGLA, mon directeur de thèse pour m'avoir permis d'intégrer son équipe pendant 4 ans et pour tout ce qu'il m'a appris et transmis. Merci pour ton calme, ton positivisme et tes encouragements. Même si parfois c'était difficile, merci mille fois de m'avoir laissé de l'autonomie et de m'avoir témoigné ta confiance qui m'ont permis de m'épanouir et de vouloir continuer dans ce domaine.

J'aimerais tout particulièrement remercier mes rapportrices Geneviève Gourdon et Véronique Monnier d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse et d'évaluer mon travail. Merci aussi à Jean-Louis Couderc d'être le président de ce jury, c'est un peu grâce à l'équipe Mirouse/Couderc que j'ai découvert la « droso » et que j'en suis là aujourd'hui. Merci à Caroline et Vincent au passage pour leur pédagogie et la transmission de leur passion.

Un immense merci à Rolf Bodmer d'avoir pris part à mes deux comités de thèse et d'en être l'examineur aujourd'hui. Merci pour vos conseils et critiques positives et surtout merci de croire en moi pour ce futur post-doctorat : il me tarde de venir à Berlin.

Je tiens à remercier chaleureusement les membres du GReD, tout le service commun et en particulier Fanfan et Nadège (Merci pour le milieu LYON pour mes analyses cardiaques !), Pierre Pouchin pour les moments partagés au microscope mais aussi les personnes côté CBRV pour leur gentillesse : Catherine, Stéphanie MM, Stéphanie Hermitte, Sabine, Marie-Elisa, Nicolas et Bertille pour les bons moments partagés et tous les autres.

Merci à tous les membres de l'équipe JAGLA, avec qui j'ai aimé travailler pendant ces 4 ans : Teresa, Ouarda, Monika (merci pour tes conseils), Jean-Philippe, Svetlana, Michaela (merci pour ta bonne humeur générale), Cédric et Thomas. Un Merci particulier à Lucie qui a amorcé l'ensemble des projets décrits dans cette thèse, pour tout ce que tu m'as transmis. Merci aussi à Guillaume Junion (Guillaume le grand) pour tes critiques constructives, tes conseils et tout simplement d'avoir été là dans les moments moins faciles de la thèse (tu n'as pas encore l'HDR mais tu l'a amplement mérité !). Yoan, notre bio-informaticien adoré, merci pour ton travail et aussi pour ta personnalité joviale.

J'aimerais aussi remercier les thésards de l'équipe pour leur bonne humeur et leurs qualités humaines incroyables : Lilia, ma voisine de bureau tu vas me manquer ; Quentinus ; Cristiana notre petite italienne adorée et Guillaume ou « Guigui » pour ton côté unique, merci à tous pour ces discussions scientifiques (et non scientifiques !) constructives et pour tout le reste. Merci aussi à mes copines de master II et de thèse, Lauriane et Charlotte (ma Chachaaa) pour les pauses café quand ça ne va pas (et quand ça va aussi !).

Un paragraphe à part pour une personne extraordinaire : Merci mille fois à toi « Benji Bt » ou « TIC », pour tout ce que tu as fait pour moi durant ces 4 ans, ta bienveillance, ton calme (j'en ai besoin !), ça va être dur à Berlin sans toi.

Enfin, je voudrais remercier ma mère d'avoir été toujours là pour moi et surtout dans les moments difficiles : sans toi, je ne serais pas en train de boucler ma thèse aujourd'hui. Papa, j'ai une très grosse pensée pour toi. Enfin, merci à Olivier, alias « Mon Amour » pour tes encouragements, ton aide et tout simplement merci de croire en moi.



J'ai effectué mes travaux de thèse à Clermont-Ferrand, au laboratoire GReD (Génétique, Reproduction et Développement), unité mixte de recherche (UMR6293, U1103) où j'ai intégré l'équipe « Mécanismes de la diversification des cellules musculaires et cardiaques au cours du développement normal et en conditions pathologiques », dirigée par le Dr Krzysztof JAGLA. Pour ce doctorat, j'ai bénéficié d'un financement ministériel (Bourse MENRT) pendant trois ans et j'ai obtenu un financement de 4<sup>ème</sup> année par l'AFM (Association Française contre les myopathies).

### Articles publiés ou en cours de soumission dans des revues scientifiques à comité de lecture internationale

#### Article de recherche

Picchio, L.; **Plantié, E.**; Renaud, Y.; Poovthumkadavil, P.; Jagla, K. *Novel Drosophila model of myotonic dystrophy type 1: phenotypic characterization and genome-wide view of altered gene expression*. Hum. Mol. Genet. **2013**, 22 (14), 2795–2810

**Plantié, E.**; Picchio, L.; Renaud, Y.; Jagla, K. *Drosophila models recapitulate myotonic dystrophy type 1 heart dysfunction and reveal gene deregulations underlying DMI-associated arrhythmia and conduction defects*. A soumettre

#### Articles de revue

**Plantié, E.**<sup>†</sup>; Migocka-Patrzałek, M.<sup>†</sup>; Daczewska, M.; Jagla, K. *Model Organisms in the Fight against Muscular Dystrophy: Lessons from Drosophila and Zebrafish*. Mol. Basel Switz. **2015**, 20 (4), 6237–6253

Taghli-Lamalle, O.<sup>†</sup>; **Plantié, E.**<sup>†</sup>; Jagla, K. *Drosophila in the Heart of Understanding Cardiac Diseases: Modeling Channelopathies and Cardiomyopathies in the Fruitfly*. J. Cardiovasc. Dev. Dis. **2016**, 3 (1), 7

### Communications orales et affichées en congrès réalisées au cours de la thèse

- 2012** 26th French Drosophila Conference, September 10-13, Clermont-Ferrand, France  
SFBD and SFBC joint meeting, October 16-19, Montpellier, France  
Xèmes journées annuelles de la Société française de Myologie, November 14-16, Grenoble, France
- 2013** International Myotonic Dystrophy Consortium meeting (IDMC9), October 15-20, San Sebastian, Spain (Oral)  
SFBD and SFG joint meeting, November 12-15, Avignon, France
- 2014** DM1 AFM Task Force meeting, October 3, Paris, France (Oral)
- 2015** International Myotonic Dystrophy Consortium meeting (IDMC10), June 8-12, Paris, France  
Journées de l'Ecole Doctorale SVSAE, May 21-22, Clermont-Ferrand, France (Oral)
- 2016** Myology 2016 (5<sup>th</sup> International congress of Myology), Mars 14-18, Lyon, France



## **Modules de formation suivis dans le cadre de la formation continue assurée par le collège des écoles doctorales et l'école doctorale SVSAE**

### *Modules socio-professionnels (OSP)*

- Enseignement (OSP 9.1)
- Expression corporelle et prise de parole en public (OSP 11)
- Le défi de l'évaluation de l'étudiant (OSP 12)

### *Modules « biologie »*

- Vulgarisation scientifique :
  - Participation à l'opération « 1000 chercheurs dans les écoles » organisée par l'Association Française contre les Myopathies (AFM) en 2013 (Collège Blaise Pascal et Lycée Ambroise Brugière de Clermont-Ferrand) et en 2015 (Lycée Virlogeux de Riom)
  - Rencontres lycéens-doctorants organisées par le Rectorat de Clermont-Ferrand au lycée La Fayette de Brioude (Février 2014)
- Préparation du diplôme universitaire (DU) « Enseigner à l'Université » dispensé par l'ESPE de Chamalières et obtenu en 2014 : Formation de 120 heures suivie en deux ans (2012-2013 et 2013-2014) permettant la validation de deux modules biologie et deux modules OSP

## **Enseignements dispensés dans le cadre du contrat doctoral (64h/an ETD)**

- 2012-2014 Service d'enseignement couplé à un contrat doctoral (64h ETD) : Travaux pratiques de Méthodologie moléculaire (Licence 3<sup>ème</sup> année) et d'Immunologie (Licence 2<sup>ème</sup> année)
- 2014-2015 Service d'enseignement couplé à un contrat doctoral (64h ETD) : TD Biologie moléculaire « Lésions et Réparations de l'ADN » en PACES (Première Année Commune aux Etudes de Santé) et Travaux pratiques d'Immunologie (Licence 2ème année)



La maladie de Steinert ou dystrophie myotonique de type 1 (DM1), dystrophie musculaire la plus commune chez l'adulte, est causée par l'expansion instable de triplets CTG dans la région 3' non traduite du gène *DMPK* (*Dystrophia Myotonica Protein Kinase*). Cette maladie multisystémique, affectant principalement les muscles squelettiques et le cœur, est liée à l'épissage. En effet, les CUG<sub>exp</sub> forment des structures secondaires dans le noyau capables de séquestrer la protéine MBNL1, facteur d'épissage alternatif. En parallèle, un autre facteur d'épissage alternatif, CELF1 est stabilisé. La dérégulation de la balance entre ces deux protéines cause des défauts d'épissage, responsables de certains symptômes de la maladie, comme la myotonie, des défauts de conduction cardiaque et une résistance à l'insuline, causés respectivement par l'épissage aberrant du canal chlorure *Clcn1*, du canal sodique *SCN5A* et du récepteur à l'insuline *IR*. De plus, des dérégulations indépendantes de l'épissage sont aussi mises en jeu dans la DM1 mais leur responsabilité dans l'apparition des symptômes de la maladie reste à identifier.

Pour identifier des dérégulations transcriptionnelles indépendantes de l'épissage mais liées à la progression et à la sévérité des symptômes, nous avons généré de nouveaux modèles drosophile de la DM1 avec un nombre croissant de répétitions CTG. Ces modèles étudiées au stade larvaire récapitulent les caractéristiques majeures de la DM1 : la formation de foci et une hypercontractilité musculaire. De plus, nous avons identifié dans ce modèle des dérégulations géniques indépendantes de l'épissage mais dépendantes du nombre de répétitions CTG. Notamment, une atténuation de *Gbe1*, codant pour une enzyme de branchement du glycogène pourrait participer aux phénotypes musculaires.

Afin d'étudier les symptômes cardiaques de la maladie qui touchent 80% des patients et représentent la deuxième cause de mortalité, nous avons utilisé le modèle DM1 de drosophile développé dans notre équipe, et réalisé des analyses physiologiques cardiaques sur des mouches adultes qui expriment 960 CTG dans le cœur (*Hand>DM1<sub>960</sub>*), un ARNi pour *Mbl*, l'orthologue de *MBNL1*, ou qui surexpriment l'orthologue de *CELF1*, *Bru-3*. Ces trois modèles DM1 reproduisent les symptômes cardiaques majeurs observés chez les patients comme des défauts de conduction, de l'arythmie (fibrillation) ou encore une cardiomyopathie dilatée. Afin d'identifier des dérégulations géniques susceptibles d'être responsables de ces défauts, nous avons réalisé une analyse transcriptomique par séquençage ARN après collection de l'ARN spécifique du cœur par la technique du TU-tagging. Les gènes dérégulés identifiés dans ces contextes ont été classés en fonction de leur conservation et du niveau de dérégulation. Parmi eux, la surexpression dans le cœur adulte de *Straightjacket* (*Stj*), l'orthologue de *CACNA2D4* qui code pour une sous-unité d'un canal calcique voltage-dépendant, cause des défauts de conduction et de la fibrillation, mimant ce qui a été observé en contexte DM1<sub>960</sub> et gain de fonction pour *Bru-3*. Dans l'avenir, nous aimerions confirmer son implication dans la physiologie cardiaque et en particulier dans la DM1 en analysant son expression chez les patients présentant des défauts cardiaques similaires.





The most common muscular dystrophy found in adults, Steinert disease or Myotonic Dystrophy Type 1 (DM1) is caused by an unstable CTG repeat expansion in the 3' untranslated region of the *Dystrophia Myotonica Protein Kinase (DMPK)* gene. This multisystemic disease, affecting particularly skeletal muscles and the heart, is called a spliceopathy because it involves the sequestration of the MBNL1 splicing factor by the expanded CUG-carrying transcripts and the stabilization of the CELF1 splicing factor. The misbalance of these two factors is responsible for splicing defects that cause most of the disease symptoms, like myotonia, conduction defects and arrhythmia but also insulin resistance, respectively associated to missplicing of *Cln1*, *SCN5A* and *IR*. Moreover, DM1 toxicity is also associated to splice-independent deregulations but their link to disease symptoms remain poorly understood.

To identify transcriptional deregulations independent of splicing and associated to disease progression and severity, we generated new DM1 *Drosophila* models with increasing number of CTG repeats. These larval models recapitulated the main DM1 muscular symptoms such as hypercontractility and foci formation and allowed us identifying gene deregulations independent of splicing. Among them, *Gbe1* coding for a glycan branching enzyme is attenuated in the DM1 context in a CTG-repeat dependant manner and could participate in the severity of muscle phenotypes.

To better understand the causes of cardiac symptoms that represent the second cause of death and affecting 80% of DM1 patients, we took advantage of our DM1 inducible *Drosophila* model and performed phenotypic analyses on the heart of adult flies expressing: 960 CTG specifically in the heart (*Hand>DMI<sub>960</sub>*), a RNAi for the *Drosophila* MBNL1 orthologue (*Muscleblind*, *Mbl*) or overexpressing the *CELF1* orthologue (*Bruno-3*, *Bru3*). These DM1 adult models display conduction abnormalities, arrhythmicity (fibrillation) and dilated cardiomyopathy (DCM). Thus, these three pathogenic contexts recapitulated collectively the main DM1 cardiac symptoms and prompted us to perform transcriptional profiling to identify symptom's-associated gene deregulations. To identify new molecular actors responsible for the DM1 associated heart defects, we performed cardiac cell-specific transcriptional analyses by RNA-sequencing, using TU-tagging technique. Then, we selected deregulated candidate genes that could be linked to the particular observed phenotypes and ranked depending on their conservation and deregulation level. Among them, increased expression of *Straightjacket (Stj)*, the *CACNA2D4* orthologue, encoding a subunit of voltage-dependent calcium channel results in fibrillation and conduction defects, thus mimicking cardiac symptoms found in DM1<sub>960</sub> and *Bru-3* gain of function contexts in which it was up-regulated. Whether identified candidates are deregulated in DM1 patients displaying cardiac abnormalities remains to be tested.



**SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE** **1**

---

<b>I. La drosophile comme modèle d'étude du développement musculaire et cardiaque et de pathologies associées à ces systèmes.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Présentation du modèle drosophile.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Conservation du développement musculaire avec les vertébrés et des voies de régulation impliquées .....</b>	<b>4</b>
a. Le muscle squelettique : généralités.....	4
· Composition des sarcomères.....	4
· Types de fibres musculaires .....	5
· La contraction musculaire via les sarcomères.....	5
b. La formation du muscle chez la drosophile et similarités avec les vertébrés.....	6
· Myogenèse embryonnaire .....	7
· Myogenèse adulte.....	9
<b>3. Conservation du développement cardiaque entre la drosophile et les vertébrés et des voies de signalisation impliquées .....</b>	<b>10</b>
a. Conservation des réseaux de gènes et voies de régulation .....	10
b. Conservation du développement cardiaque.....	11
· Formation du cœur embryonnaire.....	11
· Formation du cœur adulte .....	13
c. Conservation de la fonction cardiaque.....	14
<b>II. La dystrophie myotonique (DM).....</b>	<b>17</b>
<b>1. Généralités sur la DM : DM1 et DM2 .....</b>	<b>17</b>
<b>2. Autres maladies à répétitions .....</b>	<b>18</b>
<b>3. Prévalence de la DM.....</b>	<b>18</b>
<b>4. Formes cliniques de la DM1 et symptômes associés.....</b>	<b>19</b>
<b>4. Les symptômes musculaires des patients DM1.....</b>	<b>21</b>
<b>5. Les symptômes cardiaques des patients DM1 .....</b>	<b>22</b>
a. Les défauts de conduction .....	23
· L'activité électrique du cœur et son enregistrement (ECG).....	23
· Le système de conduction et ses anomalies .....	23
· Défauts de conduction des patients DM1.....	24
b. Troubles du rythme cardiaque.....	24
c. Défauts de structure .....	25
<b>6. Mécanismes d'instabilité des répétitions .....</b>	<b>25</b>
a. Instabilité des répétitions tri-nucléotidiques.....	25
b. Mosaïcisme germinale .....	26

· Anticipation.....	26
· Contraction des répétitions.....	27
· Mécanisme du mosaïcisme germlinal .....	27
c. Mosaïcisme somatique.....	27
d. Mécanismes mis en jeu dans l’expansion.....	28
· La réplication .....	28
· La recombinaison .....	29
· La réparation .....	29
· La transcription .....	30
<b>7. Mécanisme de gain de fonction de l’ARN toxique <i>dmpk</i>.....</b>	<b>30</b>
a. Effets en <i>cis</i> de la mutation.....	31
· Haplo-insuffisance de la protéine DMPK .....	31
· Désorganisation de la chromatine sur le locus <i>DMPK</i> et influence sur les gènes <i>DMWD</i> et <i>Six5</i> ...	33
· Toxicité de la traduction ATG-indépendante associée aux répétitions.....	34
b. Effets en <i>trans</i> de la mutation.....	35
· Mécanisme « gain de fonction » toxique de l’ARN muté.....	35
· Séquestration de MBNL1, protéine de liaison aux CUG <sub>exp</sub> .....	36
· Séquestration d’autres protéines de liaison aux CUG <sub>exp</sub> .....	38
· Stabilisation du facteur d’épissage alternatif CELF1.....	39
· Conséquences sur l’épissage de la dérégulation de la balance MBNL1/CELF1 .....	41
· Attraction ou « leaching » et dérégulation de facteurs de transcription causés par les CUG <sub>EXP</sub> .....	44
· Effets post-transcriptionnels de la dérégulation de MBNL1 et CELF1 (hormis épissage alternatif).....	45
· Effet sur les ARNs non codants .....	46
<b>8. L’apport des modèles animaux dans la DM1 .....</b>	<b>48</b>
· Les modèles DM1 murins .....	49
· Les modèles DM1 chez le poisson zèbre .....	51
· Les modèles DM1 chez le nématode .....	51
· Les modèles DM1 de drosophile.....	52
<b><u>OBJECTIFS DE TRAVAIL</u> .....</b>	<b>57</b>
<b><u>RESULTATS ET DISCUSSION</u> .....</b>	<b>60</b>
<b>I. Identification de nouveaux gènes impliqués dans la sévérité des phénotypes musculaires de la DM1 : utilisation du modèle drosophile au stade larvaire et étude translationnelle en cellules de patients et dans les muscles murins DMSXL.....</b>	<b>60</b>
<b>1. Résultats publiés dans HMG « Novel <i>Drosophila</i> model of myotonic dystrophy type 1: phenotypic characterization and genome-wide view of altered gene expression » .....</b>	<b>60</b>
<b>2. Résultats non publiés.....</b>	<b>62</b>
a. Nouvelle sélection de gènes candidats et validation chez la drosophile .....	62

b.	Etude translationnelle chez la souris DMSXL et en cellules de patients DM1 .....	63
·	Recherche des orthologues humains et murins .....	63
·	Validation RT-qPCR.....	64
<b>3.</b>	<b>Matériel et méthodes .....</b>	<b>64</b>
a.	Extraction ARN sur les larves L3 de drosophile .....	64
b.	Recherche des orthologues .....	64
c.	Culture cellulaire et extraction ARN .....	65
d.	Extraction des ARNs murins.....	66
e.	Rétro-transcription et RT-qPCR.....	66
<b>4.</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>66</b>
<b>II. Analyse des phénotypes cardiaques dans le modèle drosophile DM1 et identification des gènes impliqués par la méthode du TU-tagging..... 69</b>		
<b>1. Publication « <i>Drosophila</i> models recapitulate myotonic dystrophy type 1 heart dysfunction and reveal gene deregulations underlying DM1-associated arrhythmia and conduction defects » .....</b>		
		<b>69</b>
<b>2. Résultats complémentaires non publiés .....</b>		
		<b>73</b>
a.	Analyse physiologique cardiaque des modèles DM1 avec la lignée pilote <i>TinCd4-Gal4</i> .....	73
b.	Résultats complémentaires sur l’observation des foci dans le cœur du modèle DM1 .....	73
c.	Adaptation de la technique de TU-tagging pour l’isolation des ARNs du cœur adulte de drosophile .....	74
·	Construction et validation des lignées « doubles » .....	74
·	Analyses physiologiques cardiaques des lignées « doubles ».....	74
·	Adaptation du protocole pour l’isolation des ARNs cardiaques.....	75
·	Préparation des bibliothèques pour le séquençage ARN.....	76
d.	Analyses complémentaires de gènes candidats sélectionnés pour expliquer les symptômes cardiaques .....	76
e.	Analyse des conséquences d’une surexpression de la protéine CELF1 humaine sur la physiologie cardiaque chez la drosophile .....	77
<b>3.</b>	<b>Matériel et méthodes .....</b>	<b>79</b>
a.	Lignées de drosophile.....	79
b.	Analyses physiologiques et de survie.....	79
<b>4.</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>79</b>
<b>CONCLUSION</b> .....		<b>86</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....		<b>87</b>

## **FIGURES**

### **- SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE -**

- Figure 1.** Cycle de développement de la drosophile
- Figure 2.** Système UAS-Gal4
- Figure 3.** Exemple de la DM1 comme modèle de pathologie humaine chez la drosophile représenté sur le portail Flybase
- Figure 4.** Schéma d'une fibre musculaire
- Figure 5.** Composition d'un sarcomère
- Figure 6.** Processus de contraction musculaire
- Figure 7.** Vagues de myogénèse chez la drosophile
- Figure 8.** Vagues de myogénèse chez les vertébrés
- Figure 9.** Détermination du mésoderme chez les vertébrés
- Figure 10.** Myogénèse embryonnaire détaillée de la drosophile
- Figure 11.** Schéma représentant le patron des muscles embryonnaires de la drosophile combiné à l'expression des facteurs d'identité dans les différents muscles
- Figure 12.** Myogénèse adulte chez la drosophile
- Figure 13.** Le cœur embryonnaire de la drosophile
- Figure 14.** Formation du cœur embryonnaire chez la drosophile
- Figure 15.** Les différentes populations de cardiomyocytes et de cellules péricardiaques chez l'embryon de drosophile
- Figure 16.** Morphologie du cœur de drosophile aux différents stades de développement
- Figure 17.** Cellules pacemaker dans le cœur de la drosophile et contractions
- Figure 18.** Mutation en cause dans la Dystrophie Myotonique de Type 1 (DM1)
- Figure 19.** Mutation en cause dans la Dystrophie Myotonique de Type 2 (DM2)
- Figure 20.** Maladies à triplets
- Figure 21.** Test du « handgrip » (poignée de main) pour évaluer la myotonie
- Figure 22.** Activité électrique normale du cœur humain et électrocardiogramme
- Figure 23.** Les nœuds de conduction cardiaque chez l'Homme : cellules pacemaker
- Figure 24.** Mécanismes responsables de l'instabilité et de l'expansion des CTG
- Figure 25.** La réplication responsable de l'expansion
- Figure 26.** La réparation responsable de l'expansion
- Figure 27.** Mécanismes pathogéniques potentiels impliqués dans la DM1

- Figure 28.** Mécanisme de gain de fonction de l'ARN toxique *dmpk*
- Figure 29.** Désorganisation de la chromatine sur le locus DMPK
- Figure 30.** Traduction ATG-indépendante associée aux répétitions CTG
- Figure 31.** Formation de foci nucléaires
- Figure 32.** Séquestration de la protéine MBNL1 par les répétitions CUG<sub>exp</sub>
- Figure 33.** Structure de la protéine MBNL1 appartenant à la famille MBNL
- Figure 34.** Autres protéines séquestrées par les répétitions CUG ou le complexe MBNL1/CUG<sub>exp</sub>
- Figure 35.** Structure de la protéine CELF1 appartenant à la famille CELF
- Figure 36.** Stabilisation de la protéine CELF1 par phosphorylation par la PKC
- Figure 37.** Perturbation de la balance entre MBNL1 et CELF1 au cours du développement et dans la DM1
- Figure 38.** Exemples de défauts d'épissage retrouvés chez les patients DM1 : *cTNT*, *Clc-1* et *IR*
- Figure 39.** Implication de *miR-1* dans les symptômes cardiaques de la DM1
- Figure 40.** Conservation des protéines CELF chez la drosophile

- RESULTATS ET DISCUSSION -

- Figure 41.** Nouvelle sélection de candidats impliqués dans la sévérité de la DM1 chez la drosophile
- Figure 42.** Validation des gènes candidats en cellules de patients et dans un modèle murin DM1
- Figure 43.** Analyse physiologique cardiaque des modèles DM1 avec la lignée pilote *TinCd4-Gal4*
- Figure 44.** Observation des foci dans le modèle cardiaque adulte DM1<sub>960</sub>
- Figure 45.** Vérification des lignées doubles DM1/UPRT par immunomarquage
- Figure 46.** Analyses physiologiques cardiaques des lignées « doubles » générées pour le TU-tagging
- Figure 47.** Validation de la technique du TU-tagging
- Figure 48.** Analyses physiologiques des candidats potentiellement impliqués dans la cardiomyopathie dilatée (*bib* et *iav*) et dans les défauts de conduction (*Syn1*)
- Figure 49.** Caractérisation phénotypique de la lignée cardiaque Hand>hCELF1
- Figure 50.** Le modèle cardiaque Hand>hCELF1 développe une cardiomyopathie dilatée



## **TABLEAUX**

### **- SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE -**

- Tableau 1.** Types de fibres musculaires
- Tableau 2.** Conservation des acteurs moléculaires impliqués dans la myogénèse
- Tableau 3.** Conservation des acteurs moléculaires impliqués dans le développement du cœur
- Tableau 4.** Prévalence de la DM1 et de la DM2
- Tableau 5.** Formes cliniques de la DM1 et symptômes majeurs associés
- Tableau 6.** Symptômes de la DM1 classés en fonction des systèmes affectés
- Tableau 7.** Score MIRS (Muscle Impairment Rating Scale) pour évaluer la faiblesse musculaire
- Tableau 8.** Principales manifestations cardiaques retrouvées chez les patients DM1
- Tableau 9.** Classification des défauts de conduction observés chez l'Homme
- Tableau 10.** Exemple de mosaïcisme somatique retrouvé chez un patient DM1
- Tableau 11.** Récapitulatif des transcrits épissés de manière aberrante dans la DM1
- Tableau 12.** Modèles murins de la DM1
- Tableau 13.** Modèles drosophile de la DM1

### **- RESULTATS ET DISCUSSION -**

- Tableau 14.** Recherche d'orthologie avec l'outil DIOPT chez l'Homme et la souris
- 

## **ANNEXES**

- Annexe 1.** Résultats de l'analyse d'orthologie entre la drosophile et l'Homme pour les candidats CTG-dépendants
- Annexe 2.** Résultats de l'analyse d'orthologie entre la drosophile et la souris pour les candidats CTG-dépendants
- Annexe 3.** Liste des amorces utilisées pour les RT-qPCR chez la drosophile, la souris et l'Homme
- Annexe 4.** La méthode SOHA pour l'analyse des paramètres cardiaques
- Annexe 5.** Articles de revue rédigés durant ma thèse

## Liste des abréviations

AFP : Après la formation de la puppe

AMP : Adult Muscle Precursors

ARNi : ARN interférent

ATP : Adénosine triphosphate

AV : atrio-ventriculaire

BAV : Bloc atrio-ventriculaire

BB : Bloc de branche

BBD/ BBG : BB droit ou gauche

bHLH : domaine basic Helix-loop-Helix

BMP : Bone Morphogenic Protein

Bru-3 : Bruno-3

BSA : Bloc sino-atrial

CLCN1 : Canal ionique Chlore 1

cTNT : Troponine cardiaque T

CELF1: CUGBP, Elav-Like Family Member 1

CM : Cardiomyocyte

CP : Cellule péricardique

CTG : Cytosine, Thymine, Guanine

CUGexp : CUG avec une expansion

DD : Diamètre diastolique

Dpp : Decapentaplegic

DIC : Défibrillateur intra-cardiaque

DIOPT : DRSC Integrative Ortholog Prediction Tool

DRSC : Drosophila RNAi Research Center

DS : Diamètre systolique

DM1 : Dystrophie myotonique de type 1

DM1c : DM1 congénitale

DM2 : Dystrophie myotonique de type 2

DMPK : *Dystrophia Myotonica Protein Kinase*

ECG : Electrocardiogramme

FCs : Cellules fondatrices (Founder Cells)

FCMs : Myoblastes compétents à la fusion (Fusion Competent Myoblasts)

FI : Facteur d'identité

FR : Fraction de raccourcissement

FT : Facteur de transcription

Hh : Hedhehog

ID : Intervalle diastolique

IS : Intervalle systolique

InR : Récepteur à l'Insuline

Mbl : Muscleblind

MBNL-1 : Muscleblind-Like 1

MEF2 : Myocyte Enhancer Factor 2

MHC : Myosin Heavy Chain

MIRS : Muscle Impairment Rating Scale

Mp20 : Muscle Protein 20

MRF ou FRM : Facteur de régulation myogénique

NT : non traduit

OD/OG : Oreillettes droite/gauche

PA : Potentiel d'action

PAA : Polyadénylation alternative

PKC : Protéine Kinase C

RAN : Repeat Associated Non-ATG (traduction ATG indépendante)

RRM : RNA Recognition domain

RS : Réticulum sarcoplasmique

SCA : Ataxie spino-cérébelleuse

SERCA: Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase

SHH : Sonic Hedgehog

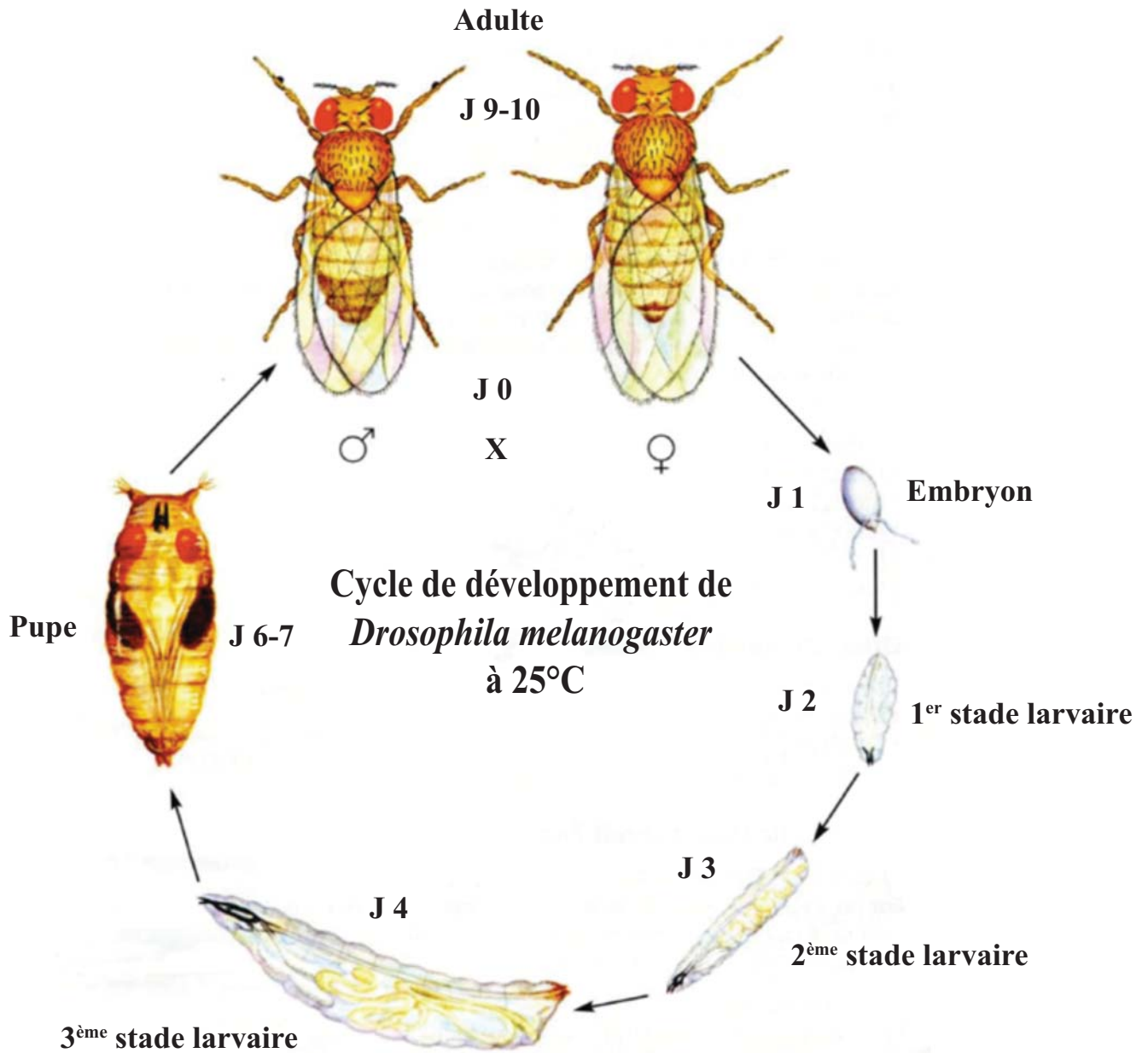
SOHA : Semi-intact Optical Heartbeat Analysis

UAS : Upstream Activated Sequence

VD/VG : Ventricules droit/gauche



# **Synthèse bibliographique**



**Figure 1. Le cycle de développement de la drosophile à 25°C.**

Le cycle de développement de la drosophile dure environ 10 jours à 25°C. Il est constitué de différents stades : le stade embryonnaire pendant lequel se déroule la myogenèse qui va permettre la formation des muscles embryonnaires persistant pendant la vie larvaire. Puis ont lieu les stades larvaires successifs (L1, L2 et L3) et ensuite le stade pupal pendant lequel se développe la mouche adulte. *Adapté d'après Carolina Drosophila Manual, 2005.*

Ce manuscrit de thèse présente les analyses moléculaires et fonctionnelles réalisées sur un modèle de drosophile de la dystrophie myotonique de type 1 (DM1), utilisé pour étudier les symptômes musculaires et cardiaques de la maladie et identifier des acteurs moléculaires associés à ces symptômes.

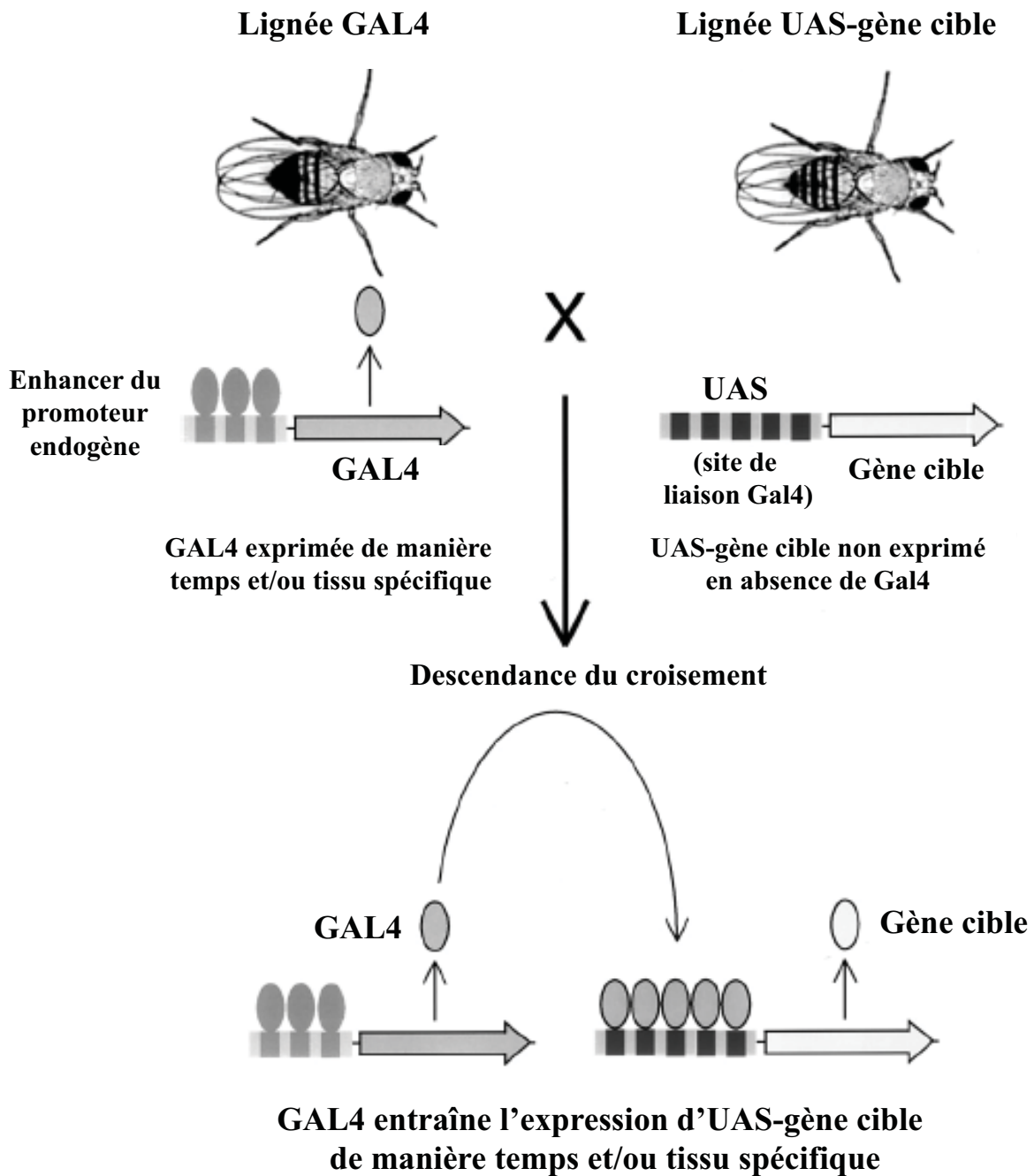
Dans cette synthèse bibliographique, j'ai cherché à mettre en évidence pourquoi la drosophile est un bon modèle de pathologies humaines, et en particulier de la DM1. Pour cela, je décrirai brièvement le modèle de drosophile puis je détaillerai la conservation du muscle squelettique et du cœur entre la drosophile et l'Homme (ou les vertébrés en général), les deux tissus qui sont le plus affectés dans la DM1. Dans une seconde partie, j'expliquerai la pathogenèse puis je détaillerai les symptômes musculaires et cardiaques associés. Enfin, j'aborderai l'apport des modèles animaux pour l'étude des mécanismes impliqués dans la maladie.

## **I. La drosophile comme modèle d'étude du développement musculaire et cardiaque et de pathologies associées à ces systèmes**

### **1. Présentation du modèle drosophile**

*Drosophila melanogaster*, communément appelée mouche du vinaigre est un organisme invertébré, holométabole (passant par un stade de puppe) dont le cycle de développement est très rapide puisqu'il faut 10 jours à 25°C pour obtenir la descendance issue d'un croisement entre un mâle et une femelle (**Figure 1**). De plus, ses capacités reproductives sont très importantes puisqu'une femelle peut pondre plus de 2000 œufs durant sa vie (Shapiro, 1932; Reeve et Black, 2001). Son développement est composé de différents stades, embryonnaire, larvaire, pupal (étape de métamorphose) puis adulte, tous utilisés comme modèle en laboratoire pour l'étude de divers processus biologiques (Jennings, 2011; Pandey et Nichols, 2011).

Notamment, les cribles de mutagenèse chez la drosophile ont permis d'identifier des mutations létales dès le stade embryonnaire, et ainsi de mettre en évidence des gènes et voies de régulation majeures du développement (Nüsslein-Volhard et Wieschaus, 1980). En particulier, les gènes responsables de la diversification musculaire comme *ladybird* (orthologue de *Lbx1*) ou de la mise en place du cœur comme *tinman* (orthologue de *Nkx2.5*) ont été découverts chez la drosophile avant de confirmer leur conservation avec les vertébrés (ROLF Bodmer *et al.*, 1990; Azpiazu et Frasch, 1993; Lints *et al.*, 1993; K. Jagla *et al.*,



**Figure 2. Le système Gal4/UAS.**

Le système Gal4/UAS, issu de la levure, permet l'expression d'un gène cible de manière temps et/ou tissu spécifique. La production de la protéine Gal4 est sous le contrôle des séquences régulatrices d'un gène dont l'expression est connue (Mef2 par exemple dans les muscles somatiques et cardiaques aux stades embryonnaires, larvaires et adulte). La liaison de Gal4 au niveau de sa séquence cible UAS (Upstream Activating Sequence) va conduire l'expression d'un gène d'intérêt localisé en aval. *Adapté d'après Phelps et Brand, 2002.*

1995). Les stades larvaires ont permis d'étudier les mécanismes responsables de la croissance et de mettre en évidence les acteurs moléculaires impliqués (Grewal, 2009; Bellosta et Gallant, 2010; Grewal, 2012) mais le développement larvaire permet aussi de modéliser des maladies humaines, de même que le stade adulte (Pandey, 2011).

Ce modèle présente de nombreux avantages comme la facilité et le coût réduit des conditions d'élevage par rapport à d'autres modèles et une conservation importante des gènes responsables de maladies humaines (Reiter *et al.*, 2001; Lloyd et Taylor, 2010), mise en évidence grâce au séquençage de son génome réalisé dans les années 2000 (Adams *et al.*, 2000). Concernant l'homologie entre la drosophile et l'Homme, environ 75% des gènes impliqués dans des maladies présentent un orthologue chez la drosophile. De plus, les quatre chromosomes (X, II, III et IV) composant son génome possèdent moins de 14 000 gènes codant pour des protéines (Pandey, 2011), ce qui représente 5000 gènes de moins que chez l'Homme, reflet d'une absence de redondance génique chez la drosophile, avantageuse pour étudier la fonction d'un gène (Pickett et Meeks-Wagner, 1995; Ezkurdia *et al.*, 2014). En effet, la présence de familles de gènes homologues chez l'Homme, et les vertébrés de façon générale (modèles souris par exemple) peut compliquer l'analyse de la fonction d'un gène particulier de part le phénomène de compensation qui peut se mettre en place. Le modèle drosophile, ayant subi moins de duplications de gènes, permet de s'affranchir de cette complexité puisque pour plusieurs gènes chez l'Homme, un seul orthologue est généralement présent chez la drosophile (Friedman et Hughes, 2001).

La drosophile est utilisée en biologie depuis les années 1900 et a permis la mise en évidence de l'hérédité à travers les chromosomes qui a valu le prix Nobel de médecine à Thomas Hunt Morgan en 1933 (Morgan, 1915; Rubin et Lewis, 2000). Le développement de nombreux outils génétiques a permis d'accroître l'utilisation de cet organisme et notamment l'utilisation du système Gal4-UAS, issu de la levure et qui permet l'expression d'un gène cible de manière tissu et/ou temps spécifique (Brand et Perrimon, 1993; Phelps et Brand, 1998; Duffy, 2002). Ce système repose sur l'utilisation de deux lignées transgéniques de drosophile, l'une permettant l'expression inductible d'un transgène d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur UAS (Upstream Activator Sequence) et l'autre permettant l'expression de la protéine Gal4 contrôlée par les séquences régulatrices (ou promoteur) d'un gène dont l'expression spatio-temporelle est très bien caractérisée. La fixation de la protéine Gal4 sur ses sites de liaison UAS permet alors l'activation du transgène d'intérêt (**Figure 2**).



General Information			
Name	myotonic dystrophy 1	FlyBase ID	FBhh0000258
Disease Ontology ID	DOID:11722	Parent Disease	myotonic dystrophy
OMIM	MYOTONIC DYSTROPHY 1; DM1	Parent Disease DOID	
Overview			
<p>This report describes myotonic dystrophy 1, which is a subtype of myotonic dystrophy. The human gene implicated in this disease is DMPK, which encodes dystrophia myotonica protein kinase. Expanded (CTG)n repeats in the 5' UTR of DMPK are associated with DM1. There is one moderately scoring fly ortholog, <i>gek</i>, for which RNAi targeting constructs, alleles caused by insertional mutagenesis, and classical alleles have been generated.</p> <p>Multiple UAS constructs of the CTG trinucleotide repeat have been introduced into flies, including wild-type low copy number repeats, disease-associated expanded repeats, and interrupted CTG repeats. The human gene DMPK has not yet been introduced into flies.</p> <p>The pathogenicity of the expanded RNA repeats in both DM1 and DM2 appear to involve dysregulation of the RNA-binding muscleblind proteins MBNL1, MBNL2, and MBNL3.</p> <p>[updated April 2016 by FlyBase; FBrf0222196]</p>			
Disease Summary Information			
Parent Disease Summary: myotonic dystrophy			
Symptoms and phenotype	<p>Myotonic dystrophy is an autosomal dominant disorder characterized mainly by myotonia, muscular dystrophy, cataracts, hypogonadism, frontal balding, and ECG changes. [From OMIM:608233, 2016.04.15]</p> <p>(OMIM, 2013-)</p>		
Specific Disease Summary: myotonic dystrophy 1			
OMIM report	MYOTONIC DYSTROPHY 1; DM1		
Human gene(s) implicated	DYSTROPHIA MYOTONICA PROTEIN KINASE; DMPK		
Symptoms and	<p>Myotonic dystrophy is an autosomal dominant disorder characterized mainly by myotonia, muscular</p> <p>(OMIM, 2013-)</p>		

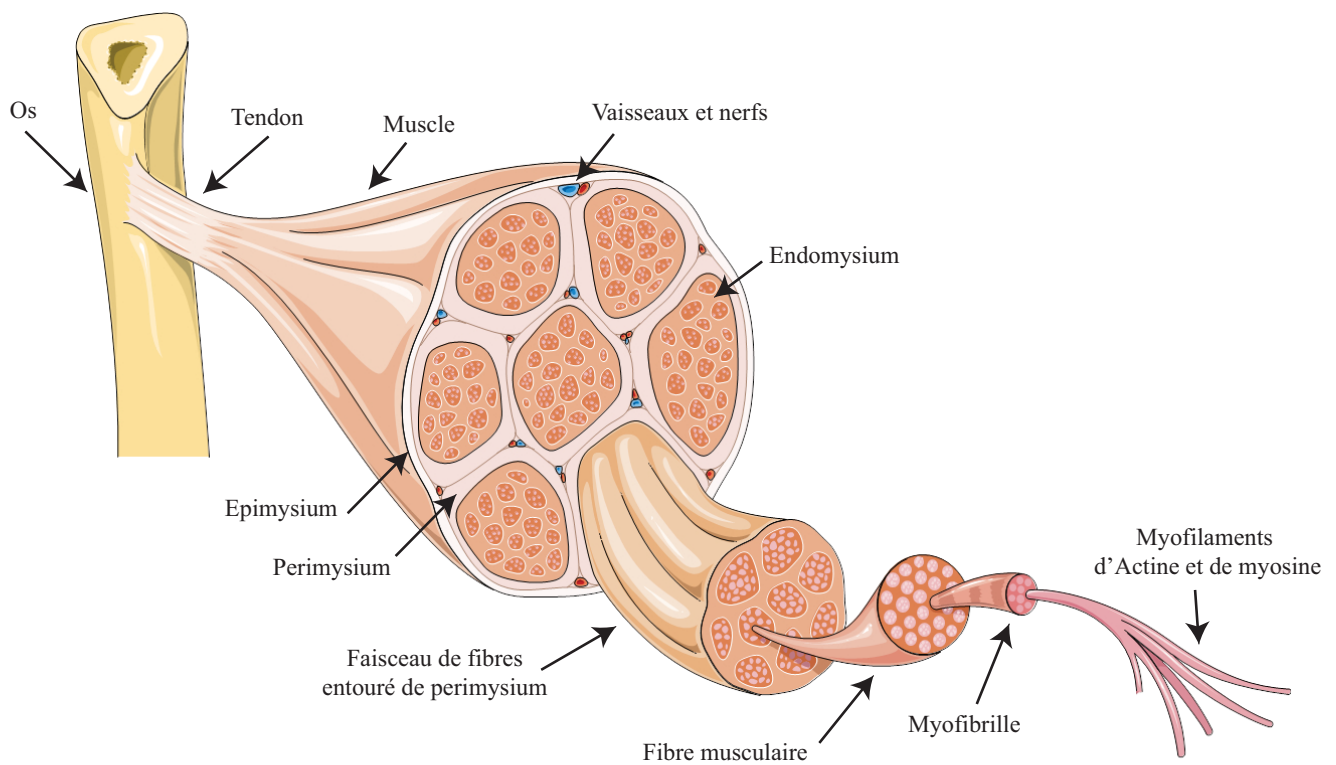
**Figure 3. Exemple de la DM1 repertorié sur le portail Flybase des maladies humaines.**

La DM1 fait partie des maladies référencées sur le portail des maladies humaines de Flybase. Ce portail résume les données connues sur la DM1 et les modèles de drosophile de la pathologie. Il recense les orthologues connus, les lignées disponibles et les publications en rapport avec les modèles déjà créés. D'après Miller *et al.*, ce portail regroupe plus de 170 maladies humaines correspondant à environ plus de 350 gènes de drosophile (Miller *et al.*, 2016). D'après Flybase.

L'utilisation de ce système s'est amplifiée grâce à la création de nombreuses collections de lignées (Bloomington, VDRC, DGRC, Janelia,...) qui mettent à disposition des chercheurs, des milliers de lignées inductibles (UAS), ARN interférence inductibles (UAS-ARNi) et inductrices (Gal4) (Venken et Bellen, 2005).

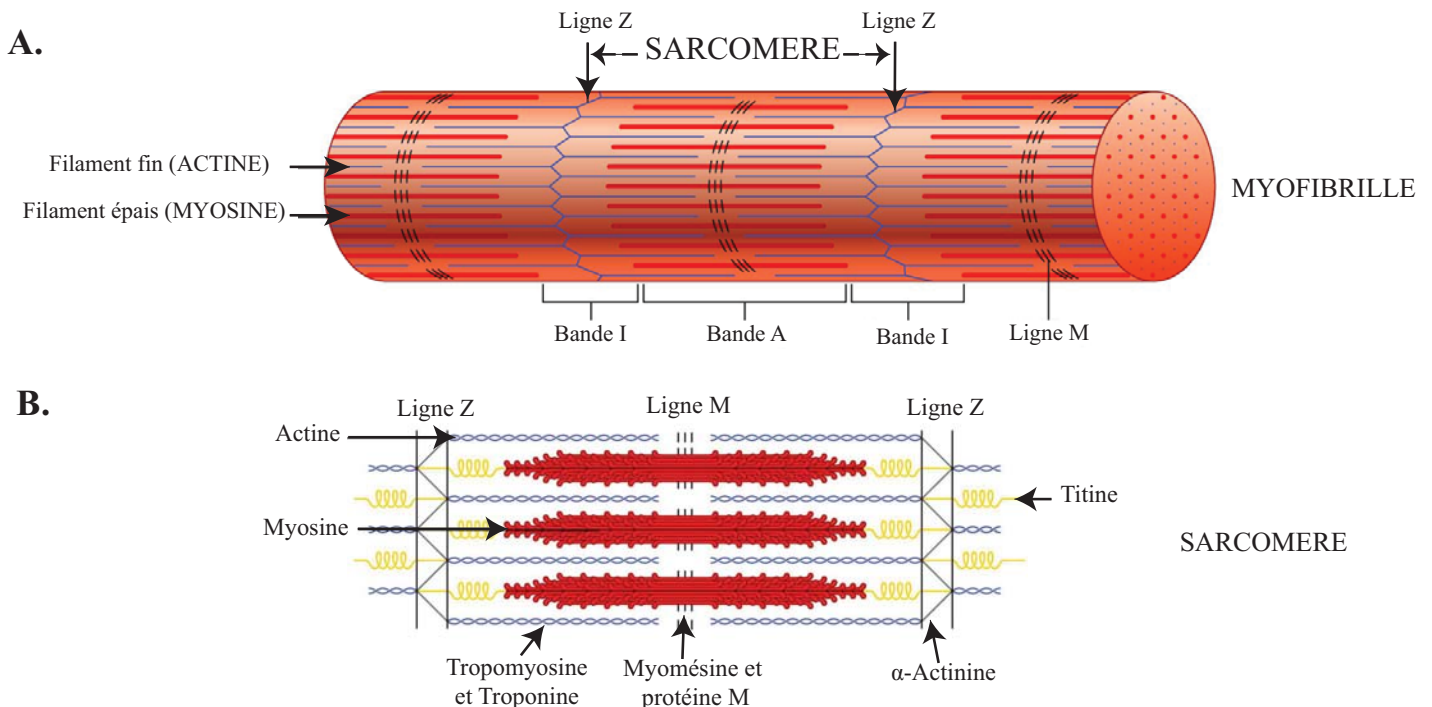
De plus, de nouveaux outils sont aujourd'hui utilisés comme le système d'édition du génome CRISPR/Cas9 issu des bactéries, et ont permis de révolutionner la manière de créer de nouveaux modèles animaux ou étudier des gènes pour lesquels aucun outil n'est disponible. En effet, cette nouvelle technique de modification des gènes, succédant aux nucléases à doigt de zinc (« Zinc Finger Nucleases », ZFN) et effectrices de type activateur de transcription (« Transcription Activator-Like Effector Nucleases », TALENS) est moins coûteuse, plus rapide et permet l'établissement de lignées knock-out (KO) et/ou knock-in (KI) aussi bien chez la drosophile que pour des modèles mammifères comme la souris (Gaj *et al.*, 2013; H. Kim et Kim, 2014). Le CRISPR/Cas9 a notamment permis de corriger la mutation à l'origine de la myopathie de Duchenne dans un modèle de souris (Long *et al.*, 2014; Mendell et Rodino-Klapac, 2016) et fait désormais partie des stratégies de thérapie privilégiées pour les maladies humaines (Yang *et al.*, 2016).

En plus de la conservation des gènes entre la drosophile et l'Homme, dont la recherche est facilitée par une base de données compilant plusieurs approches d'orthologie (Hu *et al.*, 2011), de nombreux processus développementaux et physiologiques sont conservés, permettant l'utilisation de la drosophile comme modèle pour étudier la formation de nombreux tissus et les mécanismes moléculaires impliqués dans les maladies humaines. A ce jour, la recherche des mots-clés « drosophila », « human » et « disease » sur la base de données Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) recense plus de 300 résultats par an depuis 2012 alors qu'il était inférieur à 100 avant les années 2000, démontrant l'expansion croissante de l'utilisation de ce modèle pour l'étude des bases moléculaires de maladies humaines, comme pour la maladie de Huntington (Jackson *et al.*, 1998), d'Alzheimer (Crowther *et al.*, 2004) ou plus généralement pour l'étude du vieillissement (He et Jasper, 2014). Faisant suite à l'expansion des études appliquées à la drosophile, la base de données « Flybase » (<http://flybase.org/>) a en particulier développé récemment un portail spécialisé pour la recherche des modèles de drosophile déjà établis pour l'étude de pathologies humaines, ou la DM1 y est répertoriée (Millburn *et al.*, 2016) (**Figure 3**).



**Figure 4. Anatomie du muscle squelettique.**

Le muscle squelettique est attaché à l'os par les tendons, il est recouvert de tissu conjonctif appelé épimysium. Chaque muscle est organisé en faisceaux de fibres musculaires recouvertes de périmysium et entourées de vaisseaux sanguins et de nerfs. Chaque faisceau est composé de multiples cellules musculaires (ou fibres) multinucléées, entourées d'endomysim, qui ont une morphologie cylindrique et allongée. Chaque fibre comprend plusieurs myofibrilles, elles-mêmes composées de myofilaments d'Actine et de myosine formant les unités contractiles du muscle, le sarcomère. *Adapté d'après <http://www.eurostemcell.org>.*



**Figure 5. Composition d'un sarcomère.**

A. Une myofibrille est composée de myofilaments d'Actine (filaments fins) et de Myosine (filaments épais) qui forme les sarcomères, unités contractiles du muscle. Un sarcomère est délimité par deux lignes Z. Les bandes I (isotropiques) et les bandes A (anisotropiques) sont coupées en leur milieu par la ligne Z et la ligne M respectivement. B. Les protéines constituant le sarcomère sont la Tropomyosine et Troponine associées à l'Actine du filament fin, la Titine attaché au filament de Myosine. La ligne Z est composée d' $\alpha$ -Actinine alors que la ligne M contient de la Myoméline et la protéine M. *Adapté d'après Pearson Benjamin Cummings, 2009.*

## **2. Conservation du développement musculaire avec les vertébrés et des voies de régulation impliquées**

La myogenèse (du grec myo "muscle" et genesis "naissance") est le processus, mis en place dès l'embryogenèse qui conduit à la formation des tissus musculaires et fait intervenir des mécanismes génétiques et moléculaires hautement conservés entre la drosophile et les vertébrés (Taylor, 2000).

### **a. Le muscle squelettique : généralités**

Le muscle squelettique, ou strié en opposition au muscle lisse qui compose les organes à contraction lente, est un muscle à contraction volontaire dont la principale fonction est la motricité. Le tissu musculaire est attaché à l'os par les tendons, il est recouvert de tissu conjonctif appelé épimysium. Chaque muscle, innervé et vascularisé, est organisé en faisceaux de fibres musculaires où chaque faisceau est recouvert de périmysium. Un faisceau est composé de multiples cellules musculaires (ou fibres) multinucléées, entourées d'endomysium, qui ont une morphologie cylindrique et allongée. Chaque fibre comprend plusieurs myofibrilles, elles-mêmes composées de myofilaments organisés en sarcomères, les unités contractiles du muscle (**Figure 4**).

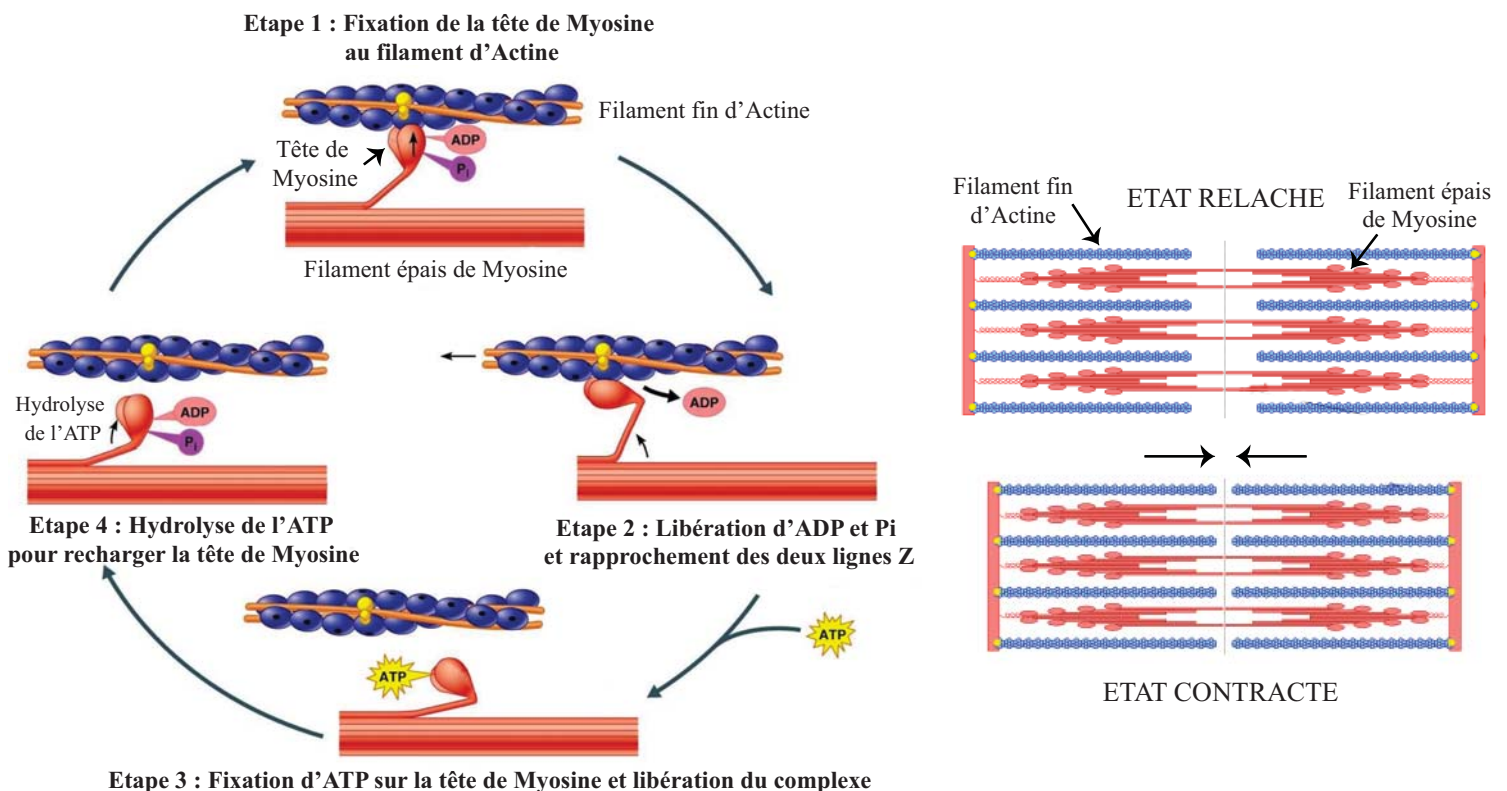
- **Composition des sarcomères**

Le sarcomère est composé de différents types de filaments, eux-mêmes composés de différentes protéines musculaires : les filaments fins sont composés d'actine alors que les filaments épais sont faits de myosine. D'autres protéines composent les sarcomères, notamment la tropomyosine et la troponine, qui sont associées au filament fin (actine). La titine quant à elle est une protéine géante, dont la propriété élastique permet le maintien de la structure du sarcomère. Elle est attachée au filament épais (myosine) et interagit avec d'autres protéines du sarcomère et notamment avec l' $\alpha$ -actinine qui compose la ligne Z. Chaque sarcomère est délimité par deux lignes Z, qui sont perpendiculaires aux filaments fins et épais. La titine est donc attachée entre la ligne Z ( $\alpha$ -actinine) et la ligne ou bande M, composée de protéines M ou de myoméline, qui se situe au centre du sarcomère. L'apparence striée du sarcomère est due à l'alternance transversale de bandes claires ou isotropiques (bandes I), composées majoritairement des filaments fins (actine) et de bandes sombres ou anisotropiques (bandes A). Les bandes A et I sont interrompues en leur milieu, respectivement par le disque Z et la bande M (Fürst et Gautel, 1995; Gautel et Djinović-Carugo, 2016) (**Figure 5**).

Type de fibre musculaire	Vitesse de contraction	Résistance à la fatigue	Métabolisme de la contraction	CARACTERISTIQUES
Type 1	LENTE	FORTE	OXYDATIF	Riches en myoglobine, mitochondries et capillaires
Type 2a	RAPIDE	FORTE	OXYDO-GLYCOLYTIQUE	Riches en myoglobine, mitochondries et capillaires
Type 2b	RAPIDE	FAIBLE	GLYCOLYTIQUE	Contenant peu de myoglobine, de mitochondries et de capillaires Riches en Glycogène

**Tableau 1. Types de fibres musculaires et caractéristiques.**

Chez l'Homme, il existe trois types de fibres musculaires, dépendant de leur vitesse de contraction, de leur résistance à la fatigue, du métabolisme en jeu dans la contraction mais aussi de la composition en myosine. D'autres caractéristiques comme la composition en myoglobine, en mitochondries ou en capillaires permet de les différencier.



**Figure 6. La contraction musculaire.**

De manière simplifiée, lorsque la myosine exerce son activité ATPasique, ceci permet la libération d'ADP (Adénosine DiPhosphate) et de Pi (Phosphate inorganique), qui modifie la conformation de la myosine et permet sa fixation à l'actine (étape 1). La libération d'ADP et de Pi permet le rapprochement de deux lignes Z et donc la contraction (étape 2). La fixation rapide d'ATP à la myosine cause ensuite la dissociation du complexe actine/myosine et un retour à l'état normal (étape 3). L'hydrolyse d'ATP permet de recharger la tête de myosine en énergie pour une prochaine contraction (étape 4). *Adapté d'après studyblue.com.*



- Types de fibres musculaires

Les sarcomères sont donc les composants essentiels à la contraction des fibres musculaires, dont le processus sera détaillé ci-dessous. Ces fibres musculaires peuvent être de différents types, classés en fonction de leur capacité de contraction, qui dépend elle-même de leur teneur en myoglobine, la protéine capable de transporter et stocker l'oxygène dans le muscle squelettique. De plus, la composition en myosine à chaîne lourde (MHC) est un marqueur du type de fibre puisque la MHC lente compose les fibres de type 1 et la MHC rapide est retrouvée dans les fibres de type 2 (Talmadge *et al.*, 1993; Scott *et al.*, 2001). Les trois types de fibres musculaires sont (**Tableau 1**) :

- les fibres de type 1 ou fibres lentes et résistantes à la fatigue, riches en myoglobine et en mitochondries. Riches en capillaires (fibres rouges), ces fibres oxydatives hydrolysent l'ATP (Adénosine triphosphate) lentement et composent par exemple les muscles du cou ;

- les fibres de type 2a ou fibres rapides et résistantes à la fatigue sont riches en myoglobine, en mitochondries. Ces fibres sont aussi riches en capillaires (fibres intermédiaires), combinent un métabolisme oxydatif et glycolytique, et composent en majorité les muscles des jambes ;

- les fibres de type 2b ou fibres rapides mais sensibles à la fatigue contiennent peu de myoglobine, de mitochondries et peu de capillaires (fibres blanches) mais sont riches en glycogène. Ces fibres glycolytiques composent en particulier les muscles des bras.

La plupart des muscles squelettiques sont composés de différents types de fibres qui vont s'activer en fonction de la contraction nécessaire : les fibres de type 1 se contractent pour un effort léger alors que les fibres de type 2a seront fonctionnelles pour un effort intense (Tortora et Grabowski, 1994; Schiaffino et Reggiani, 2011).

- La contraction musculaire via les sarcomères

Le sarcomère permet une contraction du muscle par glissement des myofilaments d'actine sur les myofilaments de myosine : les filaments d'actine se rapprochent en direction de la bande M grâce à l'action de la myosine, ce qui provoque un raccourcissement du sarcomère. Cette contraction nécessite des échanges de calcium et consomme de l'énergie via l'hydrolyse de l'ATP permise par la myosine (**Figure 6**).

La volonté de se mouvoir déclenche un influx nerveux : ce potentiel d'action (PA) entraîne la libération d'Acétylcholine qui permet la transmission, via la plaque motrice, du PA

Gène drosophile	Gène humain	FONCTION
<i>Dpp</i>	<i>BMP</i>	Molécules de signal
<i>Hh</i>	<i>Shh</i>	
<i>Wg</i>	<i>Wnt</i>	
<i>dMef2</i>	<i>MEF2</i>	Facteurs de transcription
<i>Ladybird (Lbe/Lbl)</i>	<i>Lbx 1/2/3</i>	
<i>Even-skipped (eve)</i>	<i>Evx 1/2</i>	
<i>Slouch</i>	<i>Nkx1.1</i>	
<i>Snail</i>	<i>SNAI 1/2/3</i>	
<i>Apterous (ap)</i>	<i>Lhx 2/9</i>	
MRF : <i>Nautilus, twist</i>	MRF : <i>MyoD, Myf5, Myogenin, MRF4</i>	
<i>Msh</i>	<i>Msx1</i>	
<i>spalt major (salm)</i>	<i>spalt-like (SALL)</i>	Ligands/ Récepteurs
<i>Notch</i>	<i>NOTCH 1/2/3/4</i>	
FGFR : <i>Heartless (Htl), Breathless (Btl)</i> FGF : <i>Pyramus (Pyr), Thisbe (Ths), Branchless (Bnl)</i>	<i>FGFR</i> <i>FGF</i>	
<i>Mhc</i>	<i>MHC</i>	Protéines sarcomériques
<i>Upheld(up)</i>	<i>Troponine T</i>	
<i>Tm1</i>	<i>Tropomyosine 1</i>	

Tableau 2. Conservation des gènes impliqués dans la myogénèse entre la drosophile et les vertébrés.

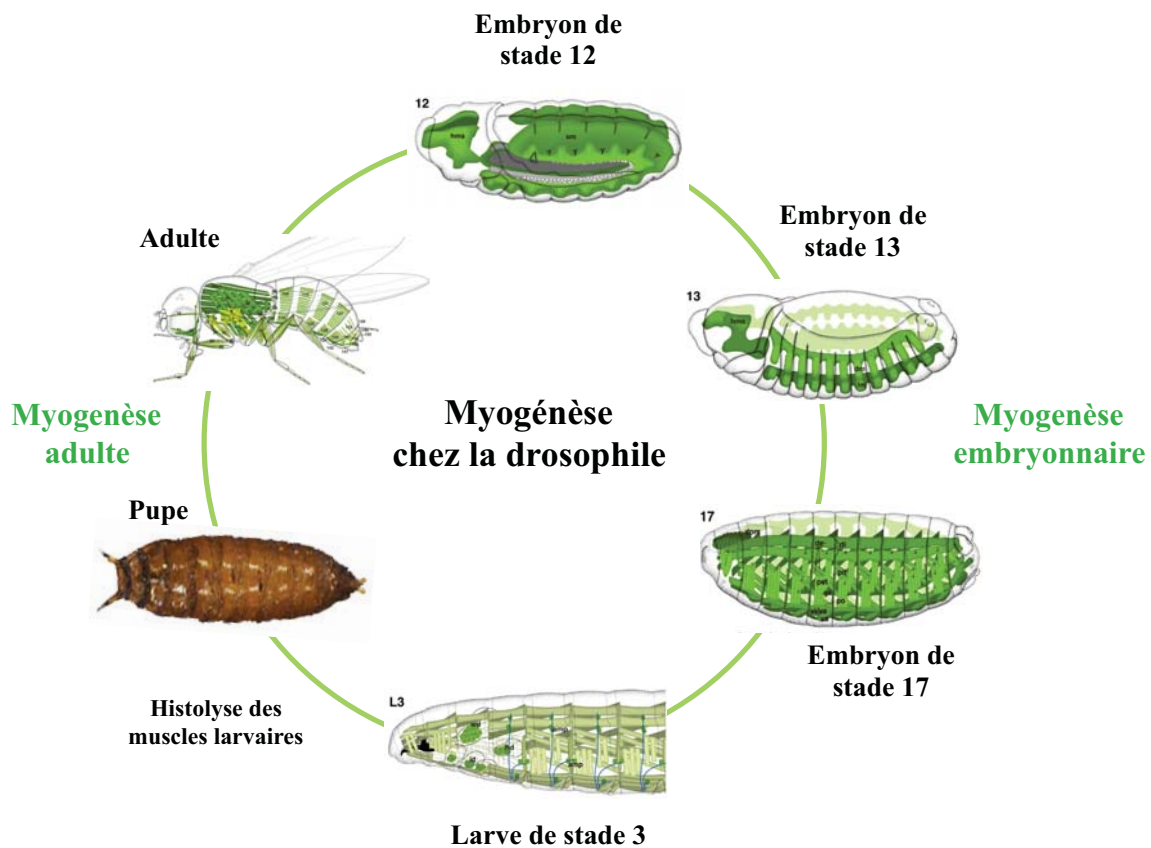


Figure 7. Vagues de myogénèse chez la drosophile.

Chez la drosophile, il existe deux vagues de myogénèse : la myogénèse embryonnaire permet la formation des muscles embryonnaires qui persistent durant toute la vie larvaire, et la myogénèse adulte a lieu durant le stade pupal, après la métamorphose pour permettre la création des muscles adultes. *Adapté d'après « Atlas of Drosophila Development », Volker Hartenstein, 1993*

au muscle et sa dépolarisation. Dans le muscle, la dépolarisation se propage à travers le réseau de tubules-T, qui sont des invaginations situées le long du sarcolemme (membrane plasmique et membrane basale) entourant chaque fibre. Sa propagation est permise par l'ouverture de canaux sodiques et calciques voltage-dépendants et en particulier des canaux calciques DHPR (récepteurs aux dihydropyridines), provoquant un flux entrant de calcium. Ceci provoque l'activation du récepteur à la Ryanodine (Ryr) situé à la membrane du réticulum sarcoplasmique (RS) et permet la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  du RS dans le cytoplasme. L'apport de  $\text{Ca}^{2+}$  permet sa liaison à la troponine C, elle-même liée à l'actine des filaments fins. Ceci entraîne un changement de conformation du filament par déplacement de la Tropomyosine, et libère ainsi les sites de fixation de la myosine qui peut venir se lier à l'actine et tirer sur les filaments fins. La myosine exerce alors son activité ATPasique : couplée initialement à l'ADP (Adénosine diphosphate) et au Pi (Phosphate inorganique), elle les libère lors de sa fixation à l'actine, provoquant un changement de conformation de la tête de myosine et le rapprochement de deux lignes Z (la contraction). La fixation rapide d'ATP à la myosine cause ensuite la dissociation du complexe actine/myosine et un retour à l'état normal. Ces cycles d'excitation-contraction se produisent jusqu'à la repolarisation de la cellule entraînant une baisse de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire (Franzini-Armstrong, 1999) (**Figure 6**).

Le muscle a donc pour fonction de transformer de l'énergie chimique en énergie mécanique pour permettre le mouvement, via les sarcomères. La contraction musculaire décrite ci-dessus concerne l'Homme mais la composition des sarcomères chez la drosophile est similaire : on dénombre des filaments fins et épais constitués des mêmes protéines que chez les vertébrés. De plus, les canaux ioniques responsables de la contraction présentent des orthologues chez la drosophile, suggérant que la structure du muscle somatique chez la drosophile soit l'équivalent du muscle squelettique humain. Enfin, les muscles de drosophile sont aussi multinucléés, mettant en jeu le processus de fusion des myoblastes, détaillé ci-dessous.

#### **b. La formation du muscle chez la drosophile et similarités avec les vertébrés**

Il existe une grande conservation des principales étapes et des signaux impliqués dans la myogenèse entre la drosophile et les vertébrés. Notamment, les gènes essentiels à la formation du muscle sont conservés chez la drosophile (**Tableau 2**), et particulièrement les facteurs de transcription de type bHLH (basic helix-loop-helix) appelés facteurs de régulation myogénique (FRM) (ou MRF « myogenic regulatory factors ») essentiels à la régulation de la





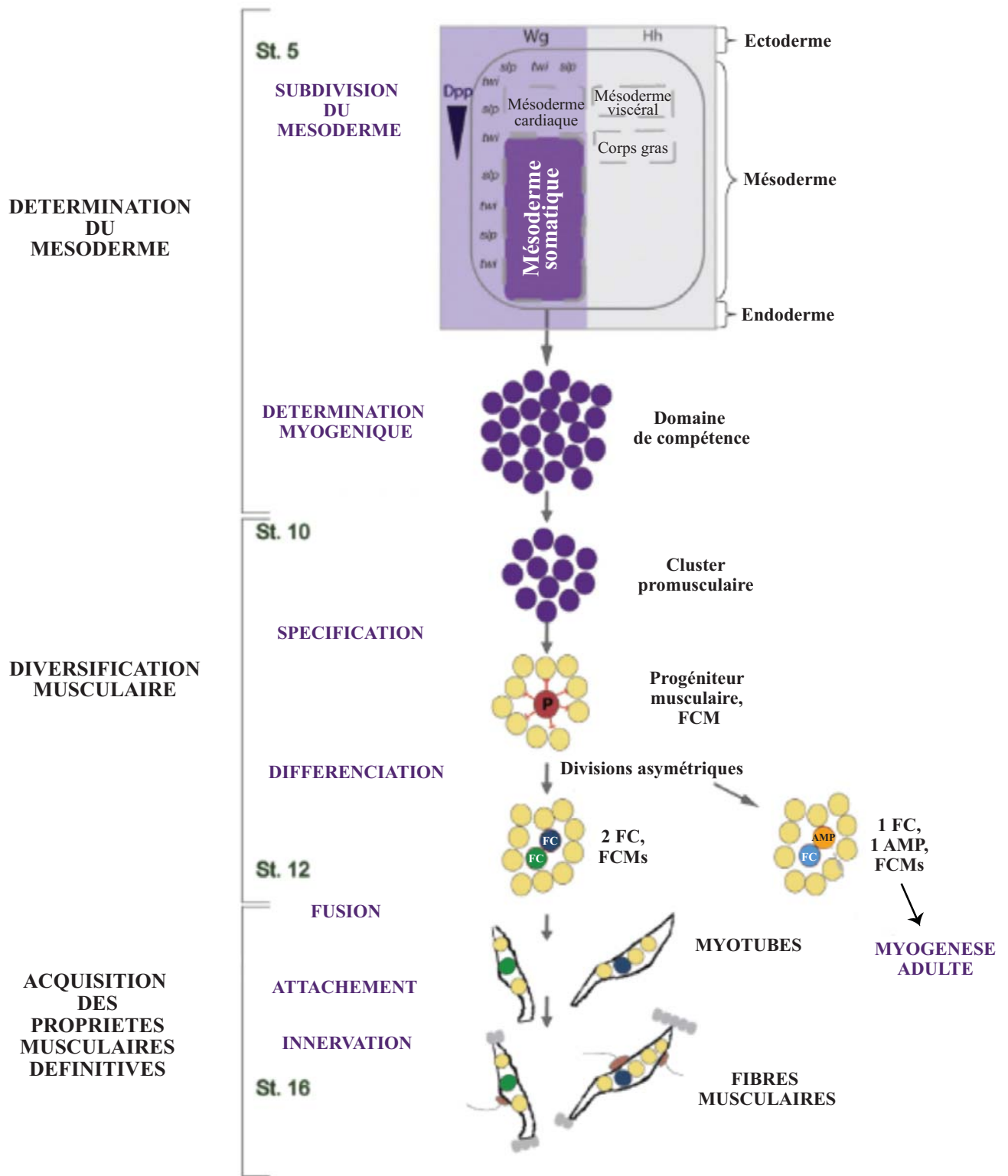
myogenèse comme MyoD, Myogenin, Myf5 et MRF4 chez les vertébrés ou Twist et Nautilus chez la drosophile. De plus, le FT responsable de la diversification musculaire, Myocyte-specific Enhancer Factor 2 (MEF2/dMef2), est présent dans les deux espèces (Braun *et al.*, 1989; Ip *et al.*, 1992; Bour *et al.*, 1995; Weintraub *et al.*, 1991; M. K. Baylies et Bate, 1996; Parker *et al.*, 2003).

La formation des muscles chez la drosophile se déroule en deux phases (**Figure 7**) : la myogenèse embryonnaire qui permet la formation des muscles larvaires et la myogenèse adulte qui fait suite à l'histolyse de la majorité des muscles larvaires lors de la métamorphose. On peut y voir une homologie avec la myogenèse des vertébrés qui met en jeu trois vagues successives et chevauchantes. La myogenèse embryonnaire des vertébrés permet la formation de fibres primaires via la fusion des myoblastes embryonnaires Pax3 positifs (Pax3+), puis la myogenèse secondaire ou fœtale donne naissance aux fibres secondaires formées par la fusion entre les myoblastes secondaires (Pax3+) entre eux ou avec des fibres primaires. Enfin, la myogenèse post-natale met en jeu la fusion des cellules satellites Pax3+ et Pax7+, étape détaillée ci-dessous (Relaix *et al.*, 2006; Messina et Cossu, 2009) (**Figure 8**).

- **Myogenèse embryonnaire**

Chez les vertébrés et la drosophile, les muscles dérivent du mésoderme, formé durant la gastrulation. La subdivision du mésoderme permet la formation des futurs organes: le mésoderme somatique chez la drosophile et le mésoderme paraxial chez les vertébrés sont à l'origine du muscle strié (Bate, 1990; Mary K. Baylies *et al.*, 1998; Pourquoié, 2001).

Chez les vertébrés, le mésoderme paraxial se situe de chaque côté du tube neural, dont l'unité de base est le somite, élément répété le long de l'axe rostro-caudal qui se forme dès le début de l'embryogenèse, juste après la gastrulation. Ces somites vont se subdiviser, selon l'axe antéro-postérieur, en sclérotome ventralement qui formera le cartilage et les os et en dermomyotome en postérieur, permettant la formation du derme et des muscles squelettiques. La régionalisation du dermomyotome est régie par de nombreux facteurs de transcription (FT) ou morphogènes : les Bone Morphogenic Proteins (BMP) provenant du mésoderme somatique, Wnt (Wingless-type) de l'ectoderme, Wnt et Sonic hedgehog (Shh) du tube neural et Shh de la notochorde. Ils permettent de spécifier les muscles hypaxiaux à l'origine des muscles des membres, du diaphragme et de la ceinture abdominale alors que le mésoderme paraxial formera les muscles de la tête (Marcelle *et al.*, 1997; Dietrich *et al.*, 1998) (**Figure 9**).



**Figure 10. La myogénèse embryonnaire chez la drosophile.**

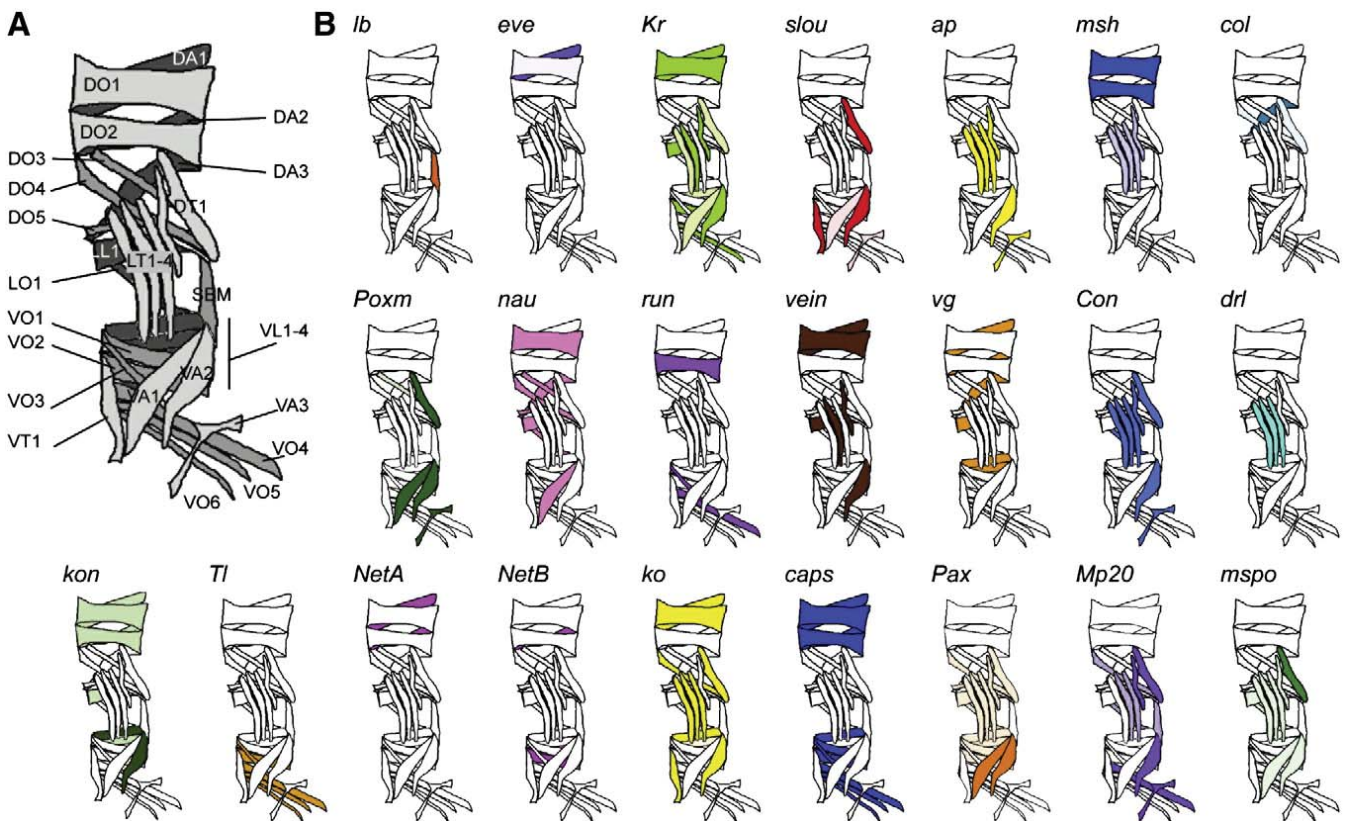
Le processus qui permet la formation des futurs tissus musculaires chez la drosophile a lieu lors de l'embryogénèse. Entre les stades embryonnaires 5 (E5) et 10 (E10), le mésoderme se subdivise en mésoderme cardiaque, viscéral, en corps gras et en mésoderme somatique. Les cellules issues du mésoderme somatique se différencient, entre les stades E10-E12, pour donner des cellules fondatrices (FCs) grâce à l'action des gènes d'identité et des myoblastes compétents à la fusion (FCMs). A partir du stade E12, plusieurs FCMs sont attirés vers une FC et fusionnent pour donner des myotubes multinucléés qui vont ensuite s'attacher et être innervés pour donner les fibres musculaires qui persisteront pendant toute la vie larvaire. En parallèle, des divisions asymétriques pour générer les cellules précurseurs adultes (AMPs) qui permettront la formation des muscles adultes durant le stade pupal. *Adapté d'après Tixier et al., 2010.*

Chez la drosophile, la formation du muscle commence dès le stade 5 de l'embryogenèse avec la spécification du mésoderme, au cours de la gastrulation, grâce à l'expression des FT Twist (Twi) et Snail (Sna) (Thisse *et al.*, 1991; Ip *et al.*, 1992).

Il se subdivise ensuite, au sein de chaque segment, en mésoderme cardiaque, viscéral, somatique et en corps gras (équivalent du foie et du tissu adipeux des vertébrés). C'est le mésoderme somatique qui donnera naissance aux muscles somatiques, qui sont l'équivalent des muscles squelettiques des vertébrés (Bate, 1990). Les signaux qui gouvernent la régionalisation du mésoderme sont conservés et impliquent les orthologues de Wnt Wingless (Wg), de Shh Hedgehog (Hh) et de BMP-4 Decapentaplegic (Dpp) (Tixier *et al.*, 2010).

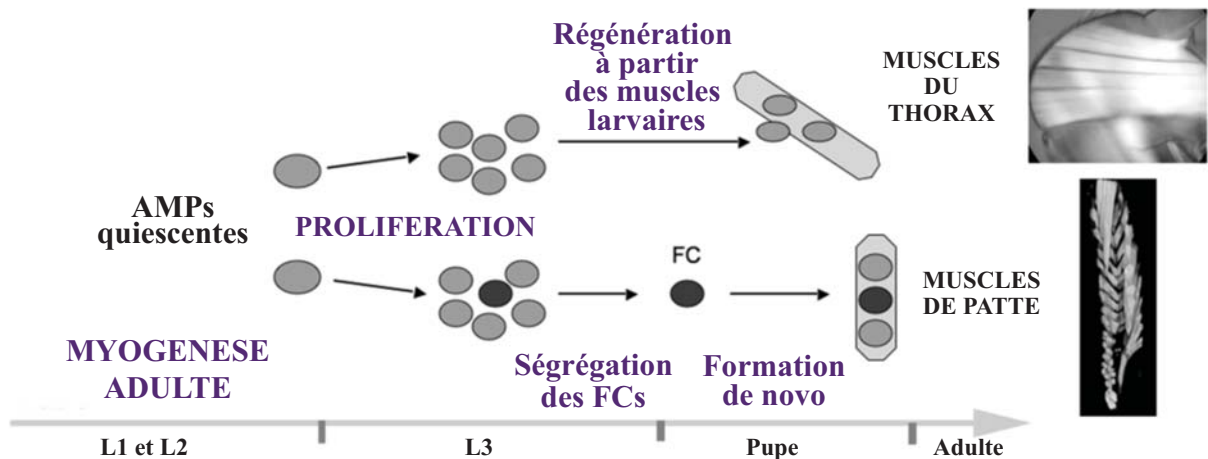
Au cours du stade embryonnaire 10 (E10), des domaines de compétence sont déterminés par des signaux Wg et Dpp et vont être à nouveaux subdivisés en clusters promusculaires sous l'influence de facteurs de croissance (voies FGF et EGF) (Azipiazu *et al.*, 1996). Au stade embryonnaire 11 (E11), à la suite d'un processus d'inhibition latérale faisant intervenir la voie Notch, deux types de cellules vont émerger au sein de ces clusters: des progéniteurs et des myoblastes compétents à la fusion (« Fusion Competent Myoblasts », FCM). Suite à une division asymétrique, ces progéniteurs vont permettre la formation soit de deux cellules dites fondatrices (« Founder Cells », FC) soit d'une FC et d'une cellule précurseur de muscle adulte (« Adult Muscle Precursor », AMP) qui va rester quiescente jusqu'au deuxième stade larvaire où elle va ensuite participer à la myogenèse adulte (**Figure 10**).

Chaque FC porte l'identité d'une future fibre musculaire, caractérisée par l'expression d'une combinatoire de facteurs de transcription aussi appelés « gènes d'identité ». Ainsi, au cours des stades embryonnaires 12 à 16, les 30 FCs attirent et fusionnent avec un nombre déterminé de FCM pour former des myotubes multinucléés qui seront maturés en 30 muscles morphologiquement différents (Tixier *et al.*, 2010) (**Figure 11**). En effet, la fusion des myoblastes est un processus régulé de manière globale mais aussi de manière muscle-spécifique. La combinatoire d'expression des gènes d'identité par la FC, maintenue dans la fibre musculaire mature, détermine l'identité de chaque fibre : taille, position, nombre de noyaux, sites d'attachement et d'innervation (Bate et Rushton, 1993). Ainsi, c'est l'expression de protéines membranaires et de régulateurs du cytosquelette d'actine comme Mp20 (Muscle Protein 20), Pax (Paxillin) et mspo (m-spondin), cibles de gènes d'identité, qui détermine le nombre d'évènements de fusion dans certains muscles (Bataillé *et al.*, 2010).



**Figure 11. Patron musculaire embryonnaire et larvaire et gènes d'identité impliqués.**

A. Le patron musculaire de l'embryon puis de la larve de drosophile est composé de 30 muscles dont les propriétés (taille, position, nombre de noyaux, sites d'attachement et d'innervation) sont bien définies, notamment au niveau des segments abdominaux A2 à A7. B. Ces propriétés sont définies grâce à l'expression de gènes d'identité et de facteurs de transcription, spécifiques de sous-types musculaires, comme par exemple, ladybird (Lb/lbx1) exprimé uniquement dans le muscle de bordure de segment (SBM). D'après Tixier et al., 2010.



**Figure 12. Myogénèse adulte à partir des AMPs.**

La myogénèse adulte se fait à partir des cellules AMPs qui sortent d'un état quiescent lors de la transition L1/L2 (premier et deuxième stade larvaire) et prolifèrent durant le troisième stade larvaire (L3). Au stade pupal, ces AMPs se différencient en FCs et vont permettre la formation des muscles de novo par fusion des FCs (muscles du thorax) ou la régénération à partir des muscles larvaires non histolysés (muscles de patte). Adapté d'après Daczewska et al., 2010.



A la fin de la myogenèse, l'embryon de drosophile présente donc une structure musculaire segmentée et répétée des segments abdominaux A2 à A7. Au total, la musculature comprend 30 muscles par hémisegment où chaque muscle est formé d'une seule fibre musculaire multinucléée. Durant les trois stades larvaires, ces muscles vont croître en même temps que la larve et permettre sa locomotion (Bate, 1993; Ruiz-Gomez, 1998).

La myogenèse embryonnaire des deux espèces (la drosophile et l'Homme) présente plusieurs similarités, notamment la conservation des signaux et des réseaux impliqués dans la spécification et la différenciation des muscles à partir du mésoderme. Cependant, malgré une conservation des facteurs d'identité dans les deux espèces, leur rôle dans la diversification musculaire chez les vertébrés n'a pas pu être établi. Par exemple, le gène humain *Lbx1* (orthologue du gène d'identité musculaire *ladybird*) est exprimé dans une sous-population de précurseurs de muscles appendiculaires chez la souris (Jagla *et al.*, 1995) et requis pour leur migration dans les bourgeons de pattes au cours du développement (Hérault *et al.*, 1996; Brohmann *et al.*, 2000). Cependant, il reste à définir si la mutation de *Lbx1* entraîne une perturbation de l'identité des précurseurs musculaires chez les vertébrés comme c'est le cas pour le mutant *ladybird* chez la drosophile (Jagla *et al.*, 1998). Or, le manque de marqueurs permettant de suivre les changements d'identité musculaire chez les vertébrés ne permet pas de répondre à cette question.

Enfin, les étapes de fusion, d'attachement et d'innervation partagent des acteurs communs. La fusion des myoblastes dans les deux espèces met en jeu les mêmes étapes : la migration des cellules les unes vers les autres, leur reconnaissance et leur adhésion puis la fusion suite à la réorganisation du cytosquelette d'actine de la membrane des cellules. Les étapes d'attachement et d'innervation sont les étapes finales de la formation d'un muscle fonctionnel : l'attachement du muscle au squelette chez les vertébrés ou à l'épiderme chez la drosophile se fait via les tendons et l'innervation des muscles se fait grâce aux motoneurones. Ces étapes présentent des similarités entre les deux espèces (Zinn, 2009; Schweitzer *et al.*, 2010).

- **Myogenèse adulte**

Avant la mise en place de la deuxième vague de myogenèse lors du stade pupal, un processus d'histolyse des tissus larvaires se met en place (**Figure 12**). La musculature adulte est alors produite à partir des cellules AMPs, qui ont perdu leur quiescence et ont proliféré depuis la fin du 2<sup>ème</sup> stade larvaire. Ces AMPs fusionnent soit avec des fibres larvaires non

Gène drosophile	Gène vertébré (humain)	FONCTION
<i>Dpp</i>	<i>BMP</i>	Molécules de signal
<i>Hh</i>	<i>Shh</i>	
<i>Wg</i>	<i>Wnt</i>	
<i>dHand</i>	<i>HAND1/2</i>	Facteurs de transcription
<i>dMef2</i>	<i>MEF2</i>	
<i>Dorsocross 1/2/3</i>	<i>TBX 2/3/5</i>	
<i>Pannier</i>	<i>GATA 4/6</i>	
<i>Ladybird (Lbe/Lbl)</i>	<i>Lbx 1/2/3</i>	
<i>Tinman</i>	<i>Nkx2.5</i>	
<i>Seven-up</i>	<i>COUP-TF II</i>	
<i>Neuromancer</i>	<i>TBX20</i>	
<i>Tailup</i>	<i>Isl1</i>	
<i>Zfh-1</i>	<i>SIP1</i>	

**Tableau 3. Conservation des gènes impliqués dans la cardiogénèse entre la drosophile et les vertébrés.**

histolysées soit entre elles pour former de nouvelles fibres musculaires et vont permettre la mise en place des muscles constituant les parois du corps, les muscles des pattes et de vol (Maqbool and Jagla, 2007). Ces cellules AMPs sont l'équivalent des cellules souches musculaires, ou cellules satellites chez les vertébrés, qui ont la capacité de rester quiescentes jusqu'au développement post-natal pour permettre la croissance du muscle (Figeac *et al.*, 2007; Maqbool et Jagla, 2007).

Chez les vertébrés, la myogenèse adulte ou post-natale permet la croissance et la régénération du muscle grâce aux cellules progénitrices Pax7 positives (Pax7+), elles-mêmes formées durant la deuxième vague de myogenèse (Bentzinger *et al.*, 2012). La formation du muscle adulte implique la fusion des cellules Pax7+ avec les fibres primaires générées par la myogenèse embryonnaire ou avec les fibres secondaires issues de la seconde vague de myogenèse (fœtale) (Seale *et al.*, 2000; Bentzinger *et al.*, 2012) (**Figure 8**).

### **3. Conservation du développement cardiaque entre la drosophile et les vertébrés et des voies de signalisation impliquées**

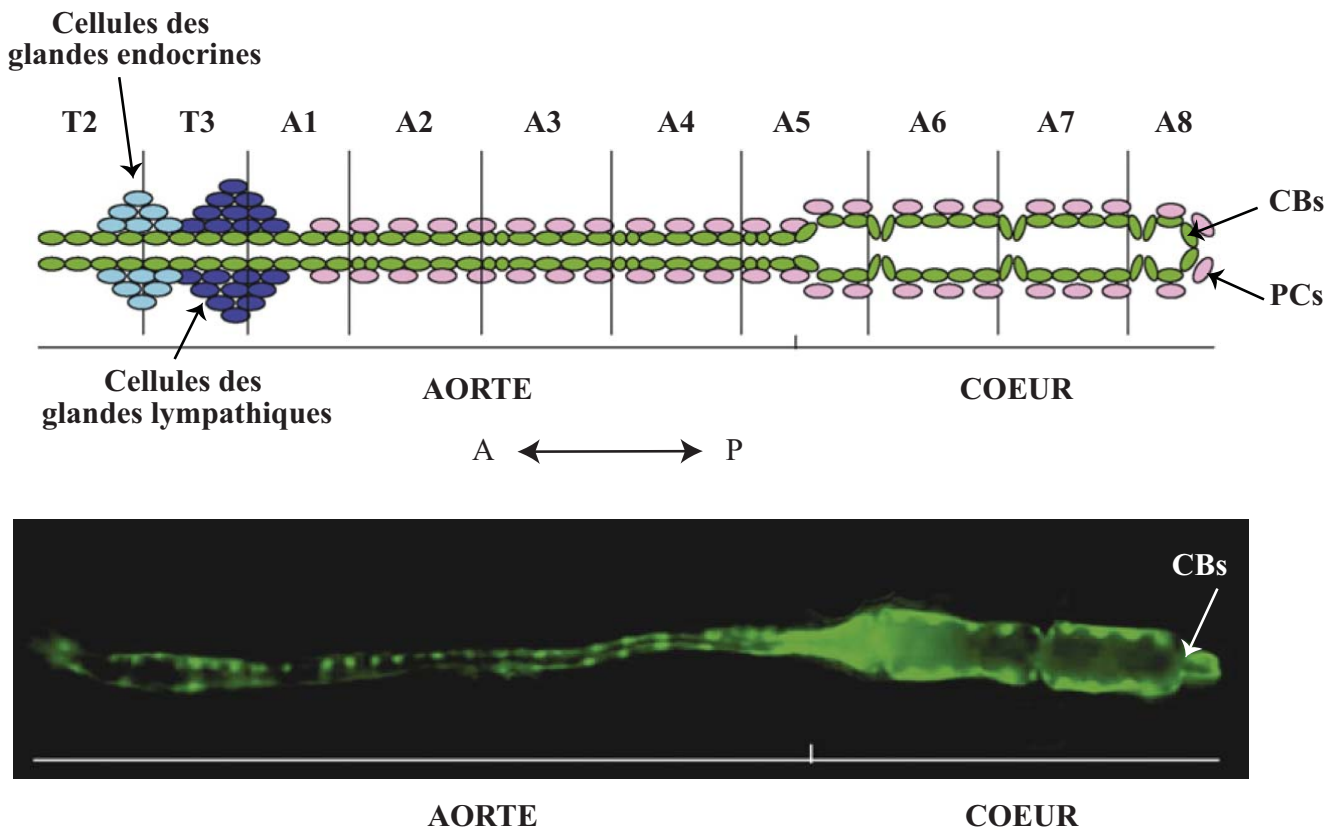
Du grec *cardia*, le cœur est le premier organe vital à se mettre en place durant l'embryogenèse. Constitué de 4 chambres (deux oreillettes et deux ventricules) chez l'Homme et les mammifères en général, il est au centre de l'appareil circulatoire qui permet la circulation du sang oxygéné via les poumons, jusque vers les organes.

La drosophile, avec son cœur sous forme de tube, est l'animal modèle le plus simple dont la fonction cardiaque est conservée avec l'Homme. Son utilisation depuis des décennies a permis de mieux comprendre les acteurs impliqués dans le développement du cœur mais aussi leurs fonctions dans les maladies cardiaques et le vieillissement (Bier and Bodmer, 2004; Ocorr *et al.*, 2014; Taghli-Lamalle *et al.*, 2016). Cependant, des différences morphologiques et physiologiques, comme une structure plus simple du cœur chez la drosophile, l'absence d'artères coronaires ou la présence de deux nœuds de cellules pacemaker, nécessitent une validation des mécanismes identifiés chez la drosophile dans des modèles plus proches phylogénétiquement, comme les vertébrés.

#### **a. Conservation des réseaux de gènes et voies de régulation**

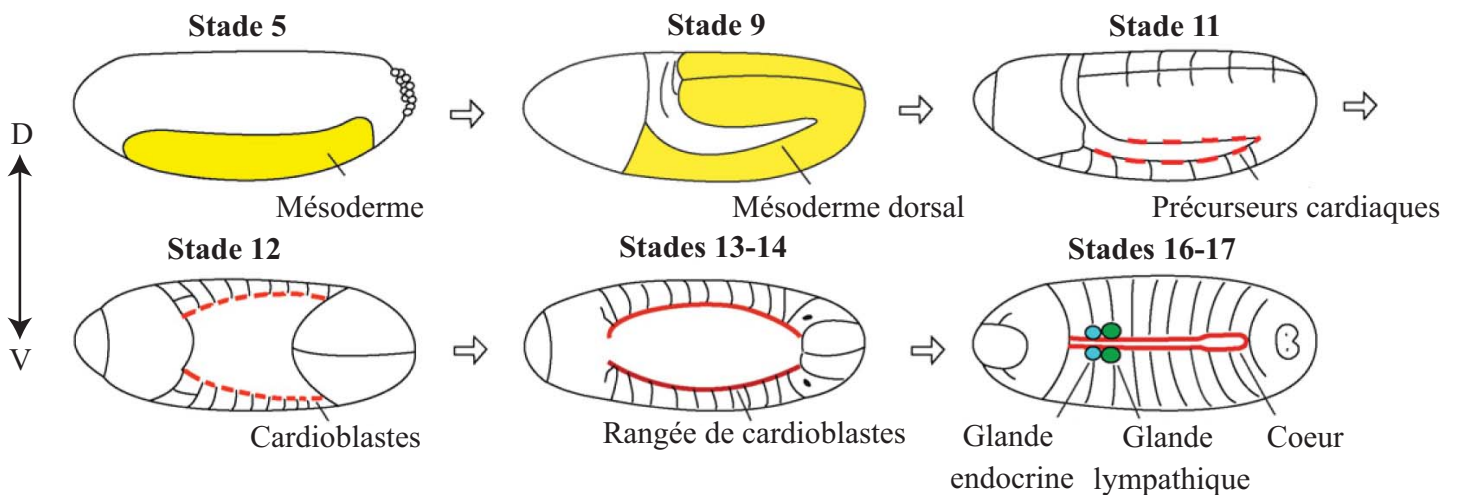
Les étapes du développement du cœur impliquent des réseaux de gènes et voies de régulation conservés entre les deux espèces (**Tableau 3**). En effet, de nombreux FT nécessaires au développement cardiaque chez l'Homme, et impliqués dans des cardiomyopathies congénitales, possèdent un orthologue dont la fonction a d'abord été mise





**Figure 13. Morphologie du coeur embryonnaire chez la drosophile**

Le cœur de l'embryon de drosophile est composé d'une centaine de cellules contractiles, appelées cardioblastes (CBs sur le schéma) entourées par les cellules péricardiaques (PCs) et réparties en segments répétés, deux thoraciques (T2-T3) et huit abdominaux (A1-A8) dont l'organisation est stéréotypée et reproductible d'un héli-segment à l'autre. En partie antérieure se situe l'aorte qui est rétrécie et en postérieur, le cœur présentant une lumière plus large. Adapté d'après *Tao et Schulz, 2007*.



**Figure 14. Formation du coeur embryonnaire chez la drosophile.**

Le coeur, comme les muscles somatiques, dérive du mésoderme (en jaune). Dès le stade 9, le mésoderme dorsal est spécifié et l'expression de trois facteurs d'identité, Tin, Doc et Pnr permet la spécification des précurseurs cardiaques (cardioblastes) qui vont ensuite s'aligner au stade 12 sur deux rangées opposées et migrer en direction de la ligne dorsale pour finir par fusionner au stade 17 à la façon d'une « fermeture éclair » et former le tube cardiaque embryonnaire (en rouge). On retrouve dans les segments thoraciques, les glandes endocrines (en bleu) et lymphatiques (en vert). D'après *Tao et Schulz., 2007*.

en évidence chez la drosophile, comme *Nkx2.5* (*Tinman*, *Tin*), *Hand* (*dHand*) ou encore les FT *GATA4/6* (*pannier*, *pnr*) et *TBX20* (*Neuromancer*, *nmr*) (Bodmer, 1993; Olson, 2006).

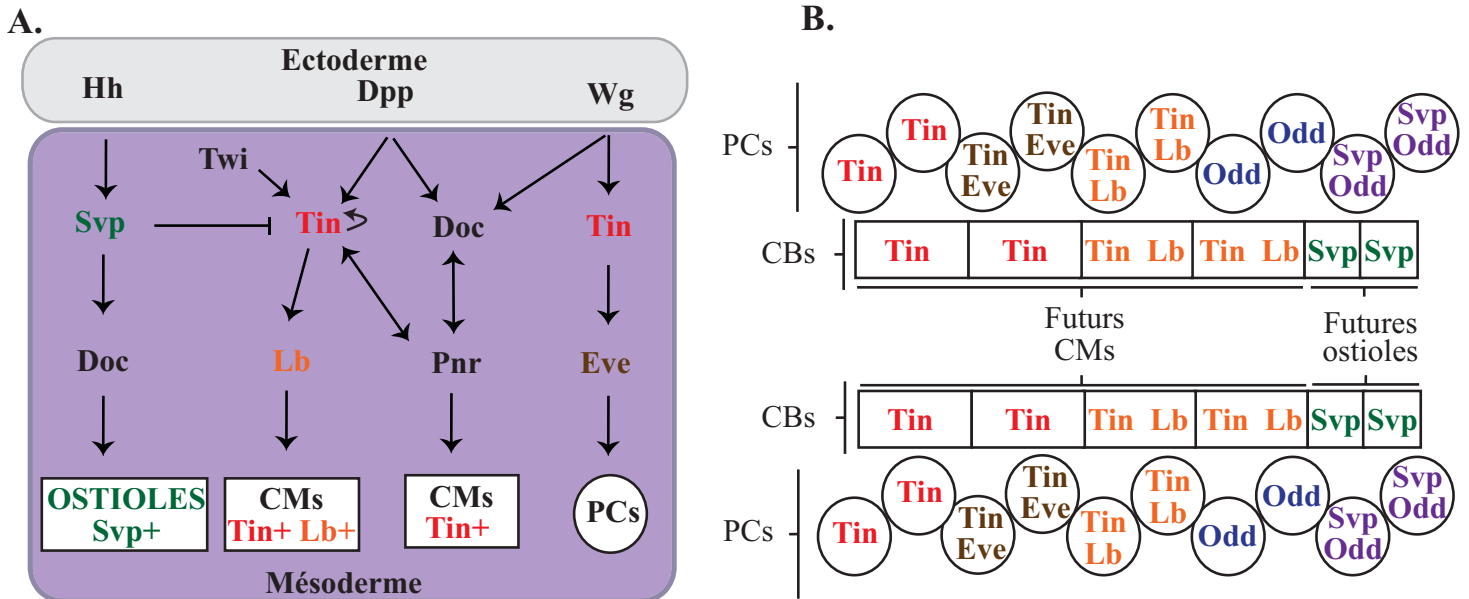
De plus, la drosophile présente des orthologues pour les gènes codant pour des protéines sarcomériques ou du cytosquelette, responsables de la contraction cardiaque impliquées dans les cardiomyopathies, comme les myosines à chaîne lourde *MYH6* et *MYH7* (*Mhc*), les troponines cardiaques T (*TNNT/Up*), C (*TNNC/TpnC*) et I (*TNNI3/WupA*), la tropomyosine (*TPMI/Tm*), l'actine cardiaque (*ACTC1/Act*) ou encore la dystrophine (*DMD/dys*) (Taghli-Lamalle *et al.*, 2016). Enfin, les canaux ioniques responsables de l'homéostasie des échanges ioniques permettant une contraction efficace et une conduction coordonnée sont conservés et notamment les canaux potassiques comme *KCNA5* (*shaker*) impliqué dans la fibrillation auriculaire (Van Wagoner *et al.*, 1997) ou *KCNQ1* (*KCNQ*) associé à la mort subite (Jentsch, 2000).

## **b. Conservation du développement cardiaque**

- **Formation du cœur embryonnaire**

Le cœur de drosophile aussi appelé vaisseau dorsal, se met en place dès les stades précoces de l'embryogenèse à partir du mésoderme cardiaque (Rizki, 1978). Son origine est identique à celle des vertébrés : deux rangées de cellules progénitrices situées latéralement, vont migrer dorsalement pour la drosophile et ventralement chez les vertébrés pour former une structure tubulaire, conservée au stade embryonnaire (Bodmer, 1995; Bodmer et Venkatesh, 1998; Cripps et Olson, 2002; Piazza et Wessells, 2011). Le cœur de la mouche se compose d'une centaine de cellules contractiles réparties en segments répétés, deux thoraciques et huit abdominaux dont l'organisation est stéréotypée et reproductible d'un héli-segment à l'autre. En partie antérieure se situe l'aorte qui est rétrécie et en postérieur, le cœur présentant une lumière plus large (**Figure 13**).

Chez la drosophile, la spécification du mésoderme cardiaque commence dès le stade 10, où les signaux Decapentaplegic (Dpp/BMP, voie du TGF $\beta$ ) et Wingless (Wg/WNT, voie WNT) provenant de l'ectoderme, permettent la spécification des précurseurs des deux types cellulaires qui composeront le cœur, les cardioblastes (CB) et les cellules péricardiaques (CP) et une partie des muscles dorsaux (Bryantsev et Cripps, 2009) (**Figures 14**). Tout d'abord, Dpp maintient l'expression dans le mésoderme cardiaque de *Tin*, l'un des facteurs d'identité essentiel pour la spécification cardiaque chez la drosophile et les vertébrés alors que l'expression combinée de Dpp et Wg active l'expression d'un autre FT, dorsocross



**Figure 15. Les différentes populations de cardiomyocytes et de cellules péricardiaques chez l'embryon de drosophile.**

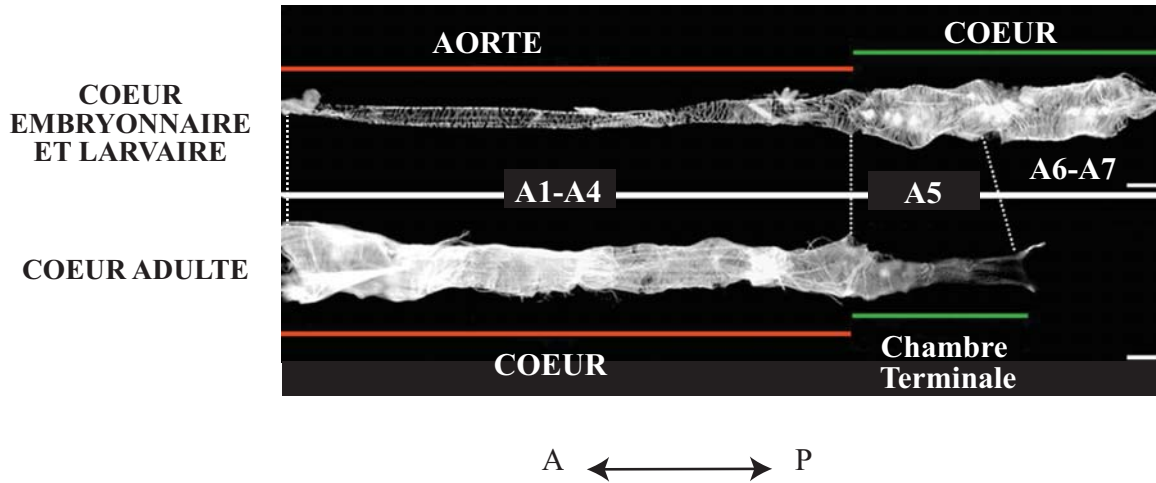
A. La spécification des cellules cardiaques, cardioblastes (CBs) et péricardiaques (PCs) se fait grâce aux signaux ectodermiques Hh, Dpp et Wg, et au signal mésodermique Twi. L'activation de Tin, Doc et Svp permet la différenciation de 4 populations de cellules : 3 populations de cardiomyocytes (CMs) et 5 populations de PCs. B. Tin est exprimé dans 4 CBs parmi les 6 qui composent un héli-segment et deviendront les cellules contractiles, les CMs. Les deux autres CB Tin négatif, expriment Seven-up (svp/CoupTFII ou NR2F2) qui réprime lui-même Tin, ces CBs Svp<sup>+</sup> formeront les ostioles. Trois populations de CM co-existent dans le cœur : les 2 CMs antérieurs expriment uniquement Tin (rouge), 2 CMs co-expriment Tin et Ladybird (lb) (orange) et les 2 CMs les plus postérieurs expriment uniquement svp (vert). Les PCs, non contractiles forment une couche de cellules qui entourent les CMs : elles expriment toutes le FT zfh-1 (non représenté) nécessaire à leur différenciation en 5 populations différentes selon qu'elles expriment les FT tin uniquement (rouge), tin et eve (marron), tin et lb (orange), odd-skipped (odd) uniquement (bleu) ou odd et svp (violet).

(Doc/TBX6). Tin et Doc vont à leur tour activer l'expression de *pnr* (Bodmer et Venkatesh, 1998). Dès le stade 11, l'expression de ces trois facteurs d'identité, Tin, Doc et Pnr permet la spécification des CB qui vont ensuite s'aligner au stade 12 sur deux rangées opposées et migrer en direction de la ligne dorsale pour finir par fusionner au stade 16 à la façon d'une « fermeture éclair » et former le tube cardiaque embryonnaire qui devient fonctionnel : il bat et permet la circulation de l'hémolymphe, l'équivalent du sang chez l'Homme (Zaffran *et al.*, 1995). De plus, contrairement à l'Homme, il est situé en position dorsale mais ceci peut s'expliquer par l'inversion complète du corps de la drosophile et des insectes en général, par rapport à celui des vertébrés (Bodmer, 1995).

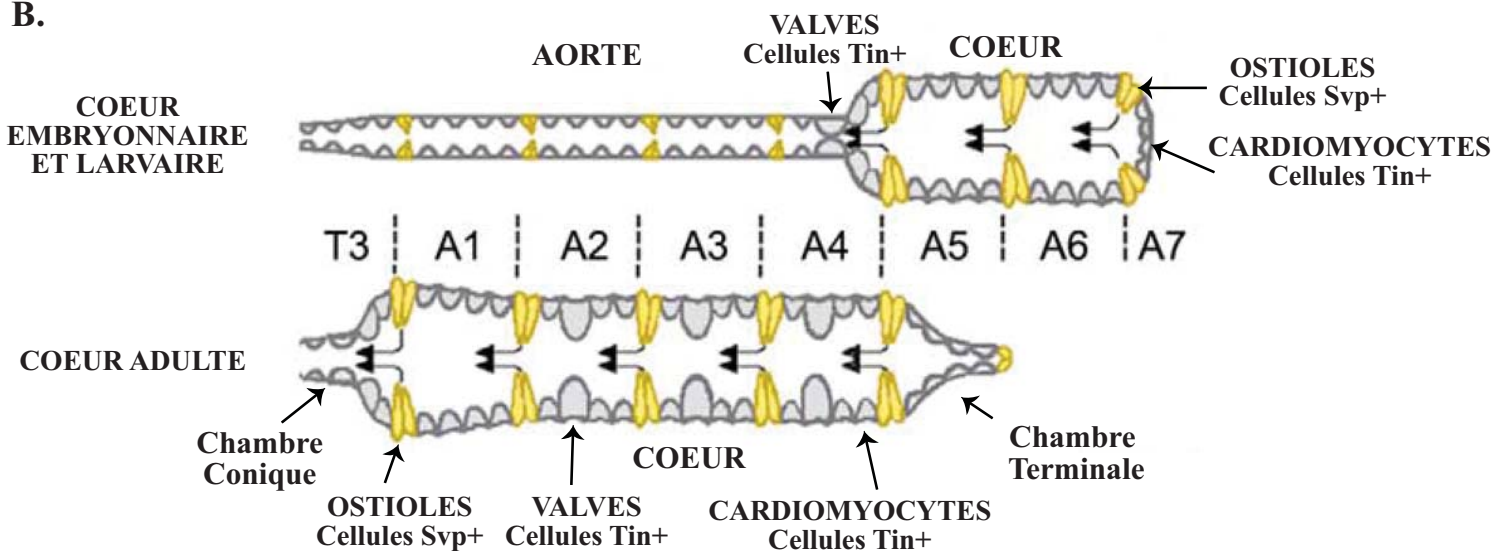
La différenciation des deux types cellulaires qui composent le cœur met en jeu divers facteurs d'identité (FI). Tout d'abord, les cardioblastes forment une rangée de cellules au contact de la lumière du tube, qui se différencieront en cellules contractiles, les cardiomyocytes et en ostioles, ces cellules contenant des ouvertures qui permettent l'entrée dans le tube cardiaque de l'hémolymphe. Leur différenciation met en jeu le FI Tin, exprimé dans 4 CB parmi les 6 qui composent un héli-segment et active l'expression de *pnr*, *Myocyte enhancer factor-2 (Mef2)* et de la  $\beta$ 3-tubuline. Ces cellules deviendront les cellules contractiles, les cardiomyocytes (CM). Les deux autres CB Tin négatif qui formeront les ostioles, expriment Seven-up (Svp/CouprTFII ou NR2F2) qui réprime lui-même Tin (Molina and Cripps, 2001). Finalement, trois populations de CM co-existent dans le cœur : les 2 CMs antérieurs expriment uniquement Tin, 2 CMs co-expriment Tin et Ladybird (Lb) et les 2 CMs les plus postérieurs expriment Svp et Doc (**Figure 15**).

Ensuite, les cellules péricardiaques qui sont non contractiles et apparentées aux néphrocytes chez l'Homme, forment une couche de cellules qui entourent les cardiomyocytes et ont pour fonction principale la filtration. En effet, ces cellules placées au contact direct des ostioles filtrent l'hémolymphe avant son entrée dans le cœur (Zhang *et al.*, 2013). Elles expriment toutes le FT *Zfh-1* nécessaire à leur différenciation en 5 populations différentes selon qu'elles expriment les FT i) Tin uniquement, ii) Tin et Lb ou iii) Tin et Eve, iv) Odd-skipped (Odd) uniquement et v) Odd et Svp (Lai *et al.*, 1991; Jagla *et al.*, 1997; Ward et Skeath, 2000) (**Figure 15**).

A.



B.



**Figure 16. Morphologie du coeur de drosophile aux différents stades de développement.**

A. Le coeur de drosophile embryonnaire et larvaire est organisé en deux parties distinctes, l'aorte en antérieur (segments A1-A4) et le coeur à proprement parler (segments A5-A7) avec une lumière interne plus large. Ces deux structures sont séparées par une paire de valves (cellules grises, grosses). Le coeur adulte présente une morphologie différente : il est plus court (segments A1-A5) et composé en antérieur d'une chambre conique (segment T3 non représenté), du coeur des segments A1 à A4 et refermé en A5 par la chambre terminale. B. Deux types cellulaires composent le coeur aux stades embryonnaire et larvaire: les cardiomyocytes  $Tin^+$  (en gris) et les ostioles  $Svp^+$  (en jaune). Chez l'adulte, il est formé de trois types de cellules : les cellules contractiles ou cardiomyocytes (grises, petites), trois paires de valves (grises, grosses cellules) et cinq paires d'ostioles (en jaune) qui permettent l'entrée de l'hémolymphe dans le tube cardiaque. *Adapté d'après Monier et al., 2005.*

- Formation du cœur adulte

Le cœur formé durant l'embryogenèse présente donc une différence morphologique entre la région antérieure assez resserrée, l'aorte et la région postérieure plus large appelée le « cœur propre ». Cette diversité antéro-postérieure est contrôlée par l'expression des gènes homéotiques (HOX) des complexes Bithorax et Antennapedia, et est conservée durant les stades larvaires où le cœur ne subit que des événements de croissance. En effet, il va s'allonger durant les stades larvaires pour suivre la croissance générale de la larve dont la taille est multipliée par 7 environ entre la fin de l'embryogenèse et le troisième stade larvaire.

Au stade pupal, la métamorphose entraîne un remodelage de nombreux organes, y compris le cœur. Environ 27 à 30 heures après la formation de la puppe (AFP), le cœur s'arrête de battre puis dès 30 heures AFP, les segments postérieurs du cœur larvaire (A5 à A7) commencent à être histolysés par mort cellulaire programmée. Le futur cœur adulte se forme à partir des segments non histolysés : i) une chambre conique se forme au niveau des segments A1 et A2, ii) une couche de cellules musculaires striées, appelées ultérieurement fibres longitudinales, se forme à la surface ventrale du cœur, iii) quatre paires de nouvelles ostioles sont formées à partir des cellules svp-positives de l'aorte larvaire ainsi que trois paires de cellules de type valve et enfin iv) le segment A5 est remodelé pour former la chambre terminale, innervée mais non contractile (Curtis *et al.*, 1999; Monier *et al.*, 2005; Zeitouni *et al.*, 2007; Shah *et al.*, 2011; Rotstein et Paululat, 2016).

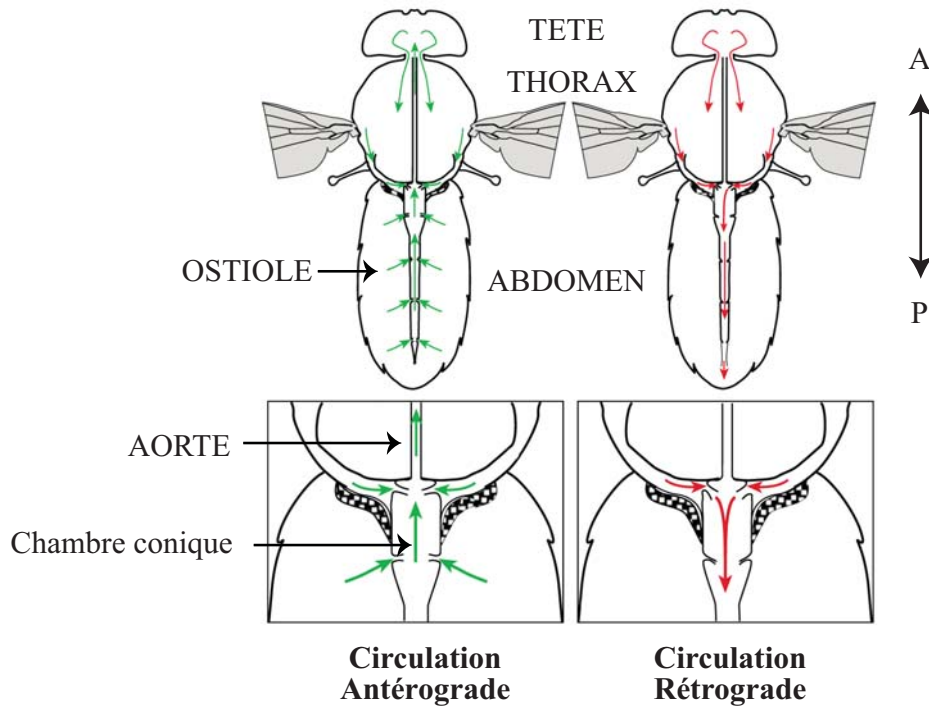
A la fin du stade pupal, le cœur adulte est formé de la chambre conique qui s'étend sur les trois segments thoraciques et du « cœur propre » localisé sur les cinq segments abdominaux. Malgré une morphologie distincte de l'Homme, ce tube est tout de même divisé en quatre chambres par trois paires de valves qui expriment le FT Tin et qui permettent de diriger l'hémolymphe de la chambre cardiaque en postérieur, ou se situe le nœud majoritaire de cellules pacemaker (permettant d'initier les battements cardiaques), vers l'aorte en antérieur. De plus, les ostioles permettent l'entrée de l'hémolymphe entre chaque segment abdominal (Monier *et al.*, 2005; Zeitouni *et al.*, 2007).

La morphologie du cœur de drosophile aux différents stades de développement est représentée dans la **Figure 16**.

La drosophile présente donc une structure cardiaque adulte simple, sous forme de tube constitué d'un seul type cellulaire, les cardiomyocytes contrairement à l'Homme qui possède un cœur plus complexe et compartimenté, composé de deux types cellulaires, le myocarde et



A.



B.

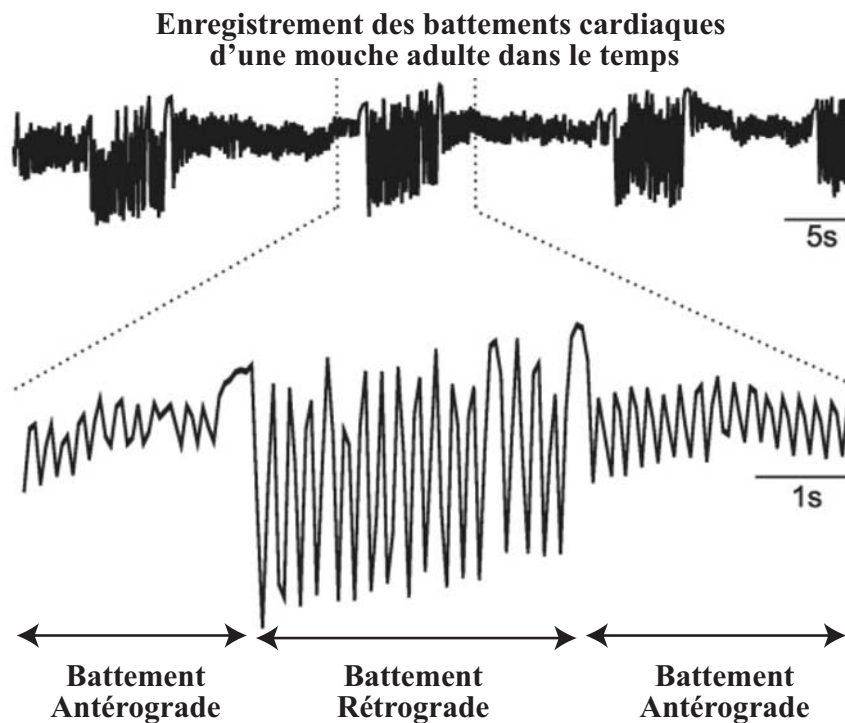


Figure 17. Les cellules Pacemaker du coeur de drosophile et circulation de l'hémolymphe.

A. Les cellules pacemaker dominantes sont localisées en postérieure et permettent une circulation antérograde (vers la tête) de l'hémolymphe (vert) mais des cellules pacemaker situées en antérieure entraînent aussi une circulation rétrograde (vers l'abdomen) de l'hémolymphe (rouge). B. L'enregistrement optique des battements cardiaques de la drosophile adulte permettent d'identifier deux types de battements : antérograde (vers l'aorte), battement majoritairement observé et rétrograde (vers le bas de l'abdomen). Adapté d'après Wasserthal et al., 2007 (A) et Dulcis et al., 2005 (B).

l'endocarde. Cependant, des similarités de structure existent : les cellules formant les parois du tube cardiaque sont striées et mononucléées et possèdent une activité contractile autonome et automatique (Medioni *et al.*, 2009).

### **c. Conservation de la fonction cardiaque**

D'un point de vue physiologique, le cœur est une pompe myogénique qui permet la circulation du sang vers les organes, fonction conservée chez la drosophile.

Deux différences majeures existent entre le cœur de drosophile et l'Homme, ou les vertébrés en général : la drosophile possède un système cardiovasculaire « ouvert », où l'hémolymphe est pompée par le cœur, envoyée dans toute le corps et baigne les organes alors que l'Homme possède un système « fermé » où les échanges se font via les vaisseaux et capillaires. Le sang contenu dans les vaisseaux, entraîne une pression élevée chez l'Homme permettant des échanges métaboliques rapides alors que chez la drosophile, système à faible pression, l'énergie demandée est plus faible mais ne permet pas une réponse métabolique rapide (Rotstein et Paululat, 2016). La deuxième différence, et sûrement la plus importante, est la séparation chez la drosophile, contrairement à l'Homme des systèmes d'apport d'oxygène et de sang. En effet, le sang humain permet l'apport aux organes d'oxygène et de nutriments tout en les débarrassant des déchets alors que la drosophile possède un système d'apport de nutriments, de molécules immunitaires et de dépollution via l'hémolymphe et un système d'apport d'oxygène différent via les trachées (Ghabrial *et al.*, 2003). Ceci est l'avantage majeur de la drosophile qui fait que la plupart des mutations affectant le cœur et donc létales dans d'autres modèles peuvent être étudiées chez la drosophile (Wolf et Rockman, 2011).

D'un point de vue fonctionnel, il existe des similarités entre les deux espèces. En particulier, les battements du cœur chez la mouche comprenant une contraction (systole) et une dilatation (diastole), sont générés par des cellules ayant une activité contractile autonome, les cellules pacemaker, tout comme chez les mammifères. Alternativement, la contraction peut être antérograde, générée par le nœud majoritaire de cellules pacemaker ; ou bien rétrograde grâce à la présence d'un second groupe de cellules situé en antérieur, probablement dans la chambre conique (Dulcis et Levine, 2003; Wasserthal *et al.*, 2007) (**Figure 17**). Ces différences de direction de la circulation de l'hémolymphe sont contrôlées par l'innervation du cœur. En effet, contrairement au cœur larvaire exclusivement myogénique, le cœur adulte reçoit une innervation par le système nerveux périphérique, qui est symétrique de chaque côté du cœur. La partie abdominale du cœur est innervée par les nerfs transverses,





glutamatergiques et par les neurones bipolaires périphériques (BpN), sensibles au peptide CCAP (Crustacean CardioActive Peptide), un accélérateur des battements cardiaques. En résumé, la circulation antérograde serait initiée par les neurones glutamatergiques et régulée par les neurones CCAP (Dulcis et Levine, 2003; Dulcis *et al.*, 2005).

La conservation entre les deux espèces du développement cardiaque a conduit les chercheurs à développer des techniques pour étudier la physiologie cardiaque chez la drosophile. Les premières approches pour mesurer les battements du cœur et son rythme, ont été développées à la fin des années 1990, utilisant des systèmes optiques qui mesurent les changements d'intensité de la lumière entre la contraction et la relaxation (Gu et Singh, 1995). Ces premières techniques ont permis de réaliser des mesures des battements chez la drosophile, équivalentes à un électrocardiogramme (ECG), et de mettre en évidence les premiers acteurs responsables du rythme cardiaque comme la dynamine (Johnson *et al.*, 2001) ou le canal potassique ORK1 (Lalevée *et al.*, 2006). En 2007, l'équipe de Rolf Bodmer a mis en place l'approche SOHA (Semi-automated Optical Heartbeat Analysis) qui permet de mesurer les paramètres rythmiques et contractiles de la drosophile en filmant une préparation de cœur semi-intacte (Ocorr *et al.*, 2007; Fink *et al.*, 2009). Cette technique reste aujourd'hui la plus utilisée pour l'analyse des paramètres cardiaques chez la drosophile. Cependant, une approche plus récente applique l'optogénétique pour visualiser la structure et la fonction du cœur *in vivo* et de manière non invasive, permettant des analyses longitudinales chez la drosophile. Brièvement, l'expression cœur-spécifique du canal cationique dépendant à la lumière Channelrhodopsin-2 (Chr2), couplée à une stimulation optique à différentes fréquences permet l'activation de ce canal. Un système de microscopie optique permet d'enregistrer les battements du cœur en réponse à cette stimulation et d'identifier des anomalies, comme de l'arythmie (Alex *et al.*, 2015; Taghli-Lamalle *et al.*, 2016).

Ces méthodes ont été employées pour l'étude de modèles de cardiomyopathies ou de canalopathies (maladies liées aux canaux ioniques) afin de décortiquer leur fonction précise dans la physiologie cardiaque (Taghli-Lamalle *et al.*, 2016). De plus, la conservation du métabolisme des sucres et des lipides entre les deux espèces a permis de modéliser l'effet d'un régime riche en sucre ou en gras sur le cœur. Ces études ont notamment mis en évidence un effet délétère d'un régime riche en gras sur le cœur, comme ce qui est connu chez l'Homme, effet qui impliquerait la voie Insuline/TOR (Birse *et al.*, 2010). De plus, un régime riche en sucre provoque une résistance à l'insuline, mimant le diabète de type II et cause une augmentation d'arythmie associée à une diminution de l'espérance de vie (Na *et al.*, 2013).



Enfin, comme chez l'Homme, le cœur de la drosophile est soumis au vieillissement, ce qui provoque une altération du métabolisme cardiaque, notamment des voies Insuline et TOR (Wessells *et al.*, 2004). De plus, le stress oxydant jouerait un rôle dans le vieillissement. En effet, les mouches âgées montrent une diminution d'expression des voies de respiration cellulaire et du métabolisme mitochondrial alors que les gènes impliqués dans le stress oxydant sont plus exprimés que chez les mouches jeunes (Monnier *et al.*, 2012). Enfin, ces travaux ont montré l'effet bénéfique potentiel d'un traitement anti-oxydant pour diminuer les effets du vieillissement sur la physiologie cardiaque chez la drosophile.

---

En résumé, cette première partie a permis d'illustrer la conservation du développement musculaire et cardiaque entre la drosophile et les vertébrés et leur fonctionnement similaire, justifiant son utilisation comme modèle pour l'étude d'une pathologie humaine affectant les muscles et le cœur :

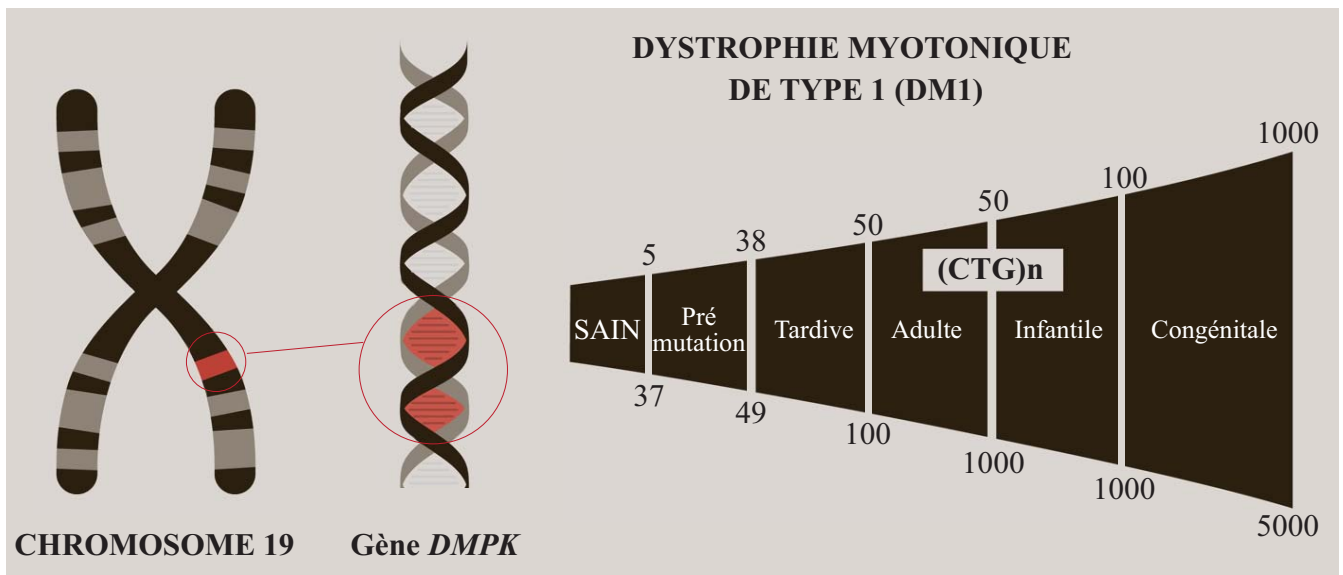
- La drosophile présente un fort pourcentage de gènes conservés avec l'Homme, impliqués dans des maladies humaines ;

- Le développement musculaire met en jeu des étapes et des acteurs moléculaires très bien conservés avec les vertébrés, principalement lors de la spécification du mésoderme ou pour les étapes précoces de la myogenèse comme la fusion, impliquant des facteurs de transcription similaires ;

- Le développement et la physiologie cardiaque présentent de nombreuses similarités dans les deux espèces et les nombreuses méthodes disponibles chez la drosophile en font un bon modèle pour l'étude du fonctionnement normal et pathologique du cœur.

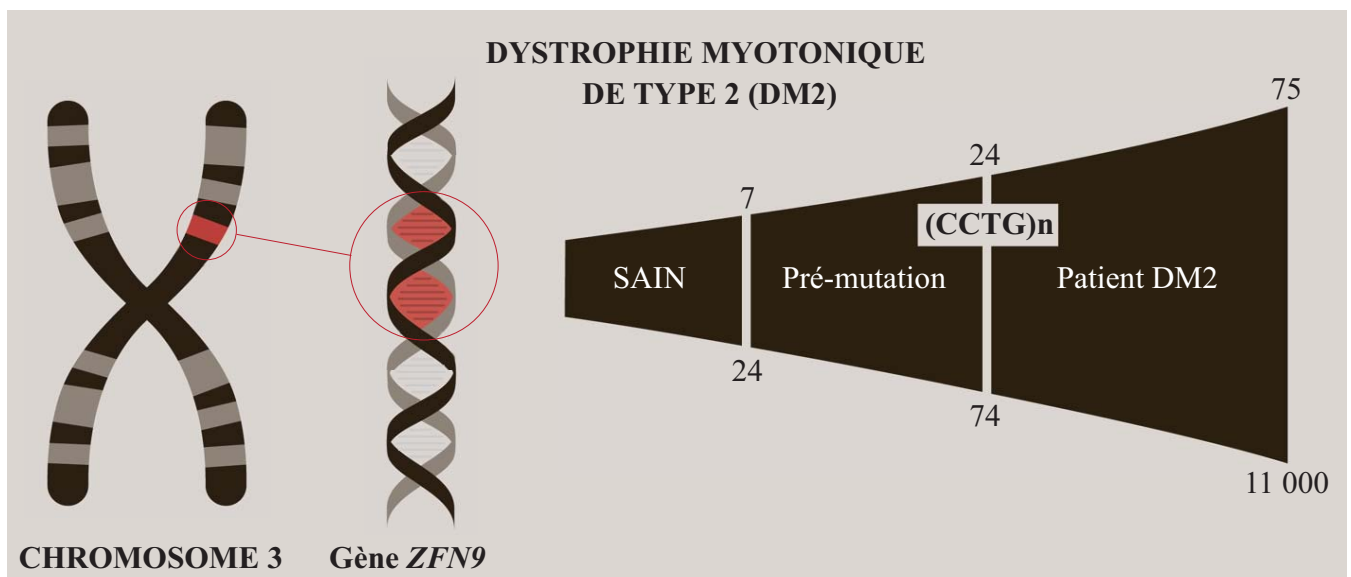
Cette conservation nous a encouragé à utiliser la drosophile comme modèle d'étude de la dystrophie myotonique de type 1.

---



**Figure 18. Mutation en cause dans la Dystrophie myotonique de type 1 (DM1).**

La DM1 est causée par une mutation dans la région 3'NT du gène *DMPK*, situé sur le chromosome 19 dans la région q13.3 chez l'Homme. Le nombre normal de CTG chez un individu sain est compris entre 5 et 37 répétitions et l'expansion devient pathologique au-delà de 37 répétitions. Le nombre de CTG est corrélé avec la sévérité et l'âge d'apparition des symptômes et il existe 4 formes de DM1 : tardive (50-100), adulte ou classique (50-1000), infantile (100-1000) ou congénitale (>100). *Adapté d'après myogemhealth.com.*



**Figure 19. Mutation en cause dans la Dystrophie myotonique de type 2 (DM2).**

La DM2 est causée par une mutation dans l'intron 1 du gène *ZNF9*, situé sur le chromosome 3 chez l'Homme, dans la région q21. Entre 7 et 24 répétitions CCTG, l'expansion est normale. Au-delà de 24 répétitions et en dessous de 74 CCTG, une pré-mutation est présente et peut entraîner l'instabilité de la mutation. Généralement, les symptômes associés à la DM2 se présentent au-delà de 75 répétitions, qui peuvent atteindre jusqu'à 11 000 CCTG. *Adapté d'après myogemhealth.com.*

## II. La dystrophie myotonique (DM)

### 1. Généralités sur la DM : DM1 et DM2

La maladie de Steinert ou dystrophie myotonique (DM) est une maladie génétique rare, identifiée par le Dr Hans Steinert en 1909 comme « une dystrophie musculaire causant une faiblesse musculaire progressive associée à un retard de relaxation du muscle après une contraction, ou myotonie » (Steinert, 1909; Steinberg et Wagner, 2008).

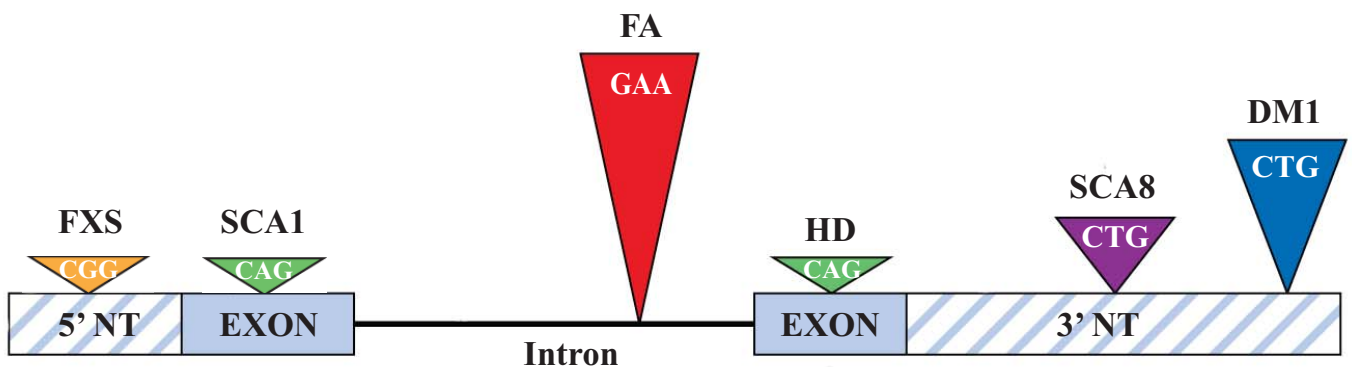
La mutation à l'origine de la forme la plus sévère, la dystrophie myotonique de type 1 (DM1, OMIM #160900) fut identifiée en 1992 sur le chromosome 19 (locus q13.3) comme une expansion de répétitions CTG dans la région 3' non traduite (NT) du gène *DMPK* (*Dystrophia Myotonica Protein Kinase*) codant pour une protéine kinase exprimée dans tout l'organisme (Aslanidis, 1992; Buxton *et al.*, 1992; Brook *et al.*, 1992; Harley *et al.*, 1993) (**Figure 18**). La fonction de DMPK sera abordée dans le [paragraphe 6a](#).

Le nombre de répétitions sur le gène *DMPK* est polymorphique, c'est-à-dire qu'il peut varier d'un individu et d'un allèle à l'autre sans être délétère. Alors que la population générale présente entre 5 et 37 triplets CTG en 3'NT du gène *DMPK*, les patients DM1 présentent en général plus de 50 CTG, qui constitue le seuil pathologique, et jusqu'à plusieurs milliers pour les formes les plus sévères (M. Mahadevan *et al.*, 1992; Harley, 1993).

La mutation causant la seconde forme de DM, la dystrophie myotonique de type 2 (DM2, OMIM #602668) ou myopathie myotonique proximale (PROMM) a été décrite 6 ans plus tard comme une expansion CCTG dans le premier intron du gène *ZNF9* (*Zinc Finger Protein 9*), aussi appelé CNBP (*CCHC-Type Zinc Finger Nucleic Acid Binding Protein*) sur le chromosome 3 (région q21) chez des patients ayant des symptômes moins sévères et dont l'expansion CTG dans le gène *DMPK* n'a pas pu être identifiée (L. P. Ranum *et al.*, 1998; Liquori *et al.*, 2001). Cette expansion varie de 75 à 11 000 tétranucléotides CCTG (J. W. Day *et al.*, 2003) (**Figure 19**).

Ces deux formes de DM, à transmission dominante, mettent en jeu un mécanisme « gain de fonction » de l'ARN toxique et sont caractérisées par l'instabilité des répétitions CTG (DM1) ou CCTG (DM2) (Aslanidis *et al.*, 1992; Ranum *et al.*, 1998; Schara et Schoser, 2006; Machuca-Tzili *et al.*, 2005).

Les mécanismes d'instabilité seront détaillés dans le [paragraphe 5](#) et le mécanisme « gain de fonction » de l'ARN dans la DM1 sera expliqué dans le [paragraphe 6](#).



**Figure 20. Maladies à triplets.**

La DM1 fait partie des maladies à triplets ou à expansion tri-nucléotidiques dont la mutation se situe dans la région 3' NT du gène *DMPK*, tout comme pour l'ataxie spino-cérébelleuse de type 9 (SCA8). D'autres maladies à triplets présentent une mutation dans les régions codantes (Huntington, HD ou l'ataxie spino-cérébelleuse de type 1, SCA1) ou dans les régions introniques (Ataxie de Friedreich, FA) mais aussi dans la région 5'NT (Syndrome de l'X fragile, FXS). *Adapté d'après Ranum et Cooper, 2006.*

Prévalence	DM1 (Pour 100 000 personnes)	DM2 (Pour 100 000 personnes)
Données Globales	0,5 - 18	1 - 9
Etudes récentes (ORPHANET)	12,5 (soit 1/8000)	1 (données Europe)
Zone effet fondateur	QUEBEC : 182 (soit 1/550)	ALLEMAGNE : N/A

**Tableau 4. Prévalence de la DM1 et DM2.**

La DM1 affecterait environ 1 personne sur 8000 dans le monde (soit 12,5 personnes sur 100 000) mais sa prévalence varie selon les régions géographiques. Par exemple, au Canada où existe un effet fondateur, la DM1 touche environ 1 personne sur 550. La prévalence de la DM2 est très mal connue : elle est estimée à 1 personne sur 100 000 en Europe mais serait au moins aussi présente que la DM1 selon les dernières études. *N/A* (not available) : pas de donnée disponible.

## **2. Autres maladies à répétitions**

La DM1 fait partie des maladies à répétitions tri-nucléotidiques aussi appelées « maladies à triplets ». Ces expansions peuvent être situées dans les parties codantes ou non codantes des gènes (Cummings et Zoghbi, 2000) : les premières comprennent la DM1, le syndrome de l’X fragile ou l’ataxie de Friedreich alors que les secondes, aussi appelés maladies à expansion de polyglutamines, sont majoritairement représentées par la maladie de Huntington ou par les ataxies spino-cérébelleuses (Cummings, 2000) (**Figure 20**).

Les mécanismes moléculaires impliqués sont différents : les expansions dans les régions non codantes, comme pour la DM1, vont entraîner une absence de production de la protéine et un mécanisme gain de fonction de l’ARNm toxique. Les répétitions dans les parties codantes des gènes, comme pour les répétitions CAG dans la maladie de Huntington, sont traduites et causent des inclusions protéiques toxiques pour la cellule, et notamment pour les neurones. Cette toxicité peut affecter la transcription, induire une réponse au stress et bien sûr entraîne l’altération de la fonction normale de la protéine dont la séquence codante est mutée (Fan *et al.*, 2014; Shao et Diamond, 2007).

L’étude récente (années 1990) des mécanismes moléculaires en cause dans les maladies à expansion a permis de mieux comprendre le phénomène d’instabilité des répétitions (McMurray, 2010), développé en détails dans le [paragraphe 5](#).

## **3. Prévalence de la DM**

La DM1, dystrophie musculaire la plus présente chez les adultes, se transmet selon le mode autosomique dominant (Harper *et al.*, 1992). La prévalence précise de la maladie est difficile à évaluer. Généralement présentée dans la littérature comme affectant 1 personne sur 8000 dans le monde, elle serait estimée plus largement à 0,5-18 personnes pour 100 000 individus (Theadom *et al.*, 2014). En 2016, le portail de référence des maladies rares (orphanet) recense une prévalence de 12,5 cas pour 100 000 personnes soit 1 personne sur 8000 (Les Cahiers d’Orphanet, Mars 2016).

Cependant, certaines zones géographiques comme la province du Lac Saguenay (Québec, Canada) ont une prévalence d’environ 1 personne sur 550, due à un effet fondateur (Mathieu *et al.*, 1990; Yotova *et al.*, 2005) (**Tableau 4**). En effet, les 6 millions de personnes qui peuplent la région du Québec aujourd’hui auraient pour ancêtres des immigrants français venus s’installer dans la province du Saguenay/Lac-St-Jean au 17<sup>ème</sup> siècle. Cet effet



Nombre de répétitions CTG en 3'NT du gène <i>DMPK</i>	Formes de la maladie	Age d'apparition des symptômes	Symptômes associés
5 - 37	Individu sain	/	Aucun symptôme
37 - 49	Présence d'une pré-mutation		
50 -100	Forme tardive	20-70 ans	Cataracte, déficit musculaire minime
50 -1000	Forme classique	10-30 ans	Cataracte, myotonie, perte/faiblesse musculaire, détresse respiratoire, résistance à l'insuline, défauts de conduction cardiaque
100 - 1000	Forme infantile	1-10 ans	Déficit musculaire facial, myotonie, troubles cognitifs et psychiatriques
> 1000	Forme congénitale	Naissance	Hypotonie de la face, détresse respiratoire, retard mental et moteur

**Tableau 5. Différentes formes de la DM1 et symptômes majeurs associés.**

Le nombre de répétitions CTG dans la région 3'NT du gène *DMPK* est corrélé à la sévérité et l'âge d'apparition des symptômes. Cette sévérité se caractérise donc par la présence de différentes formes cliniques de la maladie. La forme classique est la plus commune et la forme congénitale la plus sévère. Ce tableau récapitule la corrélation entre le nombre de CTG, la forme de la maladie et les symptômes associés.

fondateur, couplé à une forte fécondité, a créé une forte homogénéité génétique dans cette population (CORAMH, 2016).

Concernant la DM2, aucune donnée de prévalence fiable n'est à ce jour connue mais elle était jusqu'à peu, établie comme plus rare que la DM1. Cependant, une étude clinique dans la population finlandaise estimerait la prévalence de la DM2 à 1 personne sur 10 000 (Suominen *et al.*, 2011) (**Tableau 4**). Comme pour la DM1, un effet fondateur a été identifié, en Europe (J. W. Day *et al.*, 1999; Bachinski *et al.*, 2003).

#### **4. Formes cliniques de la DM1 et symptômes associés**

Les deux formes de DM présentent de nombreuses similarités concernant le mécanisme pathogénique (expansion de répétitions dans une partie non codante, maladie liée à l'épissage touchant tous les systèmes) mais la DM2 est à ce jour moins bien caractérisée. De plus, ce travail de thèse concerne la description d'un modèle de drosophile de la DM1 donc les paragraphes suivants cibleront la pathogenèse de la DM1.

Pour information, les particularités de la DM2 sont très bien décrites dans les revues suivantes (Ashizawa et Sarkar, 2011; Ulane *et al.*, 2014; Guo et Lam, 2015; Valaperta *et al.*, 2015; Heatwole *et al.*, 2015).

La forme la plus sévère de DM, la DM1 est elle-même présente sous différentes formes cliniques, corrélées au nombre de répétitions CTG. En effet, la sévérité des symptômes de la maladie est liée à la taille de l'expansion CTG : plus le nombre d'expansions CTG augmente, plus la maladie apparaît précocement et plus les symptômes sont sévères (Meola et Cardani, 2015). Cependant, cette corrélation reste imparfaite et plus fiable pour un nombre de répétitions inférieur à 400 CTG (Hamshere *et al.*, 1999).

Il existe en réalité 4 formes cliniques de la maladie dont les symptômes associés sont récapitulés dans le **Tableau 5** :

**1)** la forme tardive apparaît généralement chez des patients avec 50 à 100 répétitions, entre 20 et 70 ans. Les symptômes observés peuvent être interprétés comme liés au vieillissement avec notamment une cataracte précoce et une atteinte musculaire minime ;

**2)** la forme adulte (ou classique, car la forme la plus fréquente) se développe plus précocement, entre 10 et 30 ans chez des patients présentant 50 à 1000 répétitions ;

**3)** la forme infantile ou juvénile apparaît dans la première décennie et se caractérise par 100 à 1000 CTG ;

Système/Tissu Affecté	Manifestations cliniques
<b>Système oculaire</b>	<b>Cataracte précoce</b> , ptôse palpébrale (chute de la paupière), dégénérescence de la rétine, faiblesse des muscles oculaire
<b>Système nerveux</b>	<b>Retard mental</b> , difficultés d'apprentissage, <b>hypersomnolence diurne</b> , déficit de motivation et d'attention, <b>troubles de l'humeur</b> , anxiété, agressivité, apathie
<b>Système musculaire (muscles squelettiques)</b>	<b>Dystrophie</b> (faiblesse musculaire) des muscles distaux (et proximaux dans les formes sévères), des muscles de la face et du cou, de la langue, <b>myotonie</b> , dégénérescence musculaire
<b>Système gastro-intestinal (muscles lisses en particulier)</b>	<b>Affaiblissement des muscles du système digestif</b> (dysphagie, diarrhées, constipation, reflux gastro-oesophagien, lithiase biliaire)
<b>Système cardiaque</b>	<b>Troubles du rythme</b> (tachyarythmie) <b>et de la conduction</b> (blocs cardiaques), défauts de structure
<b>Système respiratoire</b>	<b>Faiblesse et myotonie des muscles du diaphragme</b> et des muscles respiratoires, déficit de contraction du pharynx
<b>Système endocrinien</b>	<b>Insensibilité à l'Insuline</b> , hypercholestérolémie, hypertriglycémie, hypogonadisme hypergonadotrope (atrophie testiculaire), <b>baisse de la fertilité</b> et ménopause précoce chez la femme
<b>Système immunitaire</b>	Hypogammaglobulinémie (IgG),

**Tableau 6. Symptômes de la DM1 classés en fonction des systèmes affectés.**

La DM1 est une maladie multisystémique qui affecte donc la plupart des tissus et systèmes des patients atteints de la maladie. Les symptômes les plus communs touchent le muscle squelettique (myotonie, faiblesse musculaire), le coeur (défauts de conduction, arythmie), le système respiratoire (première cause de mortalité) et le système nerveux (retard mental pour les formes les plus sévères).

4) la forme congénitale affecte le fœtus, elle est provoquée par plus de 1000 répétitions CTG et entraîne une diminution certaine de l'espérance de vie.

De plus, les personnes qui présentent plus de 37 répétitions CTG mais moins de 50 CTG, dépassant donc le seuil à partir duquel les répétitions deviennent fortement instables, présentent une pré-mutation, qui est à l'origine du mécanisme d'expansion décrit dans le [paragraphe 5](#).

Enfin, la maladie étant à pénétrance incomplète et à expressivité variable, cette catégorisation des formes de la maladie est imparfaite et on peut observer :

i) un patient avec 50 CTG développer une forme adulte ou infantile (symptômes plus invalidants et plus précoces) ;

ii) un patient ayant plus de 100 répétitions développant des symptômes uniquement tardifs de la DM1 (Day et Ranum, 2005; Prior, 2009; Meola et Cardani, 2015).

Concernant les symptômes de la DM1, on parle de maladie multisystémique puisque la quasi-totalité des tissus et organes est affectée dans la mesure où la protéine DMPK est ubiquitaire (Kaliman and Llagostera, 2008). Les symptômes musculaires et cardiaques sont les mieux décrits et étudiés chez les patients. Ils se caractérisent par une faiblesse et perte musculaire, une myotonie pour le muscle squelettique et au niveau cardiaque par des défauts de conduction et d'arythmie qui sont responsables d'une diminution de l'espérance de vie (Wahbi *et al.*, 2012). Le système respiratoire est aussi fortement affecté et représente la première cause de mortalité, souvent causée par une détresse respiratoire due à la faiblesse des muscles du diaphragme (de Die-Smulders *et al.*, 1998; Mathieu *et al.*, 1999). De plus, les systèmes endocrinien (résistance à l'insuline, hypogonadisme hypergonadotrope, hyperparathyroïdie), immunitaire (hypogammaglobulinémie), digestif (dysphagie, constipation, douleurs abdominales et difficultés à la digestion), oculaire (cataracte précoce) et enfin le système nerveux (sommolence, apathie et retard mental dans les formes les plus sévères) sont aussi affectés (Ørngreen *et al.*, 2012; Meola et Cardani, 2015) (**Tableau 6**).

Selon les formes de la maladie, les symptômes sont relativement similaires comme observé dans le tableau 3, mais leur sévérité est augmentée de manière croissante dans les formes infantile et congénitale (DM1c) (Khoshbakht *et al.*, 2014).

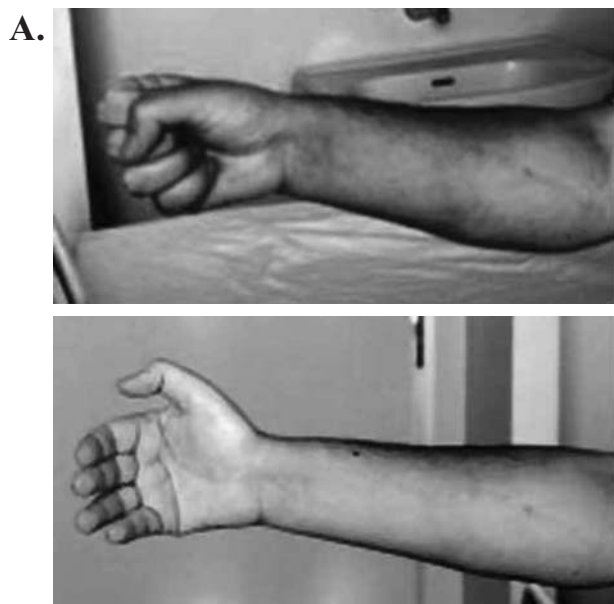
Cependant, la forme congénitale se caractérise par l'existence de symptômes distincts par rapport aux autres formes : ils peuvent être présents dès la gestation comme un hydramnios (accumulation excessive de liquide amniotique). De plus, les enfants atteints de

SCORE MIRS	Caractéristiques de l'atteinte musculaire
1	Aucun trouble musculaire
2	<b>Troubles musculaires minimes</b> : myotonie, faiblesse des muscles de la face et du cou, pas de faiblesse musculaire distale
3	<b>Faiblesse musculaire distale</b> , pas de faiblesse musculaire proximale
4	<b>Faiblesse musculaire distale, faiblesse musculaire proximale légère à modérée</b> : force musculaire réduite (50 à 75% de la force d'un sujet sain de même âge)
5	<b>Faiblesse musculaire distale, faiblesse musculaire proximale sévère</b> : force musculaire réduite (moins de 50% de la force d'un sujet sain de même âge)

**Tableau 7. Signes musculaires associés au score MIRS (Muscle Impairment Rating Scale).**

L'atteinte musculaire des patients DM1 est calculée grâce à un score de 1 à 5 de l'échelle MIRS (« Muscle Impairment Rating Scale ») : 1 correspond à une absence de symptôme musculaire, 2 à une faible myotonie et peu de faiblesse musculaire, 3 à une atteinte musculaire distale, 4 à une atteinte distale et une faible atteinte proximale et 5 correspond à une atteinte distale et proximale sévères.

**Evaluation de la myotonie :  
GRIP TEST**



B.



**Evaluation de la force musculaire :  
DYNAMOMETRE**

**Figure 21. Test de la poignée de main (grip test) pour évaluer la myotonie et dynamomètre pour évaluer la faiblesse musculaire.**

A. Le test de la poignée de main (ou grip test) permet d'évaluer la myotonie en mesurant le temps nécessaire pour retrouver un état de relaxation complète après une contraction volontaire de type poignée de main. B. Le dynamomètre permet de mesurer la force maximale d'un patient et donc d'évaluer la faiblesse musculaire des patients DM1 (ici dynamomètre breveté pour la force du poignée). *D'après Nigro et al., 2012 (A) et <http://www.institut-myologie.org> (B).*

DM1c présentent un retard mental, une hypotonie profonde de la face et des membres, des difficultés à se nourrir et une faiblesse respiratoire importante, causant généralement une mortalité précoce (Ekström *et al.*, 2009; Aring *et al.*, 2012; G. Ho *et al.*, 2015).

#### **4. Les symptômes musculaires des patients DM1**

Comme son nom l'indique, la DM1 est une dystrophie, entraînant une dégénérescence musculaire progressive associée à une faiblesse musculaire. De plus, les patients présentent une myotonie, symptôme distinctif de la maladie, caractérisé par une hypercontractibilité et un retard de relaxation des muscles (Bosma et Brodie, 1969). L'atteinte musculaire chez ces patients est calculée grâce à un score de 1 à 5 de l'échelle MIRS (« Muscle Impairment Rating Scale ») : 1 correspond à une absence de symptôme musculaire, 2 à une faible myotonie et peu de faiblesse musculaire, 3 à une atteinte musculaire distale, 4 à une faible atteinte proximale et 5 correspond à une atteinte distale et proximale, atteinte la plus sévère (Andersen *et al.*, 2013) (**Tableau 7**). La myotonie est mesurée par le test de la poignée de main où l'on mesure le temps nécessaire à la relaxation complète après la contraction et la faiblesse musculaire est analysée par le test du dynamomètre (**Figure 21**).

Cette maladie affecte principalement les muscles squelettiques distaux, des bras et des jambes dont les fibres musculaires ont une histologie dystrophique : les fibres musculaires peuvent se diviser (« splitting »), les fibres de type 1 (fibres rapides) en particulier présentent une taille ou un volume plus faible (atrophie) mais généralement, on observe une variabilité de la taille des fibres. De plus, les noyaux musculaires sont généralement centralisés chez les patients DM1 (Tohgi *et al.*, 1994; Pisani *et al.*, 2008; Thornell *et al.*, 2009). Enfin, les biopsies musculaires ont mis en évidence une augmentation de la proportion de cellules satellites dans les muscles distaux de ces patients (Thornell *et al.*, 2009).

L'analyse de myoblastes issus de patients DM1 a montré dans un premier temps que les processus de prolifération, fusion et différenciation de ces fibres musculaires n'étaient pas affectés. Cependant, l'isoforme de myosine lente exprimée normalement dans les fibres de type 1 du muscle adulte, est diminuée chez les patients DM1 avec 750 CTG, ce qui traduirait un défaut de maturation des fibres et pourrait être corrélé avec l'atrophie observée chez ces patients (Furling *et al.*, 2001a). De plus, les myoblastes ou cellules satellites issus de patients DM1c (avec 1000 à 3000 CTG) ont montré des défauts de fusion et une altération de maturation qui seraient aussi responsables de l'atrophie musculaire observée chez les fœtus DM1 (Furling *et al.*, 2001b). Plus récemment, l'étude de myoblastes DM1c a démontré l'altération de la différenciation associée à une diminution d'expression des FT MyoD et

	Troubles de la conduction	Troubles du rythme	Défauts de structure
Symptômes cardiaques des patients DM1 (80%)	Blocs atrioventriculaires tous degrés mais principalement de 1 <sup>er</sup> degré	<b>Auriculaire</b> : tachycardie, flutter et fibrillation  <b>Ventriculaire</b> : tachycardie, fibrillation	Dysfonction systolique  Dysfonction diastolique  Plus rare : insuffisance cardiaque congestive, fibrose, infiltration graisseuse

**Tableau 8. Principales manifestations cardiaques retrouvées chez les patients DM1.**

Les atteintes cardiaques touchent environ 80% des patients DM1 et sont de trois types : i) les défauts de conduction, pouvant causer des blocs cardiaques, ii) les défauts du rythme cardiaque, principalement une tachyarythmie (augmentation du rythme cardiaque) ou encore de la fibrillation (contraction anarchique, rapide et irrégulière du cœur) et enfin iii) des anomalies de structure du cœur.

myogénine, ce qui entraîne une autophagie de ces cellules. Notamment, les voies de signalisation MEK/ERK, impliquées dans la différenciation musculaire sont activées de manière aberrante dans ces myoblastes DM1 (Beffy *et al.*, 2010). L'altération de la différenciation serait associée à l'absence d'induction de la protéine p21, un inhibiteur du cycle cellulaire, ce qui entraîne une incapacité des cellules DM1 à sortir du cycle cellulaire (N. A. Timchenko *et al.*, 2001). Enfin, la perte musculaire observée chez les patients DM1 serait associée à la dérégulation de tous les processus décrits ci-dessus et associés au vieillissement (Mateos-Aierdi *et al.*, 2015).

## **5. Les symptômes cardiaques des patients DM1**

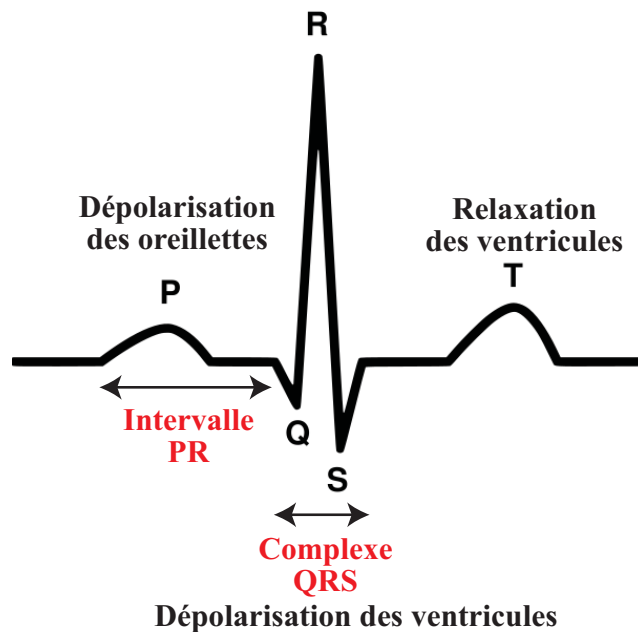
Comme cela a déjà été abordé dans le paragraphe « **Formes cliniques de la DM1 et symptômes associés** », les symptômes cardiaques touchent environ 80% des patients DM1 et représentent la deuxième cause de mortalité (30% des décès) après les symptômes respiratoires.

La mortalité des patients DM1, où l'âge moyen du décès est de 53 ans, est 7 fois plus importante que celle de la population générale (de Die-Smulders *et al.*, 1998; Mathieu *et al.*, 1999). Les décès provoqués par l'atteinte cardiaque sont corrélés avec le nombre de répétitions CTG et sont généralement dus à un bloc de conduction, qui entraîne la mort subite, trois fois plus fréquente chez ces patients (de Die-Smulders *et al.*, 1998; Mathieu *et al.*, 1999; Groh *et al.*, 2008; Stojanovic *et al.*, 2013; Petri *et al.*, 2014).

Généralement, les patients ne présentent pas de symptôme associé à cette atteinte cardiaque et sont diagnostiqués suite à un électrocardiogramme (ECG) de routine, qui mesure l'activité électrique du cœur (Cooper, 1986). Cependant, certains patients se plaignent de palpitations, d'un souffle court et de difficultés à l'effort pouvant entraîner des syncopes (Stojanovic *et al.*, 2013).

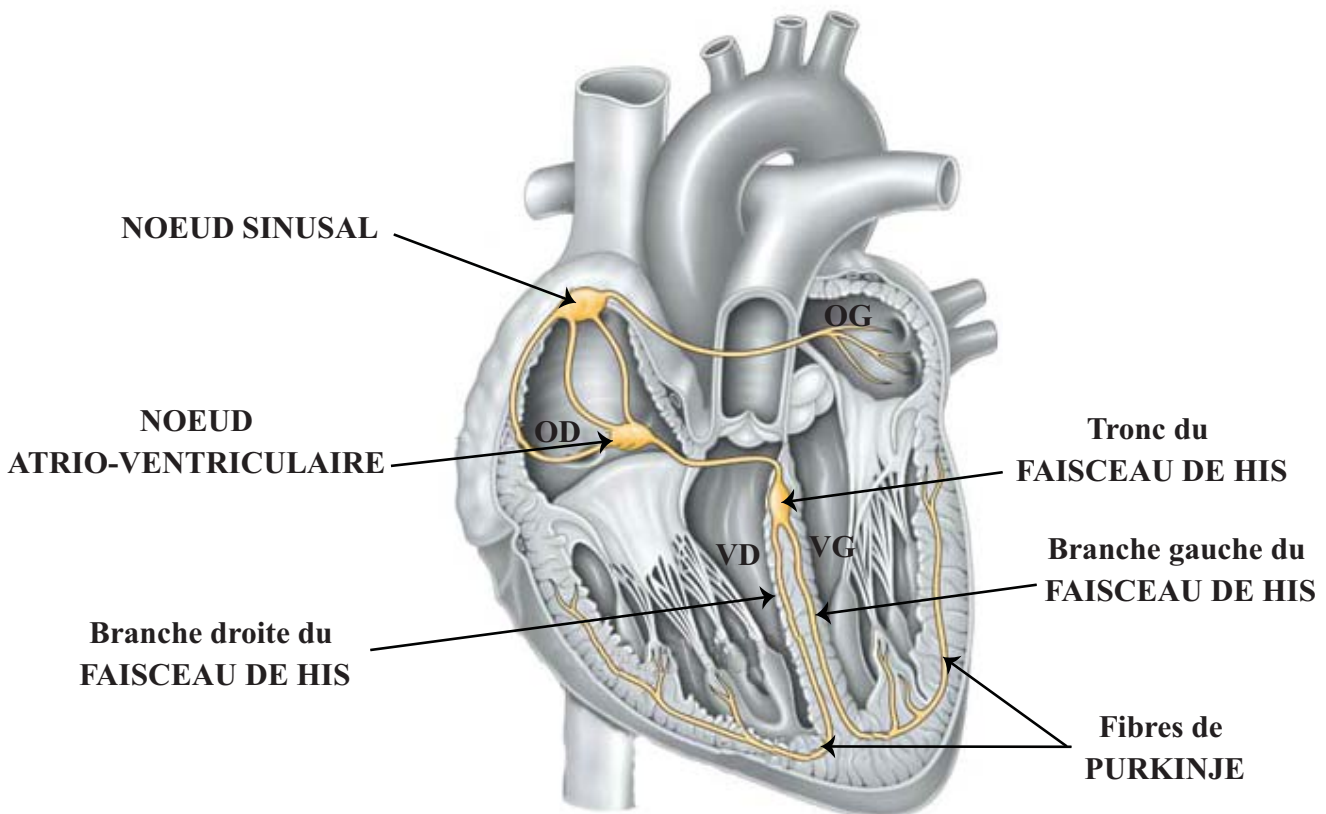
Les principales manifestations cardiaques des patients DM1 (détaillées ci-dessous) (**Tableau 8**), retrouvées dans 50 à 65% des cas selon les études, sont des défauts de conduction, pouvant causer des blocs cardiaques, mais aussi des défauts du rythme cardiaque, et principalement une tachyarythmie (augmentation du rythme cardiaque) ou encore de la fibrillation (contraction anarchique, rapide et irrégulière du cœur) (Bulloch *et al.*, 1967; Nigro *et al.*, 2012). De plus, certains patients présentent des anomalies de structure du cœur, de type fibrose ou un élargissement des diamètres de contraction appelé cardiomyopathie dilatée (Nguyen *et al.*, 1988; Bhakta *et al.*, 2004; Said *et al.*, 2006; Hermans *et al.*, 2012).





**Figure 22. Activité électrique normale du cœur humain et électrocardiogramme (ECG).**

L'électrocardiogramme (ECG) enregistre l'activité électrique du cœur. Chaque cycle est composé de plusieurs ondes qui se succèdent : l'onde P correspond à la dépolarisation (puis la contraction) des oreillettes, le complexe QRS représente la repolarisation des oreillettes accompagnée de la dépolarisation des ventricules (et leur contraction) puis l'onde T correspond à la repolarisation des ventricules. L'intervalle PR permet une estimation du temps nécessaire à la transmission de l'influx électrique des oreillettes aux ventricules. *Adapté d'après eureka.sante.vidal.fr.*



**Figure 23. Les noeuds de conduction cardiaque chez l'Homme : cellules pacemaker.**

Le cœur humain est composé de différents noeuds de cellules ayant une activité de contraction autonome : les cellules pacemaker. Le noeud principal est le noeud sinusal, situé dans l'oreillette droite (OD) et qui permet la circulation de l'influx nerveux dans les deux oreillettes et jusqu'au second noeud de conduction : le noeud atrio-ventriculaire (AV) qui prend le relai entre les oreillettes et les ventricules. Dans les ventricules, le faisceau de His se sépare ensuite en deux branches pour irriguer les ventricules, droit (VD) et gauche (VG). Ensuite, les fibres du réseau de Purkinje permettent la conduction jusque vers les extrémités des ventricules. *Adapté d'après eureka.sante.vidal.fr.*

De nombreuses études cliniques se sont intéressées à l'atteinte cardiaque des patients DM1, afin d'identifier les différents symptômes et de tenter de les prévenir, par traitement médicamenteux ou par implantation de dispositifs comme les pacemakers (stimulateur cardiaque) pour prévenir les arrêts de conduction ou les défibrillateurs intra-cardiaques (DIC) permettant de traiter la diminution du rythme cardiaque mais aussi de réagir en cas de fibrillation (Bhakta *et al.*, 2011). Cependant, certains patients atteints de défauts de conduction sévères, suivis régulièrement et possédant ces dispositifs de « secours », meurent toujours d'arrêt cardiaque non pris en charge par le dispositif de secours. C'est pour cela qu'il est important de mieux comprendre cette atteinte cardiaque et de mettre en évidence les acteurs moléculaires responsables de ces défauts.

### **a. Les défauts de conduction**

- L'activité électrique du cœur et son enregistrement (ECG)

Pour mieux comprendre les défauts de conduction, il faut connaître l'activité électrique normale du cœur et les différents paramètres enregistrés par un ECG lors du fonctionnement d'un cœur sain. L'ECG enregistre les contractions successives des oreillettes puis des ventricules : l'onde P correspond à la dépolarisation des oreillettes (OD et OG) accompagnée de leur contraction, le complexe QRS correspond à la relaxation des oreillettes (dont la repolarisation est invisible sur l'ECG car plus faible que le courant de dépolarisation des ventricules) et la contraction simultanée des ventricules (VD et VG) et enfin l'onde T qui correspond à la relaxation des ventricules (et leur repolarisation). L'intervalle PR, constituant le temps entre la contraction des oreillettes et des ventricules (leur dépolarisation plus exactement), permet donc d'estimer le temps de conduction entre les oreillettes et les ventricules et il doit être inférieur à 0,2 secondes chez un individu sain (Paff *et al.*, 1968) (**Figure 22**).

- Le système de conduction et ses anomalies

Le système de conduction cardiaque est composé de plusieurs nœuds de cellules ayant une activité de dépolarisation et donc de contraction autonome, les cellules pacemaker (**Figure 23**). Ces nœuds de conduction sont : i) le nœud sinusal situé en partie supérieure de l'OD, qui représente le pacemaker « naturel » du cœur, d'ou part l'influx électrique, ii) le nœud atrio-ventriculaire situé au niveau du plancher de l'OD dans le septum atrio-ventriculaire, qui permet le relai de l'influx entre les oreillettes et les ventricules, en le ralentissant pour permettre une éjection du sang efficace entre les oreillettes et les ventricules

Type de bloc cardiaque		Caractéristiques		
SINUSAL ou sino-atrial (BSA)		Atteinte du nœud sinusal, généralement corrélée à une bradycardie		
<b>ATRIO- VENTRICULAIRE (BAV)</b>  - <b>Supra-hissien :</b> nœud AV  - <b>Intra-hissien :</b> Tronc du faisceau de His  - <b>Infra-hissien :</b> Branches du faisceau de His	1 <sup>er</sup> degré		Allongement de l'intervalle PR : PR > 0,2 sec chez l'adulte	
	2 <sup>nd</sup> degré		Retard de conduction entre les oreillettes et les ventricules : <b>onde P irrégulière</b> (toutes les ondes P ne sont pas conduites au ventricule)	
	Type 1 ou type Luciani- Wenkebach	Type 2 ou type Mobitz	Type 1 : <b>allongement progressif de l'espace PR</b> (sur quelques battements) jusqu'à la survenue d'une <b>onde P bloquée</b>	Type 2 : <b>une ou plusieurs ondes P sont bloquées</b> de façon inopinée alors que le <b>PR reste constant</b>
	3 <sup>ème</sup> degré		Interruption complète de la conduction atrio-ventriculaire : <b>absence de l'onde P</b> due à une dissociation complète entre les oreillettes (onde P) et les ventricules (complexe QRS)	

**Tableau 9. Classification des défauts de conduction observés chez l'Homme.**

Les blocs de conduction cardiaque sont classés en fonction de la localisation du bloc : bloc sinusal (BSA, nœud sinusal dans l'OD), bloc atrio-ventriculaire (BSA situé soit dans le nœud AV soit dans le faisceau de His (tronc ou branches). Ces blocs peuvent être de différents degrés dont les caractéristiques sont décrites ci-dessus. Intervalle PR, transmission conduction entre oreillettes et ventricules; onde P, dépolarisation des oreillettes.

avant la contraction des ventricules, iii) le faisceau de His permet donc la transmission aux ventricules en se divisant en deux branches, l'une allant dans le VD (branche droite) et l'autre dans le VG (branche gauche) et enfin, iv) le réseau de Purkinje, constitué de fibres ou ramifications du faisceau de His, qui remontent jusqu'aux extrémités des ventricules pour permettre une dépolarisation complète des ventricules (Christoffels et Moorman, 2009; Monfredi *et al.*, 2010; Vogler *et al.*, 2012).

Ces anomalies de conduction peuvent donc être classées en fonction de leur localisation et de leur degré de sévérité. Ainsi, ils se subdivisent en i) bloc sinusal ou sino-atrial (BSA) corrélé à un ralentissement du cœur (bradychardie), ii) bloc atrio-ventriculaire (BAV) de 1<sup>er</sup> degré (retard de conduction associé à un intervalle du PR > 220 ms), de 2<sup>nd</sup> (défaut du rythme de dépolarisation entre les oreillettes et les ventricules conduisant à une onde P irrégulière) ou 3<sup>ème</sup> degré (absence de l'onde P due à une dissociation complète entre les oreillettes et les ventricules), iii) blocs de branches (BB) (au niveau du faisceau de His) droite (BBD) ou gauche (BBG), complet ou incomplet et entraînant un asynchronisme de contraction de ventricules (Wit *et al.*, 1970; Benson, 2004) (**Tableau 9**).

- **Défauts de conduction des patients DM1**

Les défauts de conduction observés par des anomalies de l'ECG sont présents chez 65% des patients DM1. De plus, les anomalies sévères sont corrélées au risque de mort subite chez ces patients (Groh *et al.*, 2008; Breton et Mathieu, 2009; Petri *et al.*, 2012).

Les troubles plus fréquemment rencontrés sont des BAV de 1<sup>er</sup> degré dans environ 30% des cas, suivis par les BB au niveau des ventricules retrouvés dans 5,7% des études pour le BBG et dans 4,4% pour le BBD (Petri *et al.*, 2012). Ces défauts de conduction étant associés à la mort subite chez ces patients, de nombreuses études ont tenté de mettre en évidence des prédicteurs de la progression de ces troubles : l'âge, le nombre de répétitions CTG, le sexe des patients ainsi que la présence de tachyarythmie ventriculaire influenceraient la rapidité de progression des défauts de conduction (Merino *et al.*, 1998; Nazarian *et al.*, 2011).

## **b. Troubles du rythme cardiaque**

Les troubles du rythme ou arythmie peuvent être dus à un ralentissement (bradycardie) ou à une accélération (tachycardie ou tachyarythmie) des battements du cœur.

Chez les patients DM1, on retrouve essentiellement des tachyarythmies, au niveau des oreillettes dans 25% des cas, et affectant les ventricules (Lazarus *et al.*, 2002; Groh *et al.*,



2008; Cudia *et al.*, 2009). Concernant l'arythmie supra-ventriculaire ou auriculaire, elle serait corrélée avec le risque de morte subite dans une cohorte de plus de 400 patients et peut se présenter sous forme de tachycardie régulière (flutter) ou irrégulière (fibrillation) (Groh *et al.*, 2008). L'arythmie ventriculaire est aussi fréquente et en cause dans la mort subite : elle peut être due à une tachycardie ventriculaire, une fibrillation ventriculaire ou à une tachycardie de la jonction AV par ré-entrée (Merino *et al.*, 1998; Hadian *et al.*, 2002; Pelargonio *et al.*, 2002; Said *et al.*, 2006; Groh *et al.*, 2008).

### **c. Défauts de structure**

Plusieurs études cliniques ont mis en évidence des défauts de structure du cœur en plus des anomalies de conduction et de rythme : environ 20% des patients DM1 développent une cardiomyopathie (Nguyen *et al.*, 1988; Bhakta *et al.*, 2004; Hermans *et al.*, 2012).

Une étude par imagerie cardiaque sur une cohorte de 100 patients DM1 a montré qu'ils peuvent présenter une dysfonction systolique du VG (DSVG) (caractérisée par une fraction d'éjection du VG inférieure à 50%) ou une dysfonction diastolique (DDia) (causée par une augmentation des diamètres de dilatation des oreillettes et ventricules (Bhakta *et al.*, 2004). De plus, 2% présentent une insuffisance cardiaque congestive, pouvant conduire à la mort. Une étude plus récente a analysé le cœur de 80 patients par imagerie CMR (« cardiac magnetic resonance ») confirmant la présence fréquente d'anomalies structurales chez les patients et en particulier de DSVG (Hermans *et al.*, 2012). L'utilisation de cette méthode est donc recommandée à la place de l'ECG classique qui peut sous-estimer l'atteinte structurale. De plus, les auteurs ont montré un lien entre la cardiomyopathie et les défauts de conduction. D'autres anomalies sont rencontrées mais plus rarement, comme l'hypertrophie du VG ou encore de la fibrose non-ischémique (c'est-à-dire qui n'est pas due à un défaut d'apport sanguin), une atrophie ou une infiltration graisseuse du tissu cardiaque (Nguyen *et al.*, 1988; Bhakta *et al.*, 2004; Groh *et al.*, 2008; Hermans *et al.*, 2012).

## **6. Mécanismes d'instabilité des répétitions**

### **a. Instabilité des répétitions tri-nucléotidiques**

Comme pour toutes les maladies causées par l'expansion de microsatellites (répétitions de 1 à 4 nucléotides), la mutation à l'origine de la DM1 est dynamique.

Dans une région ADN contenant un polymorphisme de répétitions : au-delà d'un certain seuil, cette dynamique se traduit par l'expansion anormale des répétitions, ce qui



entraîne une instabilité des répétitions dans les tissus prolifératifs ou non, lors de la mitose et/ou de la méiose donnant lieu à un mosaïcisme du nombre de CTG chez les patients.

L'instabilité des répétitions observée dans la DM1 est très complexe et se traduit par différentes caractéristiques comme un mosaïcisme somatique mais aussi germinale entraînant une anticipation au fil des générations. Cette expansion CTG a tendance à s'amplifier et ceci est dû à la déficience de plusieurs mécanismes moléculaires décrits ci-dessous.

De plus, des études récentes ont caractérisé chez des patients DM1, des variations de séquence de l'expansion CTG constituées d'interruptions CCG, GGC et CTC qui auraient tendance à stabiliser cette expansion (Leefflang et Arnheim, 1995; Braida *et al.*, 2010) ou à entraîner sa contraction (Musova *et al.*, 2009).

### **b. Mosaïcisme germinale**

- **Anticipation**

La corrélation entre le nombre de CTG et la forme de la maladie est associée au mécanisme d'expansion des répétitions qui entraîne l'apparition d'une forme plus sévère pour chaque génération successive. Ce phénomène, appelé anticipation, signifie que la transmission de la mutation est accompagnée dans la plupart des cas d'une expansion CTG. En effet, au-delà de 37 répétitions CTG, l'ADN du gène *dpmk* devient instable et les mécanismes de réparation de l'ADN, supposés prévenir et réparer l'expansion, sont inefficaces et entraînent l'expansion des répétitions lors des étapes de mitose et de méiose.

L'anticipation de la survenue des symptômes de la DM1 a été mise à jour pour la première fois en 1918 par le Dr Fleisher, un ophtalmologiste ayant remarqué l'occurrence de problèmes de cataracte chez des patients dont les descendants présentaient des symptômes dystrophiques au niveau du muscle alors qu'eux-mêmes n'en présentaient pas (Harper *et al.*, 1992). Ce n'est qu'à partir des années 1960 que la DM1 congénitale fut reconnue comme une forme spécifique plus sévère de la DM1, forme qui serait quasi exclusivement transmise par la mère (Dyken et Harper, 1973; Harper, 1975). Notamment, l'équipe du Dr Junien a montré dans une cohorte de 159 couples parents/enfants DM1, que l'expansion apparaît préférentiellement après la méiose maternelle et que l'instabilité des CTG dépend aussi de la taille initiale des CTG. En effet, plus l'expansion CTG est longue, plus elle aura tendance à être transmise en entier par la mère (Lavedan *et al.*, 1993).

Un modèle murin DM1 a permis d'observer *in vivo* l'amplification de l'expansion CTG au fil des générations associée à l'anticipation des symptômes puisque la première



Tissu analysé	Nombre de répétitions CTG observées dans le gène <i>DMPK</i>
Sang	2400
Foie	2650
Utérus	2650
Glandes surrénales	2760
Muscle squelettique (quadriceps)	2800
Cerveau (matière grise)	2810
Cœur	2760-3220

**Tableau 10. Exemple de mosaïcisme somatique retrouvé chez un bébé cDM1.**

Le nombre de répétitions CTG varie d'un tissu à l'autre chez un même individu à un instant donné et au cours de la vie. Ce mosaïcisme somatique est observé grâce à l'ADN extraits de différents tissus après autopsie d'un bébé atteint de la forme DM1 congénitale (cDM1). On observe une différence notamment entre le sang (qui présente généralement moins de répétitions) et les tissus musculaires comme le muscle quadriceps ou le coeur. *D'après Joseph et al., 1997.*

génération contenant environ 350-500 CTG a donné naissance à une descendance ayant près de 1000 CTG (Gomes-Pereira *et al.*, 2007) et enfin plus de 1600 CTG (Huguet *et al.*, 2012). L'aggravation des phénotypes corrélée au nombre de CTG dans ces modèles traduit leur utilité pour l'étude des mécanismes associés à l'anticipation et l'instabilité de l'expansion.

- **Contraction des répétitions**

Ces expansions CTG peuvent aussi se contracter et entraîner une forme moins sévère dans la descendance. Ce phénomène est généralement observé pour 6 à 7% des transmissions mais plus fréquemment lorsque la transmission se fait par le père atteint de la maladie (10% des transmissions) (Ashizawa *et al.*, 1994; Amiel *et al.*, 2001; Puymirat *et al.*, 2009) et serait dû à un mécanisme, déjà démontré dans le syndrome de l'X fragile, qui empêcherait la survie des spermatozoïdes avec un grand nombre de répétitions ou entraînerait une contraction des triplets CTG lorsque ceux-ci sont trop longs. En effet, plusieurs études de cas ont démontré dès 1992 la transmission par le père atteint de DM1 d'une taille normale de CTG dans la descendance due à une contraction des CTG (Shelbourne *et al.*, 1992; Brunner *et al.*, 1993; O'Hoy *et al.*, 1993).

- **Mécanisme du mosaïcisme germinale**

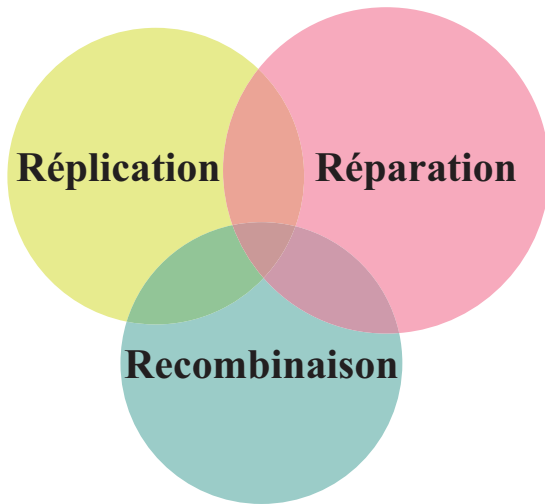
Plus récemment, le mécanisme responsable de ce mosaïcisme germinale a été mieux étudié dans un modèle DM1 murin portant 300 répétitions CTG (Savouret *et al.*, 2003, 2004). Les auteurs ont observé une forte augmentation du nombre de CTG dans les cellules germinales tout au long de la vie chez les souris mâles DM1. Cette expansion est observable dans les spermatozoïdes dès 7 semaines et s'amplifie au fil du temps. De plus, l'expansion se produirait avant la méiose chez le mâle puisque les expansions sont déjà présentes au stade précoce de spermatogonie (stade prolifératif pré-méiotique), impliquant que le mécanisme d'expansion soit méiose-indépendant. De plus, il mettrait en jeu la protéine MSH2, constituant le complexe de réparation des mésappariements (MMR ou « mismatch repair ») puisque l'absence de MSH2 chez ces souris permet un changement de l'instabilité d'expansion vers une contraction des répétitions (Savouret *et al.*, 2004).

### **c. Mosaïcisme somatique**

Le mosaïcisme germinale responsable de l'expansion des CTG au fil des générations est aussi accompagné d'une variation chez un même individu du nombre de triplets selon les tissus et au cours du temps, ce qu'on appelle le mosaïcisme somatique (Anvret *et al.*, 1993; Lavedan, 1993; Wong *et al.*, 1995) (**Tableau 10**).

A.

STRUCTURE ADN



B.

STRUCTURES ADN/ARN ou ARN

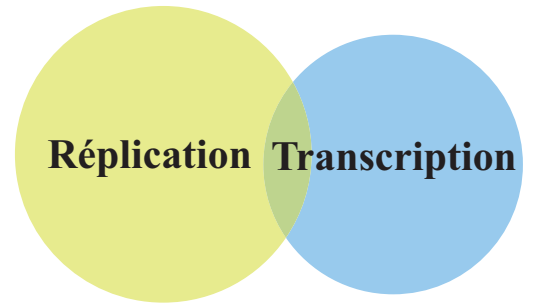


Figure 24. Schéma illustrant les mécanismes responsables de l'expansion des CTGs.

L'instabilité de l'expansion CTG met en jeu divers mécanismes qui sont communs à la plupart des maladies à répétitions. A. Au niveau de la structure ADN contenant l'expansion, les mécanismes de réplication, recombinaison et en particulier les mécanismes de réparation sont défectueux et peuvent entraîner l'expansion au fil des générations. B. Au niveau du complexe ADN/ARN ou concernant l'ARN uniquement, la réplication et la transcription entre en jeu dans l'instabilité.

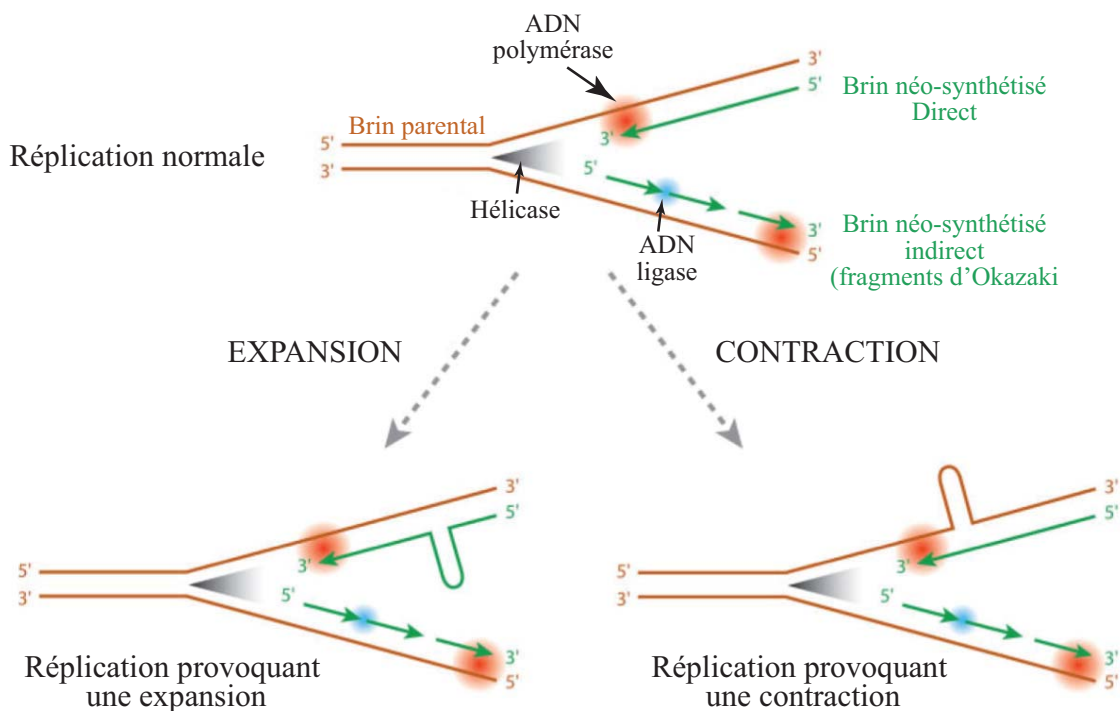


Figure 25. Implication du mécanisme de la réplication dans l'expansion.

La réplication est impliquée dans le mécanisme d'expansion des répétitions par différents mécanismes, qui peuvent conduire à une expansion ou une contraction des répétitions suite à la réplication ADN. *Adapté d'après Brouwer et al., 2009.*

En effet, plusieurs études comparant le nombre de répétitions dans différents tissus, chez des patients suivis tout au long de leur vie ont permis de montrer une variation importante du nombre de CTG, notamment entre les cellules lymphocytaires et les muscles avec une expansion toujours plus importante dans les muscles (Anvret *et al.*, 1993; Lavedan *et al.*, 1993; Thornton *et al.*, 1994; Zatz *et al.*, 1995).

Ces différences traduisent une instabilité lors de la mitose, en plus de ce qui est connu pour l'instabilité méiotique (Jansen *et al.*, 1994; Joseph *et al.*, 1997; Martorell *et al.*, 2000).

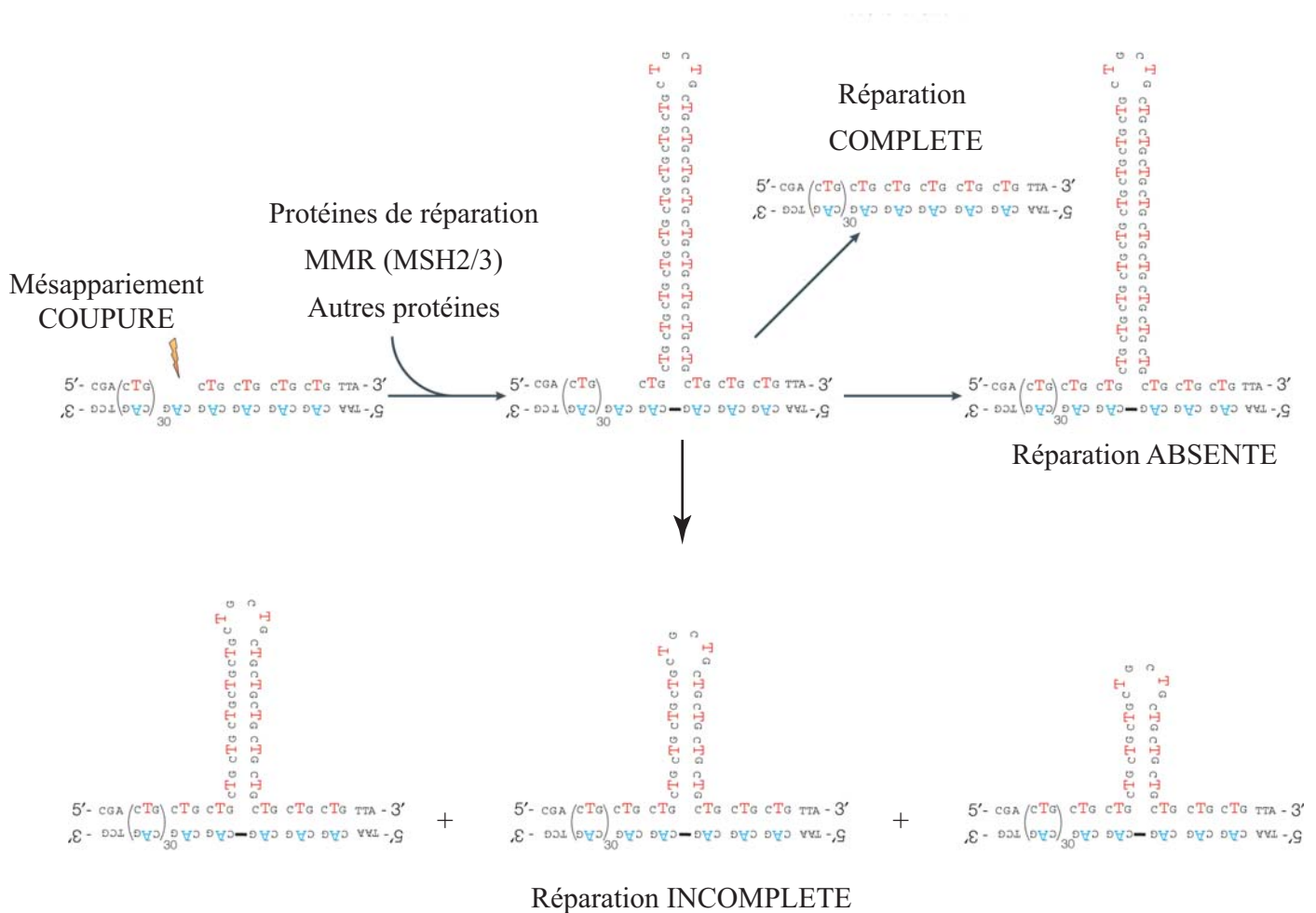
De plus, chez un même patient, le nombre de CTG augmente au cours du temps. Cette instabilité a d'abord compliqué la compréhension du mécanisme d'anticipation puisqu'il était difficile de comparer le nombre de répétitions au sein d'une famille entre un parent et son enfant puisque le nombre de répétitions chez le parent (déjà à l'âge adulte) est plus important que chez son enfant lors du diagnostic (Zatz *et al.*, 1995). L'influence de la transcription des répétitions serait en cause dans cette instabilité somatique et sera détaillée dans le [paragraphe 5d](#).

#### **d. Mécanismes mis en jeu dans l'expansion**

Comme décrit ci-dessus, les mutations de type expansion de microsatellites, comme dans la DM1, sont dynamiques. Plusieurs mécanismes sont responsables de l'expansion tels que la réplication, la recombinaison, la réparation mais aussi la transcription des répétitions. Les hypothèses expliquant le rôle de chacun dans l'expansion des répétitions sont détaillées ci-dessous (Pearson *et al.*, 2005; McMurray, 2010) (**Figure 24**).

- **La réplication**

Premièrement, la réplication peut être bloquée ou altérée par les répétitions. En effet, les répétitions CTG contenues dans l'ADN vont causer des structures spécifiques appelées « slipped-strand DNA » ou ADN-S, de conformation différente et stable, pouvant causer des erreurs lors de la réplication. En effet, ces structures secondaires peuvent entraîner le blocage de la fourche de réplication (Pearson et Sinden, 1996; Samadashwily *et al.*, 1997; Chi et Lam, 2005). La modification de conformation de l'ADN peut aussi entraîner un glissement de l'ADN polymérase, ou « slippage », lors de la réplication, à l'origine d'une expansion (Petruska *et al.*, 1998; Hartenstine *et al.*, 2000) (**Figure 25**).



**Figure 26. Implication du mécanisme de réparation des mésappariements (MMR) dans l'expansion.**

Lors d'un mésappariement, une réparation doit avoir lieu grâce au système de réparation des mésappariements (Mismatch Repair, MMR) qui met notamment en jeu les protéines MSH2 et MSH3. Lorsque le mésappariement n'est pas correctement réparé ou pas du tout, une structure secondaire persiste après la réparation, contenant des expansions CTG. *Adapté d'après Pearson et al., 2005*

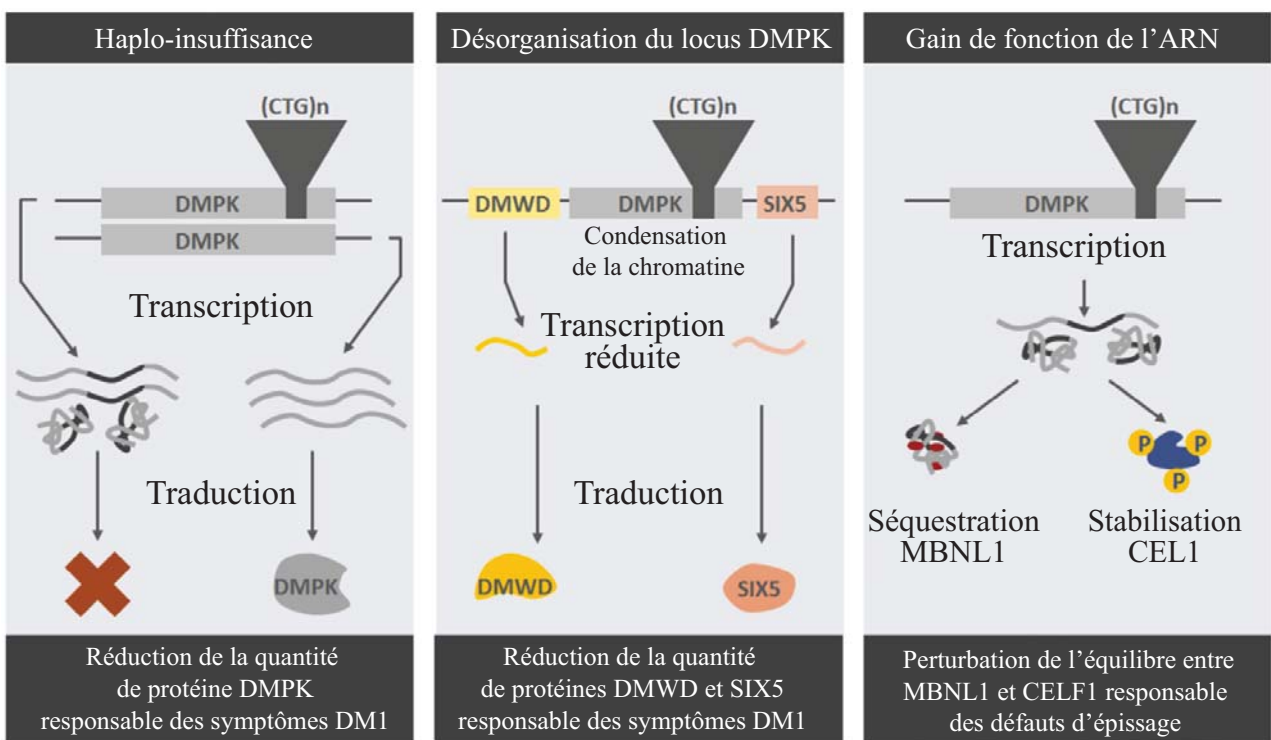
- La recombinaison

Concernant la recombinaison ou conversion des gènes, elle serait aussi impliquée dans ces expansions (Jakupciak et Wells, 2000). Les études faites chez *E.coli* et la levure ont permis d'envisager un rôle des répétitions longues dans la formation de cassures double-brin (CDB), qui ensuite seraient réparées par le mécanisme de recombinaison homologue (RH) et pourrait contribuer à l'instabilité des répétitions (Wells *et al.*, 2005). Cependant, le mécanisme de réparation par RH, via les protéines Rad52 et Rad54, ne semble pas être impliqué dans le modèle souris DM1 avec 300 CTG (Savouret *et al.*, 2003). Néanmoins, cette étude a permis de montrer l'implication d'une voie de réparation ADN dans l'expansion (ci-dessous).

- La réparation

Les expansions, lorsqu'elles sont importantes, doivent être réparées par des mécanismes comme le système de réparation des mésappariements (MMR) qui doit empêcher l'ajout de mutations dans l'ADN en cours de réplication (Jaworski *et al.*, 1995) (**Figure 26**). Notamment, la protéine MSH2 serait impliquée dans l'expansion des répétitions puisqu'une absence de MSH2 dans un modèle murin de la maladie de Huntington entrainerait une stabilisation de l'expansion CAG dans les cellules somatiques (Manley *et al.*, 1999). De même pour la DM1, la mutation de MSH2 chez des souris DM1 permet une contraction des répétitions CTG dans les cellules somatiques et germinales (Savouret *et al.*, 2003). Cependant, les autres mécanismes de réparation tels que la RH (citée précédemment) ou la réparation par jonction des extrémités non homologues (NHEJ) ne semblent pas entrer en jeu dans la réparation des expansions dans ce modèle murin DM1 (Savouret *et al.*, 2003; Iyer *et al.*, 2015).

Enfin, d'autres protéines du système MMR, formant un même complexe comme MSH3 et MSH6, ont été analysées dans un autre modèle murin DM1 (contenant 84 CTG dans le gène *dmpk* souris). Cette étude a montré un rôle plutôt stabilisateur de MSH6 : la combinaison d'une mutation de MSH6 en contexte DM1 entraîne une augmentation de l'instabilité des CTG dans certains tissus comme les reins ou l'estomac. A l'inverse, la mutation de MSH3 n'entrainerait aucune expansion ni stabilisation des répétitions CTG (Broek *et al.*, 2002). Ceci s'oppose à ce qui a été observé plus tard dans le modèle DM300, où la mutation de MSH3 permettrait une contraction de l'expansion (Huguet *et al.*, 2012). Toutefois, ceci peut s'expliquer par une taille plus importante de CTG dans ce dernier modèle



**Figure 27. Mécanismes pathogéniques potentiels impliqués dans la DM1.**

Trois mécanismes principaux ont longtemps été envisagés pour expliquer l'étiologie multisystémique de la DM1 : 1) une diminution de la quantité de protéine DMPK causée par la mutation elle-même (haploinsuffisance), 2) une perturbation de la structure chromatinienne du locus DMPK entraînant la réduction de transcription des gènes du locus et enfin 3) un mécanisme de gain de fonction toxique de l'ARN muté. *Adapté d'après Mateos-Aierdi et al., 2015.*

(300 CTG vs 84 CTG) et une tendance très forte à l'expansion (Foiry *et al.*, 2006; Huguet *et al.*, 2012).

- La transcription

La séparation des brins d'ADN permise par les étapes de réplication ou de transcription joue un rôle dans l'expansion des CTG puisque ces processus favorisent la formation de structures atypiques de type tige-boucle qui vont pouvoir échapper aux mécanismes de réparation (Dion et Wilson, 2009; Y. Lin *et al.*, 2009; Castel *et al.*, 2010a). En effet, la transcription de répétitions a montré son implication dans l'instabilité des expansions dans divers modèles animaux tels que les bactéries, la drosophile ou encore des cellules mammifères (Bowater *et al.*, 1997; Schumacher *et al.*, 2001; Jung et Bonini, 2007; Nakamori *et al.*, 2011a) mais ce mécanisme ne serait pas direct puisqu'il impliquerait une défaillance du système de réparation (Lin *et al.*, 2009).

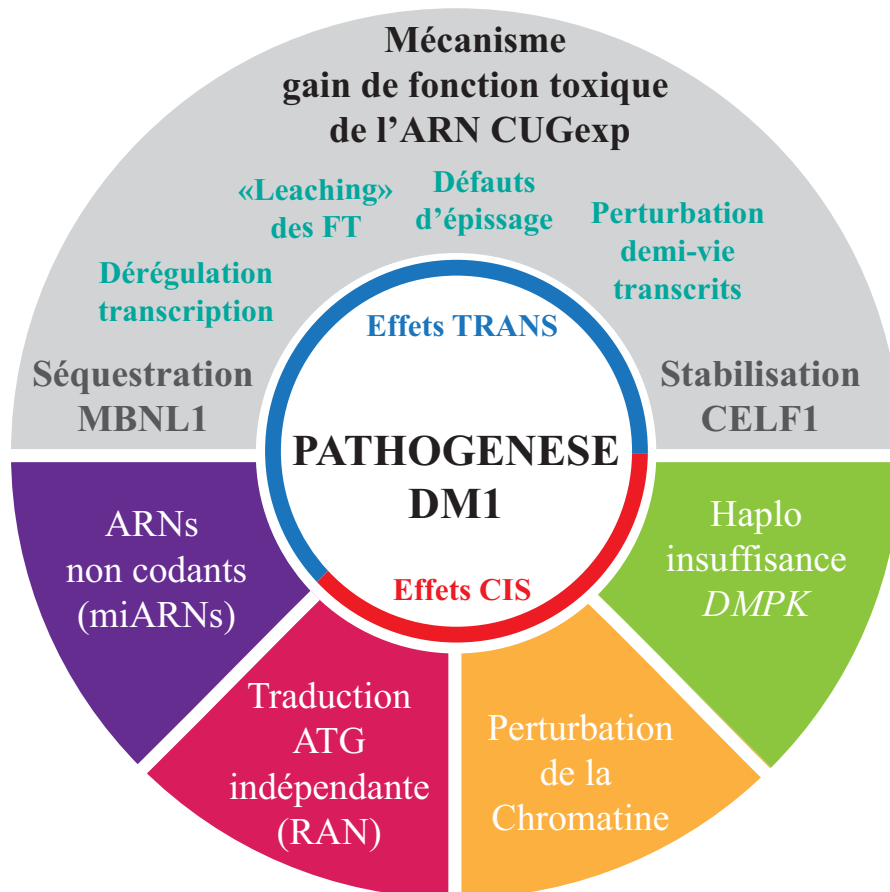
A l'état de transcrit, les répétitions CUG de l'ARNm toxique s'agrègent entre elles, entraînant la formation de structures secondaires de type épingle à cheveux « hairpin » (Smith *et al.*, 1995; Moore *et al.*, 1999) et qui sont responsables du mécanisme de gain de fonction toxique de l'ARN qui sera détaillé dans le [paragraphe 7](#).

## **7. Mécanisme de gain de fonction de l'ARN toxique *dmpk***

Le mécanisme pathogénique en cause dans la DM1 est longtemps resté inexpliqué. En effet, pour la plupart des maladies à expansions causées par des mutations dans des régions codantes comme la maladie de Huntington, le mécanisme mis en jeu entraîne la formation d'expansions de polyglutamines qui s'agrègent et sont toxiques pour la cellule. Cependant, l'expansion CTG à l'origine de la DM1 étant dans une région non traduite du gène *dmpk*, ses conséquences étaient plus difficiles à expliquer. Trois mécanismes principaux ont donc longtemps été envisagés pour expliquer l'étiologie multisystémique : 1) une diminution de la quantité de protéine DMPK causée par la mutation elle-même, 2) une perturbation de la structure chromatinienne du locus DMPK entraînant la réduction de transcription des gènes du locus et enfin 3) un mécanisme de gain de fonction toxique de l'ARN muté (Larkin et Fardaei, 2001) (**Figure 27**).

Le mécanisme général aujourd'hui retenu pour expliquer la pathologie est de type « gain de fonction » de l'ARN ( Wang *et al.*, 1995). En effet, la transcription de l'ADN *dmpk* muté entraîne la formation de structures secondaires, de type tige-boucle par complémentarité des bases C et G, causant la séquestration du transcrit dans le noyau et une diminution de sa





**Figure 28. Pathogénèse de la DM1.**

La DM1 est une maladie de type gain de fonction toxique de l'ARN muté *dmpk* contenant les répétitions CUGexp. Les conséquences sont diverses et peuvent être divisées en deux catégories : les conséquences en cis (rouge) comme l'haplo-insuffisance du gène *DMPK*, la déstabilisation de la chromatine sur le locus *DMPK* (perturbation de l'expression de *DMWD* et *SIX5*) ou la traduction RAN mais aussi des conséquences en trans (en bleu) dont la plus importante concerne la perturbation de l'équilibre entre les protéines MBNL1 et CELF1 (deux facteurs d'épissage alternatif) qui causent des défauts d'épissage, la perturbation de la transcription mais aussi la modification de la stabilité des transcrits. Enfin, l'implication des miARNs est aussi reconnue dans la pathogénèse.

biodisponibilité dans le cytoplasme (Taneja *et al.*, 1995). Les conséquences sont diverses et peuvent être divisées en deux catégories :

1) impliquant un effet direct de la mutation ou « en *cis* », comme i) une haplo-insuffisance de la protéine DMPK, qui n'est pas produite, ii) une désorganisation de la structure chromatinienne à cause de l'expansion CTG, ou iii) la présence de sites de traduction non-ATG dépendants (Traduction ATG-indépendante associée aux répétitions) ;

2) les conséquences indirectes ou « en *trans* » entraînant i) la séquestration de protéines de liaison à l'ARN par les transcrits mutés, ii) un mécanisme d'attraction (ou « leaching ») d'autres protéines ou facteurs de transcription par les répétitions CUG de l'ARN muté, iii) l'activation de kinases ou encore iv) une désorganisation des transcrits non codants tels que les miARNs (Rau *et al.*, 2011; Furling, 2012).

Tous ces mécanismes seront décrits dans les paragraphes suivants (**Figure 28**).

#### **a. Effets en *cis* de la mutation**

- Haplo-insuffisance de la protéine DMPK

La mutation en cause dans la DM1 est située sur le gène *dmpk*, codant pour la protéine « Dystrophia Myotonica Protein Kinase » (DMPK), une kinase de type Sérine/Thréonine apparentée à la famille des kinases Rho (Ridley, 2001). La protéine DMPK résultant de l'épissage alternatif des 15 exons du gène, posséderait 6 isoformes majoritaires, conservées entre l'Homme et la souris dont l'identification fut grandement compliquée par la forte conservation entre ses domaines catalytiques et ceux d'autres membres de la même famille (Maeda *et al.*, 1995; Pham *et al.*, 1998; Lam *et al.*, 2000; Wansink *et al.*, 2003).

Ces isoformes sont exprimées de manière tissu-spécifique et en particulier l'isoforme de 80 KDa majoritairement présente dans les muscles squelettiques et le cœur ; et plus faiblement dans les muscles lisses chez l'Homme (Maeda *et al.*, 1995; Lam *et al.*, 2000) comme chez la souris (Jansen *et al.*, 1996). L'étude de sa fonction a d'ailleurs principalement été faite dans les muscles et semblerait requise pour la différenciation *in vitro* des myoblastes en myotubes (Harmon *et al.*, 2008). Parmi ses substrats, la phosphorylation par DMPK du Phospholemman, protéine transmembranaire impliquée dans les échanges ioniques, a d'abord été décrite chez le xénope (Mounsey *et al.*, 2000) et permettrait la régulation du calcium dans les cardiomyocytes murins (Kaliman *et al.*, 2005). La protéine DMPK est aussi capable de phosphoryler une sous-unité de liaison à la myosine de la myosine-phosphatase, inhibant son activité phosphatase, fonction déjà décrite pour la kinase Rho (Murányi *et al.*, 2005). DMPK

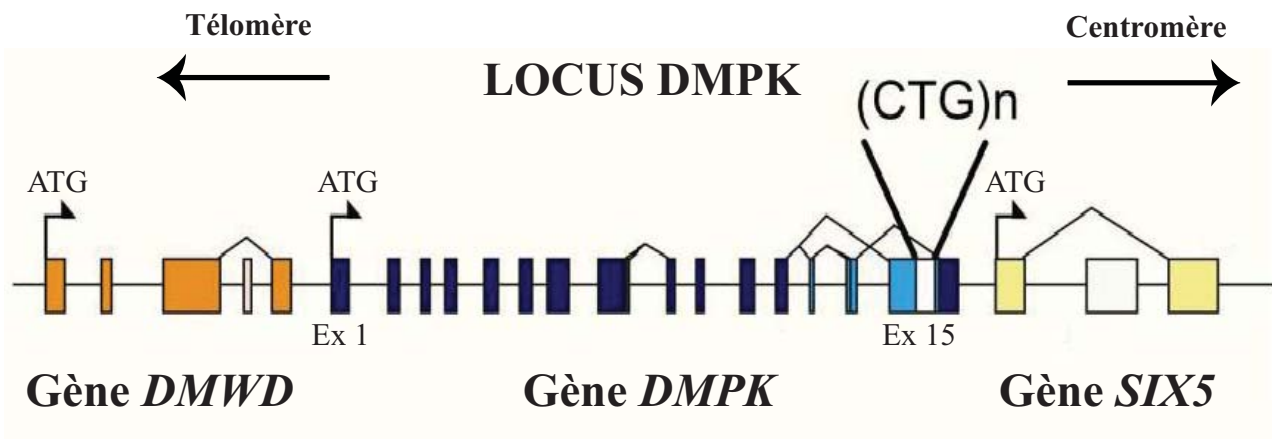


serait aussi nécessaire pour réguler l'homéostasie du glucose et la réponse à l'insuline dans le muscle squelettique et le cœur (Llagostera *et al.*, 2007). Enfin, DMPK serait nécessaire pour maintenir l'intégrité du noyau puisqu'elle se localise *in vitro* dans des cellules musculaires, à la membrane nucléaire et interagit avec les lamines A/C (Harmon *et al.*, 2011).

Malgré une expression plus importante dans les muscles, plusieurs études ont attribué une expression ubiquitaire à la protéine DMPK (Lam *et al.*, 2000; Oude Ophuis *et al.*, 2009). En effet, une expression de DMPK a été mise en évidence dans les yeux (Dunne *et al.*, 1996; Jin *et al.*, 2000), le cerveau (Whiting *et al.*, 1995) et les muscles comme cité précédemment (Maeda *et al.*, 1995; Lam *et al.*, 2000), des tissus affectés dans la DM1. De plus, le niveau de transcrits *dmpk* est retrouvé diminué dans ces tissus chez les patients DM1 ainsi que la quantité de protéine (Fu *et al.*, 1993; Hofmann-Radvanyi *et al.*, 1993; Koga *et al.*, 1994). Ces observations ont conduit à l'hypothèse d'une haplo-insuffisance de la protéine pour expliquer le mécanisme de la maladie. Ainsi, la quantité de protéine produite dans une cellule mutée serait diminuée de 50% par rapport à une cellule sauvage et serait responsable de l'atteinte multisystémique.

Pour confirmer l'hypothèse de l'haplo-insuffisance, des modèles de souris invalidées (Knock-out ou KO) pour le gène *dmpk* ont été créés dès 1996 (Jansen *et al.*, 1996; Reddy *et al.*, 1996). Les souris *dmpk*<sup>-/-</sup> développent une myopathie progressive associée à une faiblesse musculaire mais qui n'apparaît que tardivement (Reddy *et al.*, 1996). Le profil d'expression de la protéine chez la souris est cohérent avec les phénotypes observés puisque DMPK est exprimée dans les muscles lisses, squelettiques et cardiaque durant le développement et après la naissance (Jansen *et al.*, 1996). Malgré l'expression musculaire de DMPK, la survie des souris KO n'est pas affectée. Par contre, leur fonction cardiaque est détériorée puisque les souris DMPK<sup>-/-</sup> développent des blocs de conduction qui s'aggravent avec l'âge et dont la sévérité est associée à la quantité de DMPK dans le cœur (Berul *et al.*, 1999; Saba *et al.*, 1999; Berul *et al.*, 2000).

Ces deux modèles ont donc permis de montrer que l'haplo-insuffisance de la protéine DMPK participe bien aux symptômes de la maladie mais n'est pas suffisant pour expliquer l'atteinte multisystémique de la maladie.



**Figure 29. Le locus DMPK : désorganisation de la chromatine.**

Le locus DMPK contient 3 gènes : le gène *DMPK* qui contient 15 exons (dont le dernier présente la mutation impliquée dans la DM1) en amont duquel se situe le gène *DMWD* (*Dystrophia Myotonica, WD Repeat Containing*). En aval, se situe le gène *SIX5* (*Sine Oculis Homeobox Homolog 5*). Adapté d'après <http://www.mdfs.org>.

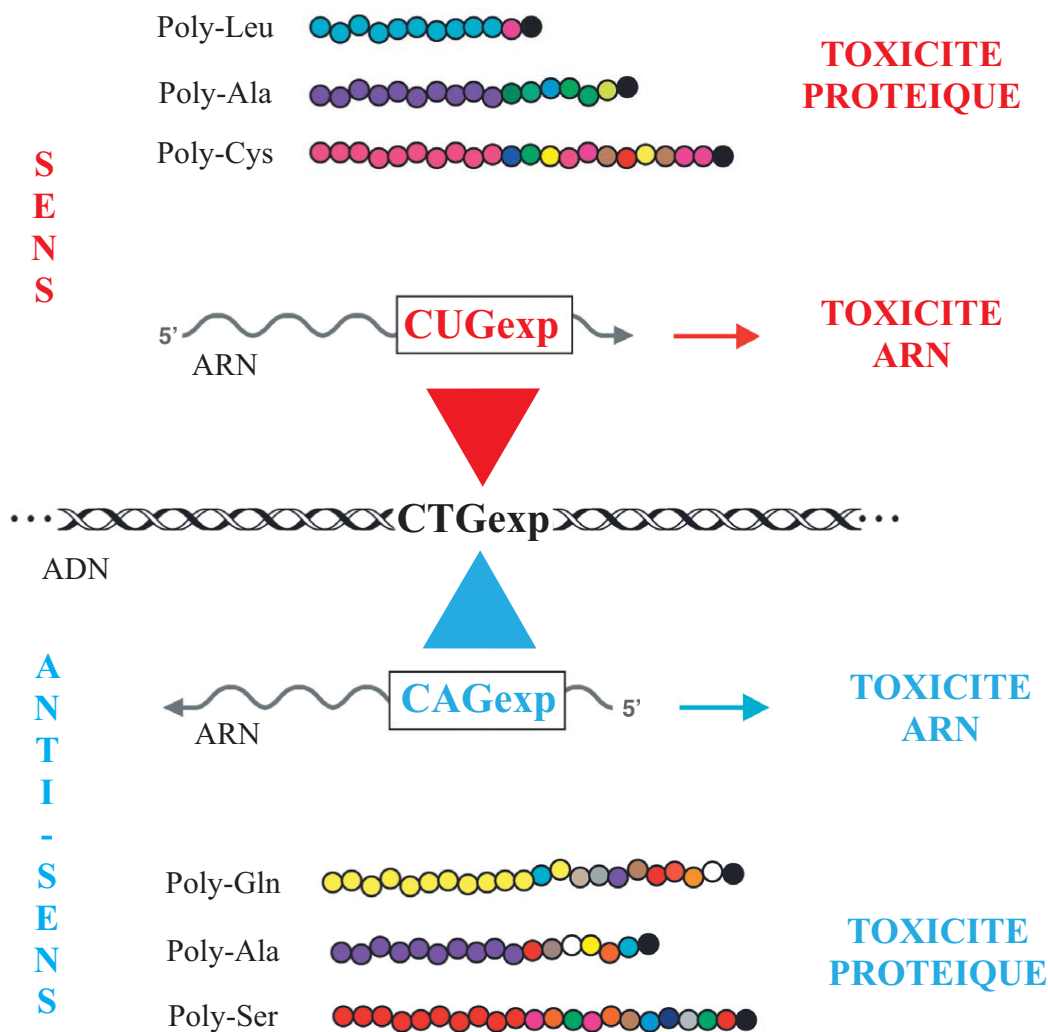
- Désorganisation de la chromatine sur le locus *DMPK* et influence sur les gènes *DMWD* et *Six5*

Comme décrit précédemment, le gène *dmpk* est situé sur le chromosome 19 dans la région q13.3 sur le locus *DMPK*, entre le gène *DMWD* (*Dystrophia Myotonica, WD Repeat Containing*) situé en amont (Mahadevan *et al.*, 1993; Shaw *et al.*, 1993) et le gène *Six5* (*Sine Oculis Homeobox Homolog 5*) localisé en aval de *dmpk* (Boucher *et al.*, 1995) (**Figure 29**).

La fonction du gène *DMWD*, appelé précédemment *59*, n'est pas très bien caractérisée mais son expression dans le cerveau et les testicules chez l'Homme et la souris pourrait expliquer l'atteinte de ces systèmes chez les patients DM1 (Westerlaken *et al.*, 2003).

Le gène *SIX5* est aussi appelé *DMAHP* (*DM locus-associated homeodomain protein*) car sa présence en aval de *DMPK* a été mise en évidence pour la première fois en recherchant des gènes associés à la région CpG hyperméthylée présente sur le gène *Dmpk* contenant les expansions CTG : cette région s'étend de la région 3' NT de *Dmpk* jusqu'au promoteur de *SIX5* (Boucher *et al.*, 1995). Ce gène code pour un facteur de transcription, exprimé majoritairement dans les muscles et le cerveau humain, qui possède une structure conservée entre les vertébrés et la drosophile. Composée de domaines SIX, la protéine SIX5 serait principalement impliquée dans le développement des structures de l'œil et pourrait donc expliquer les symptômes de cataracte précoce observés chez les patients DM1 (Klesert *et al.*, 1997; Thornton *et al.*, 1997).

La perturbation de l'expression des gènes de ce locus, causée par l'expansion des CTG dans cette région a aussi été envisagée pour expliquer les symptômes chez les patients DM1. En effet, l'augmentation du nombre de CTG dans la région 3' NT du gène *dmpk* entraîne une perturbation du repliement de l'ADN et donc de la chromatine, qui pourrait modifier la transcription de *dmpk* et des gènes adjacents (Otten et Tapscott, 1995; Klesert *et al.*, 1997; Thornton *et al.*, 1997; Tapscott, 2000; Eriksson *et al.*, 2001). Dès 1995, une étude a montré que la région 3' NT du gène *dmpk* comprend des sites d'hypersensibilité à la DNase, traduisant une relaxation de la chromatine. Or, dans des fibroblastes provenant de patients DM1, on observe une condensation de la chromatine sur l'allèle comprenant l'expansion CTG, ce qui pourrait engendrer une diminution de la transcription des gènes de ce locus (Otten et Tapscott, 1995; Castel *et al.*, 2010b). Plusieurs études ont confirmé la diminution d'expression des gènes du locus *DMPK* chez les patients DM1, notamment la diminution des transcrits *Six5* dans des cellules DM1 (Klesert *et al.*, 1997) et dans les muscles et le cœur



**Figure 30. La traduction ATG-indépendante ou «Repeat Associated Non-ATG» (RAN).**

La traduction ATG-indépendante associée aux répétitions ou traduction « RAN » (Repeat Associated Non-ATG) se met généralement en place pour des maladies à expansion CAG mais participe aussi à la toxicité dans la DM1. A partir de l'expansion CTG, le transcrit anti-sens CAGexp (bleu) peut être traduit dans les trois cadres de lecture, produisant des protéines Poly-Gln, poly-Ala et poly-Ser, en plus de la toxicité de l'anti-sens lui-même. De même, le transcrit sens CUGexp (rouge) toxique à l'état de messenger peut aussi être traduit dans les trois cadres de lecture codant pour des poly -Leu, poly-Ala et poly-Cys. *Adapté d'après Cleary et Ranum, 2014.*

(Thornton *et al.*, 1997). De plus, les niveaux de transcrits *DMWD* étaient aussi réduits dans les fibroblastes DM1 (Alwazzan *et al.*, 1999).

Plus récemment, une étude dans un modèle DM1 murin s'est intéressée au profil de transcription du locus *DMPK*, montrant une augmentation de la méthylation CpG dans le cœur, corrélée avec l'augmentation du nombre de CTG : les souris possédant 1300 à 1600 CTG présentent plus de méthylation que celles ayant entre 500 et 700 répétitions (Brouwer *et al.*, 2013). De plus, l'augmentation de la méthylation des régions CpG était corrélée à la diminution des marques d'histone de transcription active ( $H_3K_9Ac$ ) et à l'augmentation de la marque répressive  $H_3K_9Me_3$  (Cho *et al.*, 2005). Ces modifications du profil de méthylation entraînent une diminution du nombre de transcrits sens *dmpk* et *Six5* dans le cœur (Brouwer *et al.*, 2013).

Toutes ces études ont permis de confirmer l'implication d'une modification du profil épigénétique du locus *DMPK* dans la mise en place de certains symptômes de la DM1. Notamment, l'étude des modèles de souris KO pour le gène *Six5* a permis de confirmer son rôle dans l'apparition des symptômes oculaires. En effet, les souris *Six5*<sup>-/-</sup> développent comme chez les patients, une cataracte qui serait causée par l'altération de l'équilibre ionique dans l'œil. Cependant, aucun phénotype musculaire n'est observé dans ces modèles (Klesert *et al.*, 1997; Sarkar *et al.*, 2000).

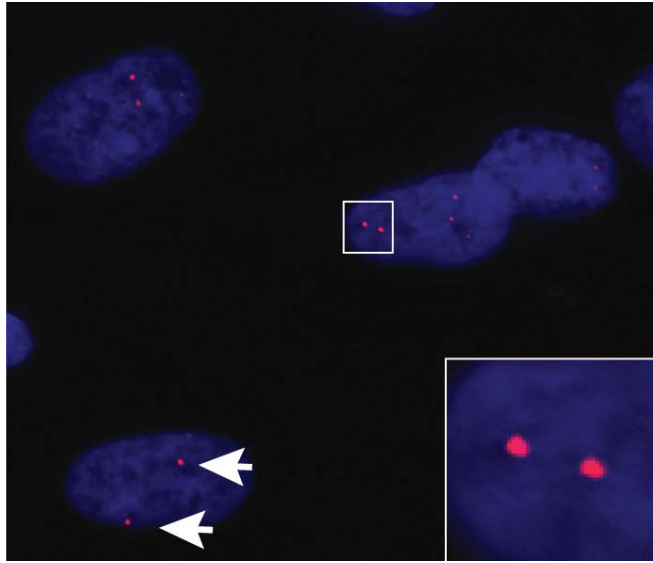
- Toxicité de la traduction ATG-indépendante associée aux répétitions

Parmi les hypothèses, la traduction ATG-indépendante associée aux répétitions ou traduction « RAN » (Repeat Associated Non-ATG) participerait à la toxicité de l'expansion pour la cellule (Zu *et al.*, 2011; Pearson, 2011).

Tout d'abord identifiée dans l'ataxie spino-cérébelleuse de type 8 (SCA8), maladie à expansion CAG, ce mécanisme implique une initiation de la traduction via l'expansion elle-même qui forme des structures de type épingle à cheveux, conduisant à la traduction à partir de tous les cadres de lecture, de protéines poly-glutamine (CAG), poly-sérine (AGC) et poly-alanine (GCA), hautement toxiques pour la cellule et conduisant à l'apoptose (Zu *et al.*, 2011; Pearson, 2011).

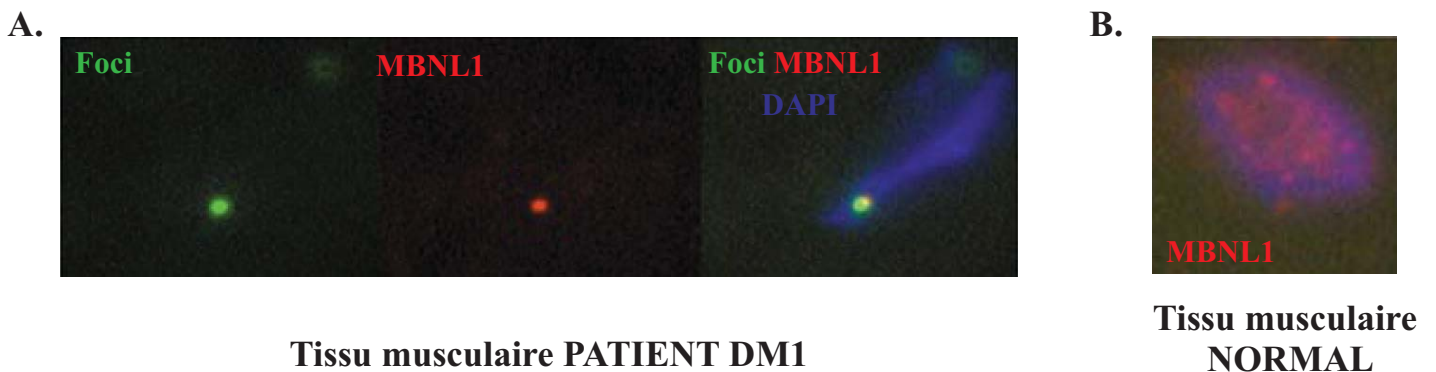
Dans le contexte de la DM1 (**Figure 30**), la transcription du gène *DMPK* se fait de manière bidirectionnelle : le promoteur du transcrit anti-sens est situé dans la région promotrice du gène *six5* au niveau d'une séquence activatrice appelée HSE (« Hyper-sensitive





**Figure 31. Foci nucléaires observés chez les patients DM1.**

Les agrégats nucléaires sont une caractéristique principale de la maladie retrouvée dans les tissus des patients : ils représentent des structures secondaires formées par les expansions CUG qui se replient les unes sur les autres. Ces agrégats ou foci sont observés en hybridation in situ en utilisant une sonde fluorescente  $(CAG)_n$  (en rouge) couplée à la visualisation du noyaux (DAPI, en bleu). *D'après Pettersson et al., 2015.*



**Tissu musculaire PATIENT DM1**

**Tissu musculaire NORMAL**

**Figure 32. Séquestration de la protéine MBNL1 par les répétitions  $CUG_{exp}$ .**

A. Les foci nucléaires observés dans les tissus des patients DM1 sont formés par l'aggrégation des répétitions  $CUG_{exp}$ , ce qui permet la séquestration de la protéine facteur d'épissage alternatif MBNL1. Cette co-localisation entre les répétitions et MBNL1 est observée par hybridation in situ en fluorescence (FISH) couplée à un immunomarquage contre la protéine MBNL1. Les foci en vert sont révélés par une sonde  $(CAG)_n$ , la protéine MBNL1 est en rouge et les noyaux en bleu (DAPI). B. Une expérience de FISH couplé à un marquage contre MBNL1 dans du tissu musculaire normal ne révèle aucun foci et montre une expression punctiforme de MBNL1, diffuse dans tout le noyau. *D'après Mankodi et al., 2001.*

Enhancer ») (Cho *et al.*, 2005; Michel *et al.*, 2015; Nakamori *et al.*, 2011). Le mécanisme de traduction « RAN » a donc lieu via la transcription anti-sens du gène *DMPK* contenant l'expansion. Ceci entraîne une accumulation de transcrits présentant une expansion CAG et la traduction des protéines décrites ci-dessus. De plus, la traduction des transcrits sens comprenant l'expansion CUG peut donner lieu à la création de protéines poly-leucine (CUG), poly-cystéine (UGC) et poly-alanine (GCU). Ce mécanisme a été montré pour la première fois en contexte DM1 dans deux modèles murins comprenant 55 ou plus de 1000 CTG ainsi que dans des cellules musculaires de patients DM1 (Zu *et al.*, 2011).

A ce jour, l'implication du mécanisme de traduction ATG-indépendante associée aux répétitions a été confirmée dans la DM1 mais son rôle dans la toxicité cellulaire reste à identifier. L'expression du transcrit anti-sens et sa traduction seront à considérer pour l'établissement de thérapies efficaces et qui pour le moment visent en grande partie à supprimer la toxicité de l'ARN sens muté (Cleary et Ranum, 2014).

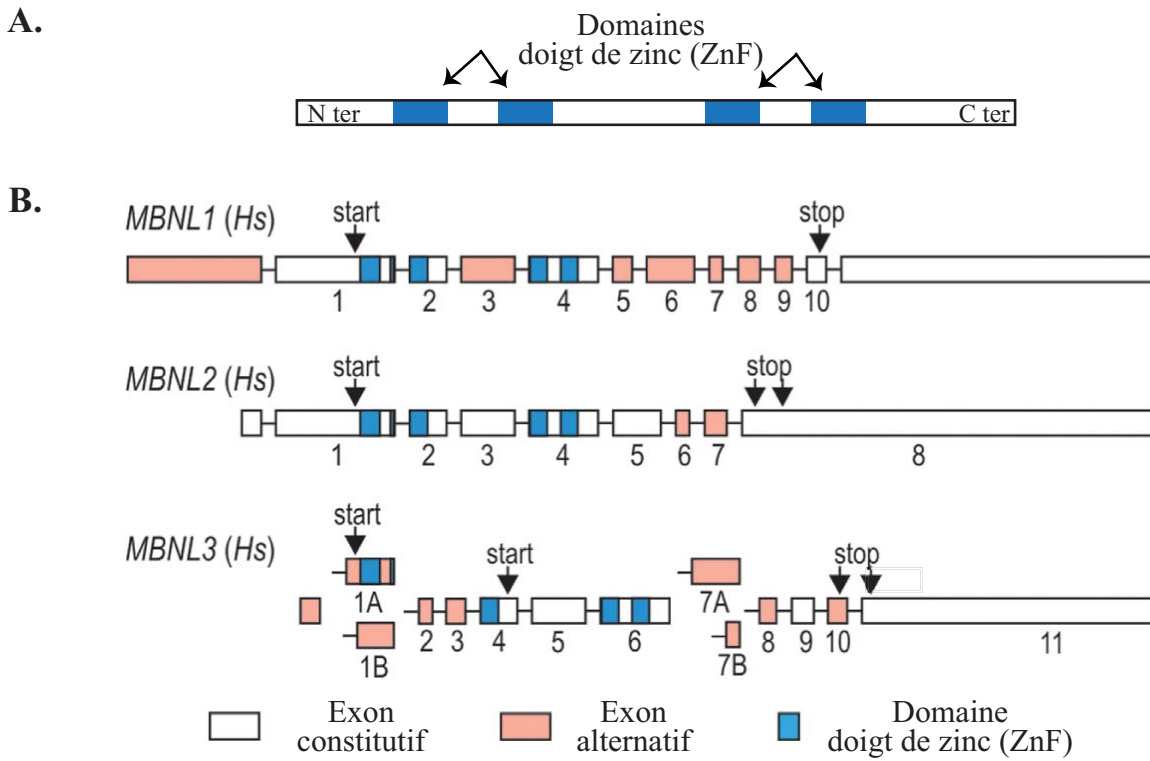
#### **b. Effets en *trans* de la mutation**

- Mécanisme « gain de fonction » toxique de l'ARN muté

Le mécanisme admis à ce jour comme majoritaire pour expliquer l'atteinte multisystémique de la maladie est de type gain de fonction de l'ARN muté (CUG<sub>exp</sub>) (Wang *et al.*, 1995; Taneja *et al.*, 1995; Mankodi *et al.*, 2001; Pettersson *et al.*, 2015).

L'ARN CUG<sub>exp</sub> forme une structure secondaire de type épingle à cheveux (Gacy *et al.*, 1995; B. Tian *et al.*, 2000) et séquestre des protéines de liaison aux répétitions CUG, entraînant la formation d'agrégats nucléaires (Taneja *et al.*, 1995; Davis *et al.*, 1997). Composés de l'ARN replié sur lui-même et des protéines séquestrées, ces structures ribonucléiques appelées foci nucléaires, sont observées chez les patients DM1 et dans les modèles animaux de la maladie (Taneja *et al.*, 1995; Mankodi *et al.*, 2001) (**Figure 31**). En effet, l'expression musculaire de répétitions CUG dans un modèle murin (*HSA<sup>LR</sup>*) a permis de récapituler la plupart des symptômes de la DM1, dont la présence de foci nucléaires (Mankodi *et al.*, 2000). De même, l'expression chez la souris d'un transgène contenant des répétitions CTG en 3' NT du gène *DMPK* humain a aussi permis de reproduire les dysfonctionnements musculaires observés chez les patients, comme la myotonie (Seznec *et al.*, 2001).

Les conséquences de la formation de ces foci comprennent notamment i) la séquestration de protéines de liaison aux CUG<sub>exp</sub> et en particulier de la protéine MBNL1, facteur d'épissage alternatif. En parallèle, ii) la stabilisation d'un autre facteur d'épissage



**C.**

Organisme	Protéine
Nematoda	
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Muscleblind
Arthropoda	
<i>Anopheles gambiae</i>	Muscleblind C
<i>Apis mellifera</i>	Muscleblind C
<i>Bombyx mori</i>	Muscleblind C
<i>Drosophila melanogaster</i>	Muscleblind C
Tunicata	
<i>Ciona intestinalis</i>	Muscleblind
Vertebrata	
<i>Gallus gallus</i> (chicken)	MBNL1 MBNL2 MBNL3
<i>Homo sapiens</i> (human)	MBNL1 MBNL2 MBNL3
<i>Mus musculus</i> (mouse)	MBNL1 MBNL2 MBNL3
<i>Rattus norvegicus</i> (rat)	MBNL1 MBNL2 MBNL3
<i>Takifugu rubripes</i> (fish)	MBNL1 MBNL1a MBNL2 MBNL2a
<i>Xenopus tropicalis</i> (frog)	MBNL1 MBNL2 MBNL3

**Figure 33. Structure des protéines de la famille MBNL chez les vertébrés et la drosophile.**

A. Les protéines de la famille MBNL (Muscleblind like) contiennent plusieurs motifs en doigt de zinc (ZnF) de type Cys3-His (CCCH) qui ont une fonction de liaison aux ARNs pré-messagers. B. L'Homme possède trois membres de la famille MBNL : MBNL1, 2 et 3 qui possèdent quatre domaines ZnF et régulés par l'épissage alternatif. C. Les protéines MBNL sont très conservées au cours de l'évolution et notamment chez la drosophile. *Adapté d'après Konieczny et al., 2014 (B) et Pascual et al., 2006 (C).*

alternatif CELF1, perturbe l'équilibre entre ces deux facteurs antagonistes, ce qui entraîne des défauts d'épissage très bien décrits dans la DM1 et détaillés ci-dessous. D'autres mécanismes se mettent en place suite à la formation des CUG<sub>exp</sub>, comme iii) la perturbation de facteurs de transcription ou iv) la dérégulation d'ARNs non codants (G. Sicot *et al.*, 2011). Enfin, v) la dérégulation transcriptionnelle d'autres cibles de manière indirecte ne peut être exclue.

- Séquestration de MBNL1, protéine de liaison aux CUG<sub>exp</sub>

Parmi les protéines liées aux répétitions CUG, la protéine MBNL1 (Muscleblind Like Splicing Regulator 1) a été la première mise en évidence comme colocalisant avec les CUG in vitro (Michalowski *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 2000) puis dans des tissus musculaires de patients DM1 et DM2, montrant la conservation de ce mécanisme gain de fonction dans les deux types de DM (Mankodi *et al.*, 2001) (**Figure 32**).

Le gène *MBNL1* ou *Muscleblind-like 1* a été mis en évidence pour son homologie avec *Mbl* chez la drosophile, gène codant pour une protéine requise dans la différenciation des yeux et des muscles et dont la mutation est létale à l'état embryonnaire (Begemann *et al.*, 1997; Artero *et al.*, 1998).

Cette protéine nucléaire contient plusieurs motifs doigt de zinc de type Cys<sub>3</sub>-His (CCCH) de liaison aux ARNs pré-messagers, motif très conservé au cours de l'évolution et indispensable notamment pour la régulation de l'épissage alternatif (Ho *et al.*, 2004; Pascual *et al.*, 2006; Fernandez-Costa *et al.*, 2011) (**Figure 33**). En effet, cette protéine peut jouer le rôle d'activateur ou de répresseur de l'épissage et possède une activité antagoniste à celle d'un autre facteur d'épissage alternatif, CELF1 qui peut se lier aux CUG mais ne colocalise pas avec les CUG<sub>exp</sub> (Timchenko *et al.*, 1996; Michalowski *et al.*, 1999). Son rôle sera détaillé plus précisément ultérieurement.

Contrairement à la drosophile, l'Homme et la souris possèdent trois protéines de la famille MBNL : MBNL1, 2 et 3 dont l'expression est tissu-spécifique. MBNL1 serait plus fortement exprimée dans les muscles squelettiques et le cœur. De plus, elle est co-exprimée avec MBNL2 dans la plupart des tissus affectés chez les patients DM1, et notamment les muscles, le cœur, le système nerveux, les intestins et les poumons (Fernandez-Costa *et al.*, 2011). Enfin, les trois protéines ont été retrouvées séquestrées par les foci dans la DM1 (Miller *et al.*, 2000; Fardaei *et al.*, 2002).

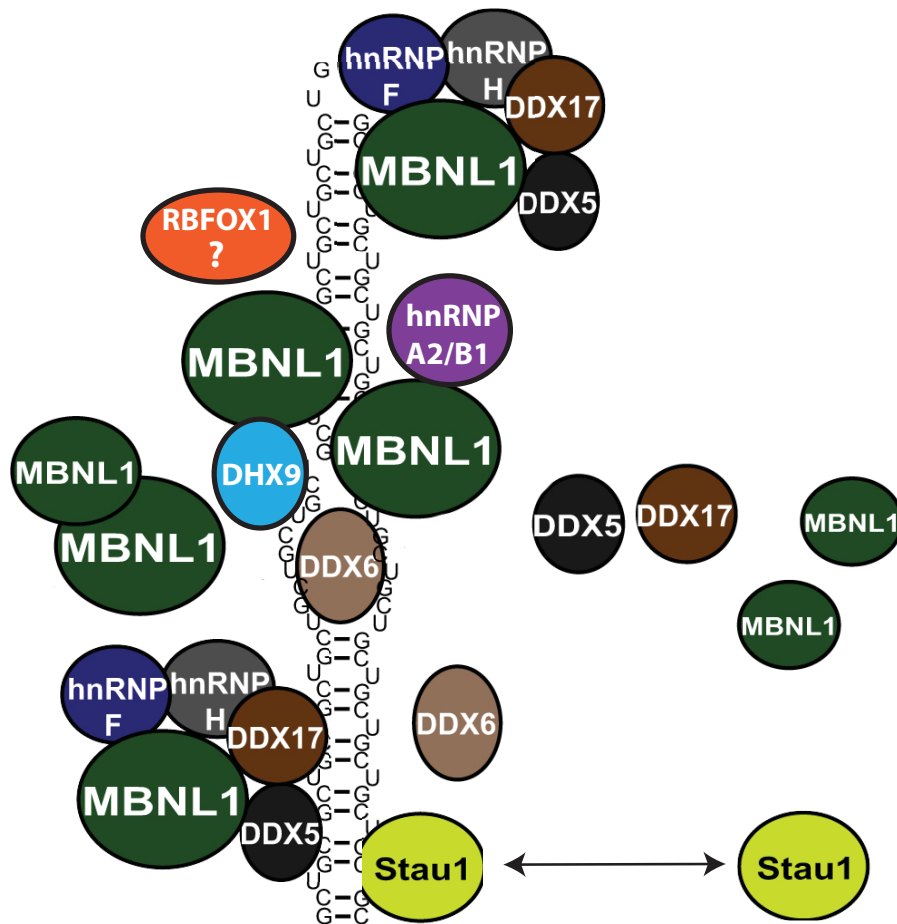
Les conséquences de la séquestration de MBNL1 ont été étudiées à l'aide de modèles murins KO. Le premier modèle arborant une délétion de l'exon 3 de *Mbnl1* (*Mbnl1*<sup>ΔE3/ΔE3</sup>)



reproduit les phénotypes observés dans des modèles murins DM1 qui expriment soit des CUG<sub>exp</sub> seules, soit des CUG<sub>exp</sub> situées sur une portion du gène *DMPK* humain (Kanadia *et al.*, 2003a; Mankodi *et al.*, 2000; Seznec *et al.*, 2001). Les souris *Mbnl1*<sup>ΔE3/ΔE3</sup> souffrent de myotonie, symptôme caractéristique de la DM1, et présentent des défauts d'épissage alternatif pour la *troponine T musculaire* (*Tnnt3*) mais aussi pour le *canal chlorure 1* (*Clc-1*). Une diminution de la quantité de protéine CLC-1 chez ces souris KO pourrait d'ailleurs expliquer la myotonie observée dans ce modèle (Kanadia *et al.*, 2003a). Les perturbations de l'épissage observées dans ce modèle sont communes à celles observées chez les patients DM1, confirmant l'importance de ce mécanisme gain de fonction de l'ARN pour expliquer les symptômes de la maladie. De plus, ce modèle présente un déficit de motivation, observé par une diminution de la consommation de sucres (sucrose), un symptôme aussi observé chez les patients DM1 et associé à une hypersomnolence (Matynia *et al.*, 2010). Enfin, les symptômes cardiaques d'un autre modèle murin avec une délétion de l'exon 2 de *Mbnl1* (*Mbnl1*<sup>ΔE2/ΔE2</sup>), reproduisent ceux observés chez les patients tels que des défauts de conduction ou une cardiomyopathie hypertrophique associés à la persistance de transcrits fœtaux chez les souris adultes (Dixon *et al.*, 2015).

Plus récemment, le rôle de la protéine MBNL2 dans la DM1 a été étudié via l'analyse de plusieurs modèles murins KO pour ce gène (Lin *et al.*, 2006; Hao *et al.*, 2008; Charizanis *et al.*, 2012). Les résultats sont contradictoires puisque le premier modèle qui présente l'intégration d'un vecteur GT (GeneTrap) dans l'intron 4 (*Mbnl2*<sup>GT4/GT4</sup>), ne reproduit pas les symptômes de la DM1 (Lin *et al.*, 2006) alors que le modèle suivant (souris déficientes pour *Mbnl2* avec l'insertion d'un vecteur dans l'intron 2) présentent une myotonie et des défauts d'épissage notamment du *canal chlorure 1* (*Clc-1*) (Hao *et al.*, 2008). Malgré des phénotypes moins importants que pour le KO de *Mbnl1*, l'absence d'une redondance parfaite des symptômes entre le KO de *Mbnl1* chez la souris et l'expression d'un transgène *dmpk* contenant des CUG<sub>exp</sub>, laisse envisager un rôle de MBNL2 dans la pathogenèse DM1 (Du *et al.*, 2010). Cette hypothèse a été confirmée à l'aide d'un troisième modèle *Mbnl2*<sup>-/-</sup> qui a reproduit certains symptômes, comme des déficits d'apprentissage et de mémoire, une hypersomnolence, associés à des défauts d'épissage dans le cerveau et notamment du gène *CACNA1D*, codant pour une sous-unité d'un canal calcique voltage-dépendant, aussi retrouvé mal épissé chez les patients DM1 (Charizanis *et al.*, 2012).

De plus, l'utilisation chez le poisson zèbre de morpholinos (anti-sens) ciblant spécifiquement *Mbnl2* parmi les trois membres de la famille *Mbnl* (*Mbnl1*, 2 et 3) a montré la



**Figure 34. Schéma représentant les protéines séquestrées dans le complexe CUG<sub>exp</sub>/MBNL1.**

En plus de MBNL1, d'autres protéines de liaison aux CUG<sub>exp</sub> semblent être associées au complexe CUG<sub>exp</sub>/MBNL1 : les protéines ribonucléiques hétérogènes (hnRNP) hnRNP H (et H2/H3), hnRNP F, A2/B1, K et L mais aussi les protéines à domaine DEAD, DDX5, DDX6, DDX17 et DHX9. Staufen1 et RBFOX1 seraient aussi impliquées dans les défauts d'épissage des patients DM1 mais leur localisation dans les foci est moins certaine : seule Staufen1 semble interagir avec les CUG<sub>exp</sub> mais pas de manière stable. *Adapté d'après Pettersson et al., 2015.*



présence de défauts développementaux dans les yeux, les muscles squelettiques et cardiaque et dans le cerveau, ainsi que des altérations musculaires et d'épissage comme dans la DM1 (Machuca-Tzili *et al.*, 2011).

Enfin, concernant le rôle de MBNL3 dans la DM1, son expression est forte principalement dans le placenta et le foie et plus faible dans les muscles et le cœur (Fardaei *et al.*, 2002; Kanadia, *et al.*, 2003b; Konieczny *et al.*, 2014). Cependant, elle serait impliquée dans l'inhibition de la différenciation musculaire en régulant l'épissage de *Mef2* (Lee *et al.*, 2010). De plus, un modèle murin KO pour *Mbnl3* entraîne une perte progressive de la fonction de régénération du muscle (Poulos *et al.*, 2013).

Toutes ces études ont donc permis de montrer que les protéines MBNL sont impliquées dans la pathogénicité de la DM1, et plus particulièrement la protéine MBNL1 séquestrée par les répétitions CUG et à l'origine des défauts d'épissage.

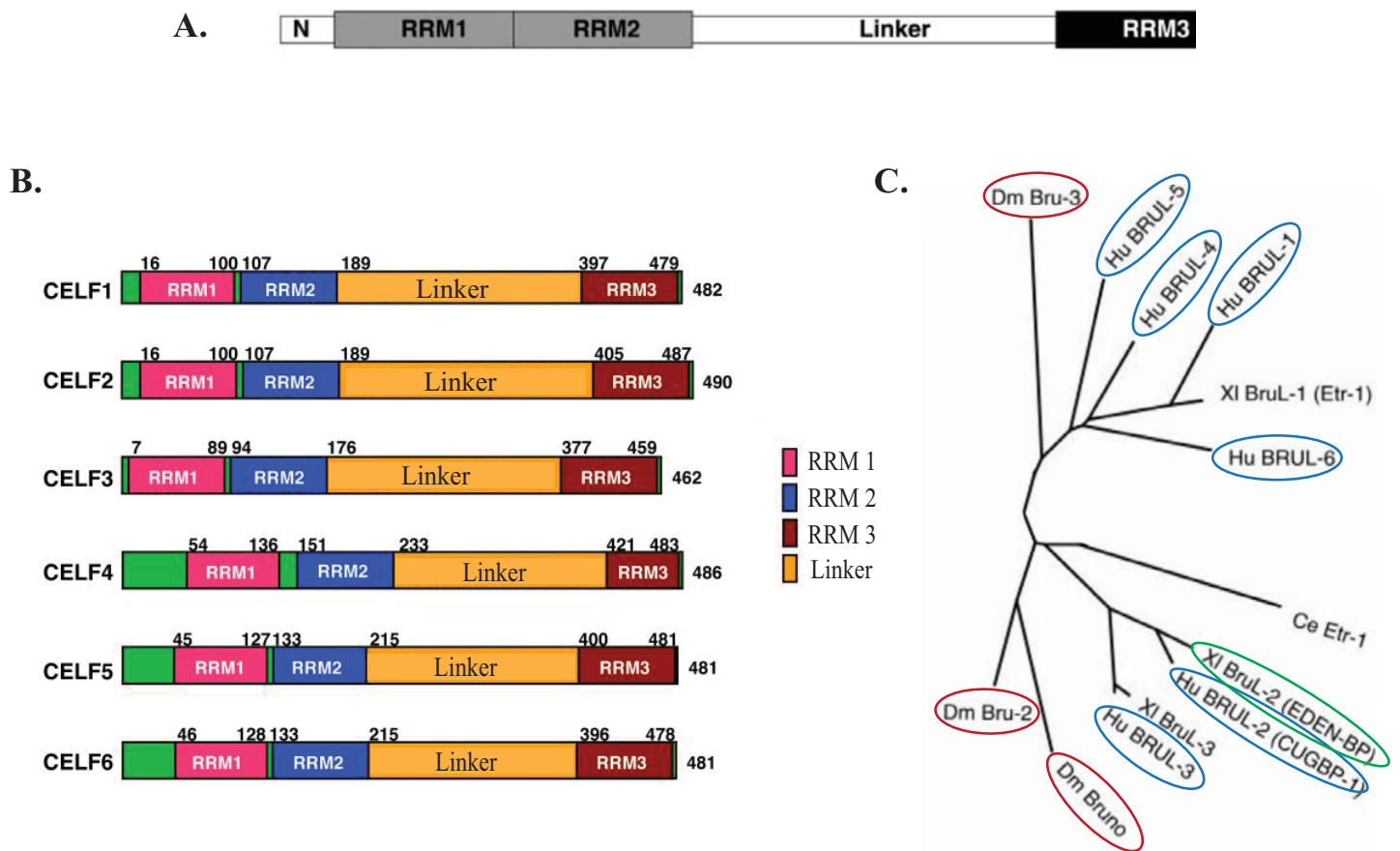
- Séquestration d'autres protéines de liaison aux CUG<sub>exp</sub>

D'autres protéines de liaison aux CUG<sub>exp</sub> seraient associées, directement ou indirectement, au complexe CUG<sub>exp</sub>/MBNL1 et pourraient participer aux défauts d'épissage ou stabiliser le complexe CUG<sub>exp</sub>/MBNL1 (Paul *et al.*, 2011) (**Figure 34**).

Parmi les protéines identifiées dans les foci, on retrouve sept ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes (hnRNP « heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein ») comme hnRNP H (Kim *et al.*, 2005; Paul *et al.*, 2006) mais aussi hnRNP H2, hnRNP H3, hnRNP F, hnRNP A2/B1, hnRNP K et hnRNP L dont la stabilité est augmentée dans des myoblastes issus de patients DM1 ayant une expansion d'environ 8 Kb (Paul *et al.*, 2011). De plus, trois protéines à fonction hélicase ARN, contenant des motifs de type boîte DEAD et permettant les réarrangements des molécules d'ARN, comme DDX5, DDX17 et DHX9 sont stabilisées dans le complexe. En particulier, DDX5, associée aux CUG<sub>exp</sub> permettrait de stabiliser la liaison de MBNL1 sur les CUG<sub>exp</sub> mais aussi sa liaison sur le pré-messager de la *troponine T cardiaque (Tnnt2)*, dont l'épissage est dérégulé dans la DM1 (Laurent *et al.*, 2012). Plus récemment, DDX6 a aussi été retrouvée dans les foci de fibroblastes de patients DM1 et serait impliquée dans la stabilisation du complexe CUG<sub>exp</sub>/MBNL1 (Pettersson *et al.*, 2014).

De même, le niveau de Staufen1 connue pour sa fonction de transport des ARNm mais aussi de régulation de la stabilité des transcrits et de leur entrée en traduction, est augmenté dans le muscle squelettique de modèles murins et de patients DM1 (Kim *et al.*, 2007; Ravel-Chapuis *et al.*, 2012). Cependant, Staufen1 n'interagit pas de manière stable avec les CUG<sub>exp</sub>





**Figure 35. Structure des protéines CELF chez les vertébrés et phylogénie.**

A. La famille des protéines CELF a la capacité de se lier à l'ARN : elle est composée de deux domaines RRM en position N-terminale (RRM1 et RRM2), un RRM en C-terminal (RRM3) et d'un domaine de divergence, ou « linker », séparant les deux derniers RRM. B. L'Homme possède 6 membres CELF, dont la protéine CELF1 impliquée dans la DM1. C. Les protéines CELF humaines (Hu, en bleu) sont proches phylogénétiquement des protéines bruno, bruno-2 et bruno-3 chez la drosophile (Dm, en rouge) ainsi que de la protéine EDEN-BP chez le xénope (XI, en vert). *D'après Good et al., 2000 (A et C) et Dasgupta et Ladd, 2011 (B).*

et aurait un rôle dans l'épissage des ARNs pré-messagers (Ravel-Chapuis *et al.*, 2012; Bondy-Chorney *et al.*, 2016). Enfin, la protéine régulatrice de l'épissage RBFOX1, pourrait aussi être impliquée dans ce complexe puisque elle partage des cibles d'épissage avec MBNL1, dont certaines sont mal épissées chez les patients DM1 ainsi que dans des modèles murins de la maladie. Cependant à ce jour, elle n'a pas été montrée colocalisant avec les foci (Klinck *et al.*, 2014).

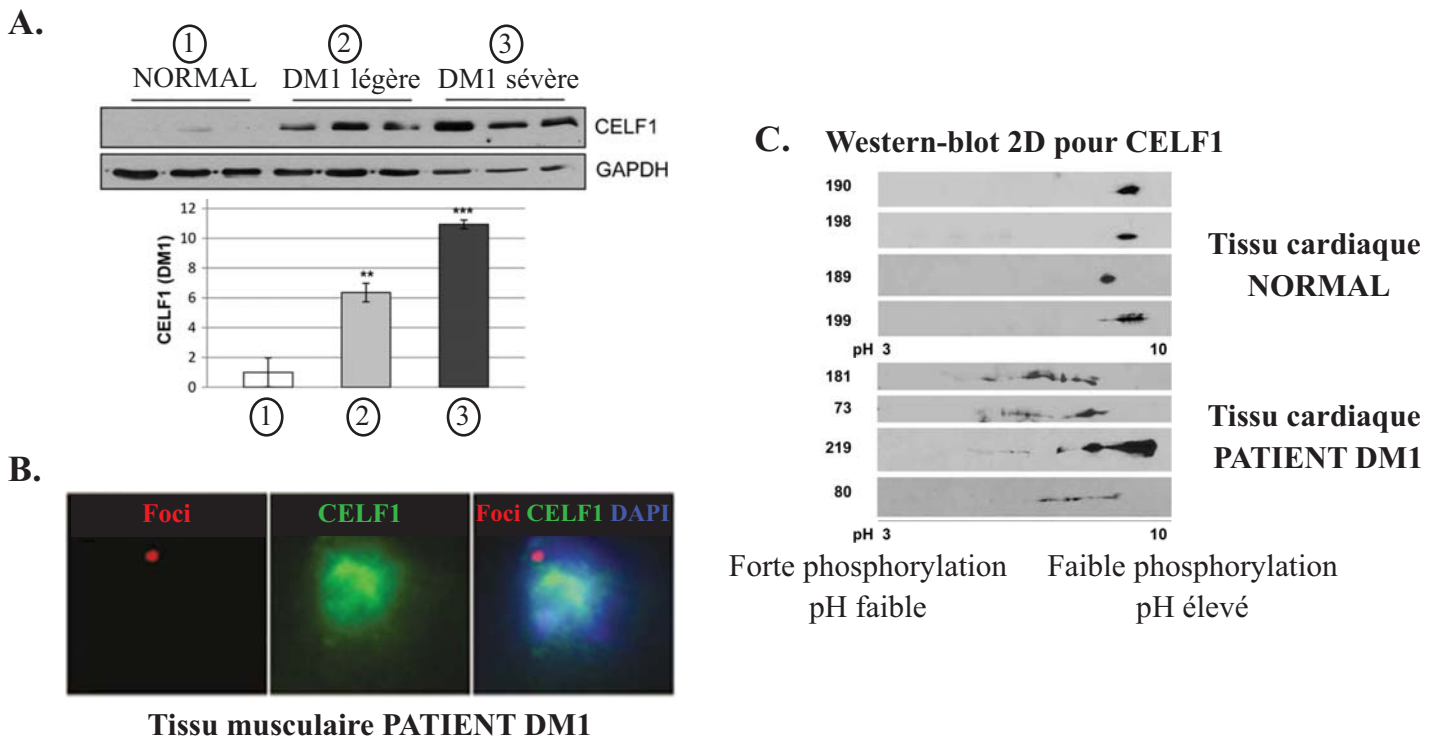
- **Stabilisation du facteur d'épissage alternatif CELF1**

La protéine CELF1 (CUGBP, Elav-Like Family Member 1), autrefois appelée CUGBP1, fait partie de la famille des protéines CELF/BRUNOL contenant 6 membres, identifiés pour leur homologie avec la protéine Bruno chez la drosophile et qui ont la capacité de se lier à l'ARN grâce à leurs domaines RRM (« RNA Recognition Motifs ») (Good *et al.*, 2000) (**Figure 35**). CELF1 fût identifiée pour sa capacité à lier des séquences CUG répétées de petite taille *in vitro* (Timchenko *et al.*, 1996; Michalowski *et al.*, 1999). Cette famille de protéines de liaison à l'ARN présente une affinité pour les régions riches en AU de l'ARNm et est composée de deux domaines RRM en position N-terminale, un RRM en C-terminal et un domaine de divergence, ou « linker », séparant les deux derniers RRM (Good *et al.*, 2000). De plus, cette phosphoprotéine présente de nombreux sites de phosphorylation suggérant que la régulation de son expression pourrait se faire via des événements de phosphorylation (Timchenko *et al.*, 1996; Roberts *et al.*, 1997).

Tout comme MBNL1, CELF1 est un facteur d'épissage alternatif mais qui possède un rôle antagoniste (détaillé dans le paragraphe suivant) (Wang *et al.*, 2015). De plus, elle exerce son activité pour réguler la stabilité des transcrits, l'édition des ARNm et leur entrée en traduction (Barreau *et al.*, 2006).

Dans la DM1, CELF1 est impliquée dans le mécanisme de gain de fonction de l'ARNm puisque cette protéine est stabilisée chez les patients (Timchenko *et al.*, 2001; Savkur *et al.*, 2001; Dansithong *et al.*, 2005; Ladd *et al.*, 2005) mais ne serait pas séquestrée par les CUG<sub>exp</sub> dans les foci (Fardaei *et al.*, 2001; Mankodi *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007).

Le rôle d'une modification de la quantité de protéine CELF1 a été étudié chez la souris grâce à des modèles de gain de fonction (Timchenko *et al.*, 2004; Ho, *et al.*, 2005a; Koshelev *et al.*, 2010). Les souris surexprimant CELF1 dans le muscle présentent une augmentation d'expression de Mef2A corrélée à un changement de type des fibres musculaires de rapides à lentes. De plus, les souris ayant un niveau plus élevé de CELF1 présentent un retard de



**Figure 36. Stabilisation de la protéine CELF1 due à sa phosphorylation.**

A. La quantité de protéine CELF1 est augmentée dans le muscle de patients DM1. B. CELF1 ne colocalise pas avec les foci formés par les répétitions CUGexp. C. Cette stabilisation de la protéine passe par sa phosphorylation observée par Western-blot 2D. D'après Kim et al., 2014 (A), Mankodi et al., 2003 (B) et Kuyumcu-Martinez et al., 2007 (C).

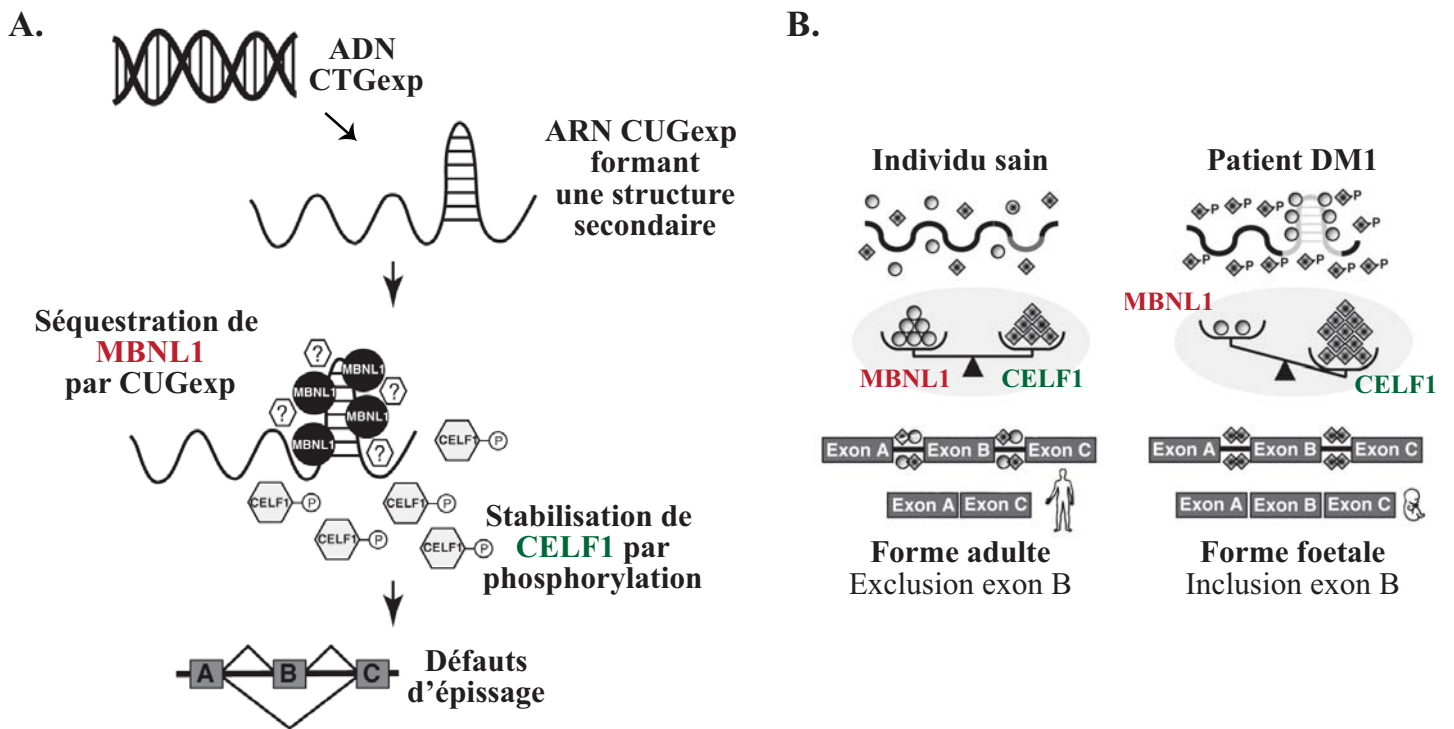
développement (Timchenko *et al.*, 2004). L'expression spécifique de la protéine dans les muscles et le cœur chez la souris provoque une létalité néonatale ainsi que des défauts d'épissage des transcrits musculaires *Tnnt2* et *Cln1*, déjà connus comme mal épissés chez les patients (Ho *et al.*, 2005a).

Cette augmentation de quantité de la protéine CELF1 est retrouvée dans des modèles murins exprimant des répétitions CUG, ce qui confirme l'origine « gain de fonction de l'ARN muté » pour expliquer sa stabilisation (Wang *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2014). Lorsque CELF1 est diminuée en contexte DM1 chez la souris, les phénotypes musculaires ont tendance à être améliorés mais aucun effet bénéfique n'a été observé sur les défauts d'épissage (Kim *et al.*, 2014). Enfin, la surexpression de la protéine CELF1 humaine dans le cœur murin a permis de reproduire les symptômes cardiaques de la DM1, comme une cardiomyopathie dilatée (Koshelev *et al.*, 2010).

Les conséquences de la modification de quantité de CELF1 sont donc des défauts d'épissage, et notamment du récepteur à l'insuline corrélé à une résistance à l'insuline chez les patients DM1 (Savkur *et al.*, 2001) mais aussi à une perturbation de la traduction (Beisang *et al.*, 2012).

CELF1 étant une phosphoprotéine, l'hypothèse d'une phosphorylation pour expliquer la modification de sa quantité et sa stabilisation dans le noyau a été confirmée, montrant l'augmentation de la demi-vie de la protéine CELF1 phosphorylée (Timchenko *et al.*, 2001; Kuyumcu-Martinez *et al.*, 2007) (**Figure 36**). L'hyper-phosphorylation se fait via les protéines kinases C  $\alpha$  et  $\beta$ II (PKC  $\alpha/\beta$ II), pour lesquelles CELF1 possède au moins 10 sites putatifs de phosphorylation (Kuyumcu-Martinez *et al.*, 2007). L'activation des PKC  $\alpha/\beta$ II a été confirmée dans des modèles DM1 murins puisque l'inhibition de la PKC dans le modèle EpA960, corrélée à la diminution de phosphorylation de CELF1, permet d'améliorer la survie et les phénotypes cardiaques (Wang *et al.*, 2009).

Dans la DM1, la stabilisation de CELF1 due à une phosphorylation par la PKC, par un mécanisme encore inconnu, serait donc au cœur de la pathogenèse DM1, et notamment en perturbant la balance entre MBNL1 et CELF1, deux facteurs d'épissage alternatif antagonistes, responsables de la transition de différents transcrits de leur forme fœtale à adulte (Wang *et al.*, 2015). Les différents défauts d'épissage observés dans la DM1 et évoqués dans ce chapitre sont détaillés dans le paragraphe suivant.



**Figure 37. Perturbation de l'équilibre entre les facteurs d'épissage alternatif MBNL1 et CELF1.**

A. Le gène *DMPK* contenant l'expansion CTG est transcrit en ARN *dmpk* qui forme des structures secondaires dans le noyau des cellules des patients. Ces structures secondaires séquestrent la protéine MBNL1 (parmi d'autres), facteur d'épissage alternatif. En parallèle, la protéine CELF1 aussi impliquée dans l'épissage alternatif, est phosphorylée par la PKC (par un mécanisme inconnu) et provoque sa stabilisation. La perturbation de l'équilibre entre ces deux facteurs provoque des défauts d'épissage. B. Après la naissance, les quantités de MBNL1 et CELF1 sont à l'équilibre, permettant la formation de transcrits sous leur forme adulte chez les individus sains. Dans le cas de la DM1, l'équilibre est perturbé : MBNL1 est moins présente que CELF1, comme lors du développement embryonnaire et conduit donc à l'épissage des transcrits sous leur forme foetale. *Adapté d'après Gomes-Pereira et al., 2011.*

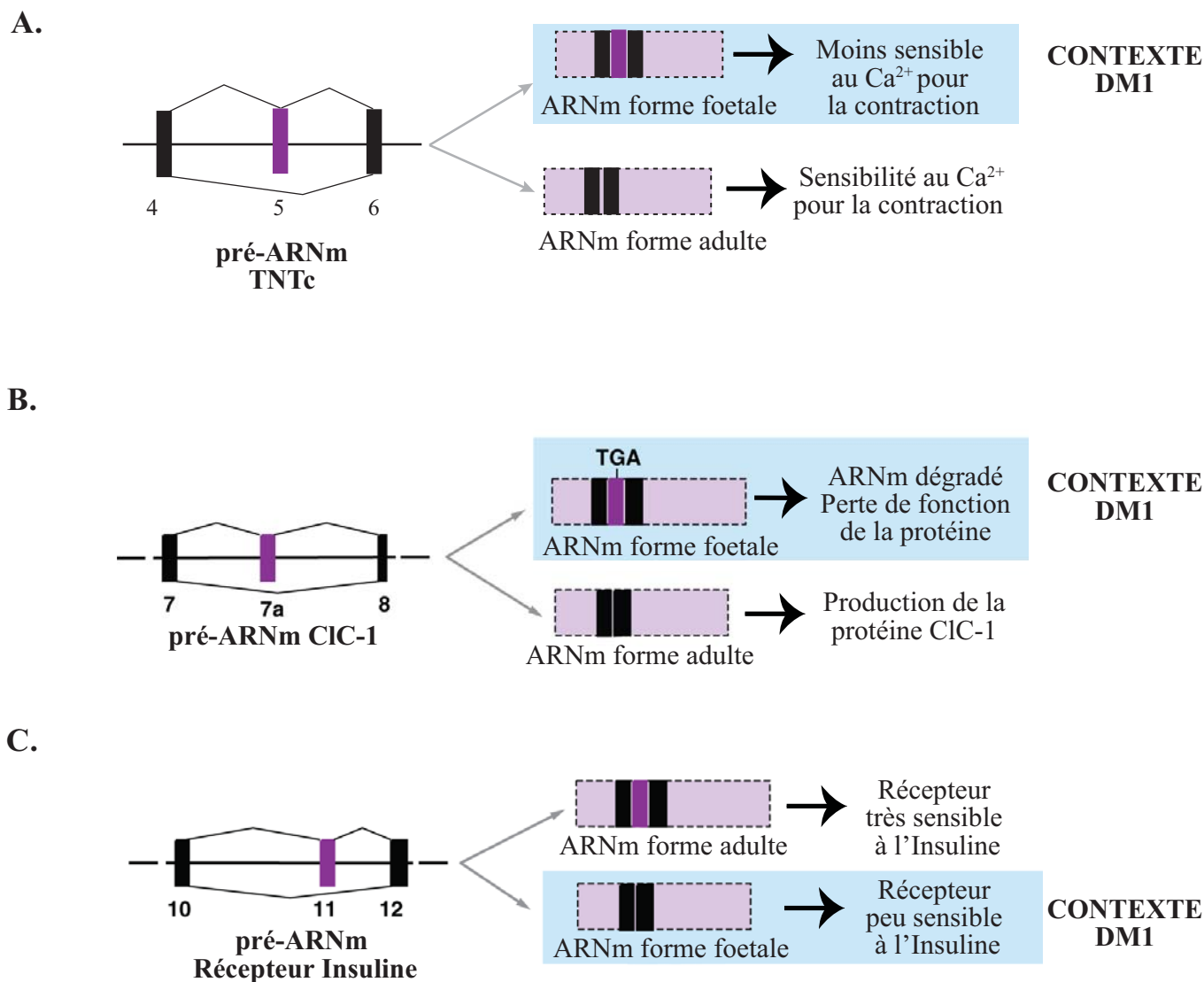
- Conséquences sur l'épissage de la dérégulation de la balance MBNL1/CELF1

Comme décrit précédemment, les facteurs d'épissage alternatif MBNL1 et CELF1 sont importants tout au long du développement où ils remplissent diverses fonctions comme la stabilité des transcrits, leur export vers le cytoplasme et leur entrée en traduction (Beisang *et al.*, 2012; Masuda *et al.*, 2012). La balance de ces protéines est nécessaire pour permettre la transition des transcrits de leur forme fœtale à adulte grâce à l'épissage alternatif, qui a lieu grâce à un changement d'équilibre de la balance au moment de la naissance (Kalsotra *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2015) (**Figure 37**). En effet, durant le développement embryonnaire, la protéine MBNL1 est en moindre quantité par rapport à la protéine CELF1 mais ce rapport change à la naissance entraînant normalement une augmentation de quantité de MBNL1 qui est en plus grande quantité que CELF1 (Ladd *et al.*, 2005; Kalsotra *et al.*, 2008). Dans le cas de la DM1, le mécanisme gain de fonction toxique de l'ARN muté entraînant la séquestration de MBNL1 et la stabilisation de CELF1 inverse cette tendance et provoque des défauts d'épissage alternatif (Kalsotra *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2015).

La fonction d'épissage alternatif des protéines MBNL1 et CELF1 est assurée par leurs domaines de fixation aux ARNs qui sont distincts, MBNL1 ayant une affinité pour les séquences YGCY, contenue dans les répétitions CUGCUG (Teplova et Patel, 2008; Cass *et al.*, 2011) alors que CELF1 se lie aux régions riches en GU (Rattenbacher *et al.*, 2010).

Parmi les cibles de ces facteurs, plus de 200 exons seraient des cibles communes à MBNL1 et CELF1, régulés de manière antagoniste (Kino *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2015). D'autres cibles seraient quant à elles, spécifiques d'un seul facteur (Kalsotra *et al.*, 2008). De plus, ces facteurs d'épissage peuvent entraîner l'inclusion ou l'exclusion d'un ou plusieurs exons d'un transcrit cible de manière spécifique à chaque cible.

Concernant la DM1, ces défauts d'épissage peuvent être corrélés avec les symptômes de la maladie, comme pour la Troponine T cardiaque (Philips *et al.*, 1998) qui pourrait expliquer les défauts de conduction observés dans le cœur des patients. De plus, l'épissage aberrant du récepteur à l'Insuline serait naturellement responsable de la résistance à l'Insuline (Savkur *et al.*, 2001) et la dérégulation des isoformes du canal Chlorure pourrait expliquer la myotonie (Charlet-B *et al.*, 2002; Mankodi *et al.*, 2002). A ce jour, près de 50 transcrits sont alternativement épissés dans la DM1 mais les études transcriptomiques à grande échelle vont



**Figure 38. Exemples de défauts d'épissage retrouvés chez les patients DM1.**

Trois défauts d'épissage majeurs sont responsables des symptômes cardiaques, de la myotonie et de résistance à l'insuline. A. L'inclusion de l'exon 5 de l'ARN pré-messager de la troponine cardiaque (TNTc) entraîne une diminution de sensibilité au Calcium, qui pourrait expliquer les retards de contraction cardiaque et de conduction. B. L'inclusion d'un exon cryptique (7a) dans le transcrite Clc-1 entraînerait une perte de fonction de la protéine, responsable de la myotonie dans la DM1. C. L'exclusion de l'exon 11 du récepteur à l'Insuline chez les patients DM1 serait responsable de la résistance à l'insuline. *Adapté d'après Ranum et Cooper, 2005.*



certainement permettre la découverte de nouvelles cibles (Ranum et Cooper, 2006; Furling, 2012).

Parmi les défauts d'épissage bien caractérisés, le premier transcrit dont l'épissage est modifié dans le muscle squelettique de patients DM1 est la *troponine T cardiaque (cTNT)*, codée par le gène *TNNT2* et déjà connue pour être alternativement épissée en fonction du développement chez le poulet (Cooper et Ordahl, 1984; Philips *et al.*, 1998). Chez les patients DM1, la proportion de transcrits alternatifs incluant l'exon 5 est augmentée et serait due à la fixation de CELF1 sur l'intron en aval de l'exon 5 (Philips *et al.*, 1998). Ceci entraîne la persistance d'une forme fœtale de la protéine TNT cardiaque dans le cœur et pourrait être à l'origine des défauts de conduction chez les patients. De plus, l'altération d'épissage de *TNNT2* a été retrouvée dans un modèle murin surexprimant CELF1 dans le cœur (Ho *et al.*, 2005a). Enfin, la protéine MBNL1 semble aussi agir sur l'épissage de *TNNT2* puisque chez la souris, l'inclusion de l'exon 5 de *Tnnt2* est augmentée dans un modèle KO pour *Mbnl1* (Kanadia *et al.*, 2003a) ainsi que dans un modèle murin DM1 où MBNL1 se lie au pré-messager de *Tnnt2*, entraînant aussi une augmentation d'inclusion de l'exon 5 de *Tnnt2* (Ho, *et al.*, 2005b) (**Figure 38**).

Par la suite, la Troponine T musculaire, codée par le gène *TNNT3*, a aussi montré un défaut d'épissage dans le muscle squelettique des souris KO pour MBNL1 (Kanadia *et al.*, 2003a). L'inclusion d'un exon fœtal entraîne la persistance de la forme fœtale du transcrit, aussi bien dans le muscle des souris DM1 que chez les patients (Kanadia *et al.*, 2003b; Vihola *et al.*, 2010).

Dans la même étude, la protéine CLCN1, codée par le gène *Clcn1* et composant le canal Chlorure, est aussi affectée : les exons cryptiques 7a et 8a sont anormalement inclus dans le modèle KO pour *Mbnl1*, entraînant la production d'une protéine tronquée et donc une diminution de la protéine CLCN1 dans les muscles (Kanadia *et al.*, 2003a) (**Figure 38**). Ce défaut d'épissage impliquant la protéine MBNL1 avait déjà été observé dans le modèle DM1 murin *HSA<sup>LR</sup>* et dans le muscle de patients DM1 et DM2 (Mankodi *et al.*, 2002; Charlet-B *et al.*, 2002). L'épissage aberrant des exons 6 et 7 était associé à l'inclusion anormale de l'intron 2 de *Clcn-1* chez certains patients, défaut qui serait associé à la protéine CELF1 qui peut se lier au niveau du site 3' d'épissage de l'intron 2 et qui pourrait donc aussi réguler l'épissage normal des exons 6 et 7 (Charlet-B *et al.*, 2002). Toutes ces études ont émis l'hypothèse d'un lien entre l'épissage aberrant de *Clcn1* et la myotonie retrouvée chez les patients DM1, lien confirmé par une étude montrant l'atténuation de la myotonie associée à la diminution de





l'épissage aberrant de *Cln1* lorsque MBNL1 est surexprimé dans un modèle murin exprimant des CUG<sub>exp</sub> (Kanadia *et al.*, 2006).

D'autres protéines impliquées dans la contraction musculaire sont retrouvées mal épissées dans la maladie, notamment au niveau du réticulum sarcoplasmique : le récepteur de la Ryanodine (Ryr) est présent dans le muscle des patients DM1 sous sa forme fœtale (Kimura *et al.*, 2005). En effet, deux variants de Ryr1 existent dans le muscle adulte, Ryr1 AS1 (exon 70 inclus) ou Ryr1 AS2 (exon 83 inclus) mais chez les patients DM1 et dans le modèle murin HSA<sup>LR</sup>, la forme Ryr1 AS1 prédomine sous sa forme fœtale excluant l'exon 70. De même, l'ATPase Ca<sup>2+</sup>-dépendante du réticulum sarcoplasmique (SERCA), dont l'isoforme SERCA1 est spécifique des muscles rapides, présente des défauts d'épissage dans la DM1, avec la persistance de la forme néonatale (Kimura *et al.*, 2005). L'inclusion de l'exon 22 dans *SERCA1* serait dépendante de la protéine MBNL1 puisque son absence chez la souris (KO *Mbnl1*<sup>ΔE3/ΔE3</sup>) entraîne l'absence de l'exon 22, comme chez les patients DM1 (Lin *et al.*, 2006). L'épissage aberrant de ces deux protéines, nécessaires à l'homéostasie musculaire du calcium, est suspecté d'entraîner une dégénérescence musculaire et pourrait contribuer à l'hypercontractibilité (myotonie) observée chez les patients.

Plus récemment, l'épissage aberrant de transcrits codants pour le gène *BIN1* (*Bridging Integrator 1* ou *Amphiphysin II*), dont la protéine est nécessaire à la biogenèse des tubules T, eux-mêmes essentiels pour la contraction du muscle, a été retrouvé dans le muscle de patients DM1, DM2 et présentant une DM1 congénitale (Fugier *et al.*, 2011). Normalement, l'exon 11 du pré-messager de *Bin1* doit être inclus pour permettre la formation d'une protéine fonctionnelle, présentant un domaine PI (domaine de fixation des phospho-inositides). Chez les patients DM1, l'absence de fixation de MBNL1 en aval de l'exon 11 entraîne son exclusion, et la production d'une forme inactive de BIN1. Ceci est associé à une mauvaise organisation des tubules T et serait responsable de la faiblesse musculaire chez les patients, hypothèse confirmée par l'observation de ce symptôme dans un modèle murin présentant un défaut d'épissage de *BIN1* (Fugier *et al.*, 2011).

De plus, le mauvais épissage du canal calcium Ca<sub>v</sub>1.1, codé par le gène *CACNA1S* provoquerait aussi une faiblesse musculaire. En effet, les patients DM1 et DM2 présentent un transcrit dans lequel l'exon 29 est exclu dans les muscles, corrélé avec une diminution de la force musculaire (Tang *et al.*, 2012). L'absence de l'exon 29 met en cause les protéines MBNL1 et CELF1 puisque ce défaut d'épissage est retrouvé dans le cœur de souris KO pour *Mbnl1* ou dans le muscle de souris surexprimant *Celf1* (Tang *et al.*, 2012). Cette atteinte

<b>Gène</b>	<b>Exon/Intron</b>	<b>Type de défaut dans la DM1</b>	<b>Tissu affecté</b>
<i>Troponine T cardiaque (TNNT2)</i>	Exon 5	Rétention	COEUR
<i>Canal sodique voltage-dépendant (SCN5A)</i>	Exon 6a Exon 6b	Rétention (Exon 6a) Exclusion (Exon 6b)	COEUR
<i>Canal Chlorure (CLCN-1)</i>	Intron 2 Exons 7a et 8a	Rétention (Intron 2) Exclusion (Exon 7a/8a)	MUSCLES
<i>Récepteur à l'Insuline (IR)</i>	Exon 11	Exclusion	MUSCLES
<i>Troponine T musculaire (TNNT3)</i>	Exon foetal	Rétention	MUSCLES
<i>Récepteur à la Ryanodine (Ryr)</i>	Exon 70 (RyR1)	Exclusion	MUSCLES
<i>ATPase Ca<sup>2+</sup> dépendante du réticulum endoplasmique (SERCA1 et SERCA2)</i>	Exon 22 (SERCA1) Intron 19 (SERCA2)	Exclusion (Exon 22) Rétention (Intron 19)	MUSCLES
<i>Bridging Integrator 1 (BIN1)</i>	Exon 11	Exclusion	MUSCLES
<i>Canal Calcium (CACNA1S)</i>	Exon 29	Exclusion	MUSCLES
<i>Dystrophine (DMD)</i>	Exon 71 Exon 78	Exclusion Exclusion	MUSCLES (Ex71/78) COEUR (Ex78)
<i>Muscleblind-like (MBNL1 et MBNL2)</i>	Exon 7	Rétention	MUSCLES
<i>LIM domain binding 3 (LDB3)</i>	Exon 11	Rétention	MUSCLES
<i>PDZ and LIM domain 3 (PDLIM3)</i>	Exon 5	Exclusion	MUSCLES
<i>Actin Binding LIM Protein 2 (ABLIM2)</i>	Exon 12	Rétention	MUSCLES
<i>Myotubularin-related protein 1 (MTMR1)</i>	Exons 2.1 et 2.3	Exclusion	MUSCLES/COEUR

**Tableau 11. Récapitulatif des transcrits mal épissés dans les muscles et le coeur des patients DM1.**

Ce tableau récapitule les défauts d'épissage décrits dans le texte du paragraphe «Conséquences sur l'épissage de la dérégulation de la balance MBNL1/CELF1» concernant les principaux transcrits mal épissés. Cette liste non exhaustive décrit aussi d'autres épissages aberrants responsables des symptômes musculaires et cardiaques de la DM1.

musculaire se caractérise aussi par une dystrophie progressive et dont la sévérité serait associée à plusieurs défauts d'épissage sur le gène *DMD* codant la Dystrophine (Nakamori *et al.*, 2013). En particulier, l'épissage correct de l'exon 78, assuré par MBNL1, a été montré récemment comme nécessaire à la maintenance de l'intégrité musculaire (Rau *et al.*, 2015).

Un autre symptôme de la DM1, la résistance à l'insuline, est associé à un épissage aberrant du récepteur à l'insuline qui prédomine chez les patients DM1 sous sa forme IR-A dont l'exon 11 est absent, à faible réponse à l'insuline et présent normalement dans les tissus embryonnaires (Savkur *et al.*, 2001; Belfiore *et al.*, 2009; Santoro *et al.*, 2013) (**Figure 38**). La fixation de CELF1 sur un élément de réponse en amont de l'exon 11 serait responsable de l'exclusion de l'exon 11 dans la DM1 et de la résistance à l'insuline, aussi retrouvée chez les patients DM2 (Savkur *et al.*, 2001; Savkur *et al.*, 2004).

Enfin, les symptômes cardiaques des patients DM1 ont été récemment reliés à un mauvais épissage d'un canal sodique, codé par le gène *SCN5A* et muté dans le syndrome Brugada pour lequel les patients présentent des défauts de conduction (Wahbi *et al.*, 2013; Freyermuth *et al.*, 2016). Cette étude portant sur l'analyse de changements d'épissage dans le cœur des patients a identifié plus de 250 événements d'épissage alternatif dans le cœur DM1 dont les transcrits portent des sites de liaison à MBNL1. Par exemple, l'épissage de l'exon 6 de *SCN5A* est pris en charge par MBNL1 : sa forme foetale présente une inclusion de l'exon 6a et la forme adulte présente l'exon 6b, entraînant la formation d'un canal aux propriétés électriques différentes qui entrainerait chez les patients DM1 des défauts de conduction et de l'arythmie. En effet, des souris atténuées pour *SCN5A* développent de l'arythmie et une prolongation de l'intervalle PR (Freyermuth *et al.*, 2016).

La liste non exhaustive d'autres transcrits retrouvés épissés de manière aberrante dans les muscles et le cœur des patients DM1 et non décrits ci-dessus sont cités dans le **tableau 11**.

- **Attraction ou « leaching » et dérégulation de facteurs de transcription causés par les CUG<sub>EXP</sub>**

Le complexe CUG<sub>exp</sub>/MBNL1 formé dans le noyau entraîne un encombrement stérique du noyau, qui cause l'attraction ou « leaching » d'autres protéines et particulièrement de facteurs de transcription bloquant l'activation de leur cible (Ebralidze, 2004).

Ce phénomène de « leaching » ou d'attraction de protéines vers le complexe CUG<sub>exp</sub>, entraîne la relocalisation des facteurs de transcription (FT) en dehors de la chromatine et donc les éloigne de leurs cibles. Ceci a été observé dans des cellules de patients convertis en



myocytes pour les FT Sp1 (Specificity Protein 1), STAT1 et STAT3 (signal transducer and activator of transcription) et RAR $\gamma$  (Retinoic Acid Receptor). De plus, le niveau de leurs transcrits est aussi diminué en contexte DM1 (Ebralidze, 2004).

D'autre part, d'autres facteurs de transcription sont impliqués dans la pathogenèse de la DM1 via leur dérégulation : le FT SHARP (SMART/HDAC1-Associated Repressor Protein) ou SPEN pour son homologie avec le répresseur transcriptionnel *Spn* chez la drosophile, est retrouvé dans le cytoplasme des myoblastes de patients DM1, et perd donc sa fonction nucléaire, ce qui pourrait avoir comme conséquence la surexpression de certaines de ses cibles et ainsi contribuer à la pathogenèse (Dansithong *et al.*, 2011). De même, Nkx2.5, l'orthologue de Tinman chez la drosophile, FT participant au développement et au fonctionnement normal du cœur, serait surexprimé dans la DM1. Dans un modèle DM1 murin, il a été retrouvé exprimé de manière ectopique dans le muscle, ce qui affecterait l'expression de ses cibles (Yadava *et al.*, 2008).

Enfin, MyoD, FT nécessaire notamment à la différenciation des myoblastes en myotubes, est diminué dans des myoblastes exprimant des répétitions CUG et pourrait donc être impliqué dans l'altération des processus de différenciation observés dans des cellules de patients DM1 (Amack *et al.*, 2002).

Plus récemment, l'expression diminuée du FT ZNF37A a été observée dans des lignées cellulaires embryonnaires présentant plus de 1000 CTG et confirmée sur des biopsies de patients. La diminution de ZNF37A, FT de type doigt de zinc à domaine KRAB, serait modulée par CELF1, et causerait des défauts de formation du muscle en altérant la différenciation (Gauthier *et al.*, 2013).

- Effets post-transcriptionnels de la dérégulation de MBNL1 et CELF1 (hormis épissage alternatif)

MBNL1 et CELF1 étant des protéines de liaison aux ARNs, leur fonction est plus large que la régulation de l'épissage alternatif des pré-messagers. En effet, elles participent à la régulation de la stabilité des transcrits via la déadénylation, leur export vers le cytoplasme et leur entrée en traduction (Pascual *et al.*, 2006; Vlasova *et al* Bohjanen, 2008; Beisang *et al.*, 2012). La dérégulation de ces fonctions pourrait aussi contribuer à la pathogenèse DM1.

Notamment, la protéine CELF1 possédant une affinité pour les séquences riches en GU régule la stabilité des transcrits via la déadénylation puisque les ARNm sans queue poly-



A ne peuvent être traduits et sont souvent dirigés vers la dégradation (Vlasova et Bohjanen, 2008; Chen et Shyu, 2011). En effet, la diminution de CELF1 dans des cellules HeLa entraîne la stabilisation de transcrits contenant des séquences riches en GU, séquences en général plus représentées dans des transcrits à demi-vie courte (Vlasova *et al.*, 2008). Ces observations en cellules humaines confirment les résultats obtenus chez le xénope (Paillard *et al.*, 2003). Plus récemment, ces résultats ont été reproduits dans des myoblastes humains, permettant de montrer l'implication de séquences riches en AU, en plus des séquences GU déjà décrites, plus nombreuses dans la région 3' NT des transcrits instables (Lee *et al.*, 2010). A l'inverse, les séquences GA, CA ou CU riches, présentes dans les régions 3' NT auraient tendance à stabiliser les transcrits puisqu'elles prédominent dans les transcrits à demi-vie longue (Lee *et al.*, 2010).

Concernant la protéine MBNL1, ses autres fonctions indépendantes de l'épissage sont encore peu étudiées mais il semblerait qu'elle soit aussi associée à la stabilité des transcrits puisque sa fixation en 3'NT de certains transcrits cibles promeut leur dégradation (Masuda *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012). Des expériences de CLIP (Cross-linking immunoprecipitation) permettant d'identifier les cibles d'une protéine de liaison à l'ARN ont montré que MBNL1 se lie préférentiellement en 3'NT, et que sa diminution par ARN interférence, entraîne une stabilisation de ses cibles comme *Myod1* ou *Mbnl2* (Masuda *et al.*, 2012). Une autre étude a aussi montré son rôle dans la localisation des transcrits et dans leur traduction puisque la déplétion de MBNL1 dans des myoblastes entraîne une réduction de traduction de ses cibles (Wang *et al.*, 2012). Plus récemment, son rôle dans la polyadénylation alternative (PAA) a été identifié dans un modèle souris DM1 (HSA<sup>LR</sup>) qui présente une perturbation des sites de polyadénylation (Batra *et al.*, 2014). En effet, le transcrit cible *Calm3*, codant pour la phosphorylase kinase Calmoduline, présente une PAA dans un modèle atténué pour MBNL1 et/ou MBNL2 chez la souris. La PAA est connue pour créer une région 3'NT alternative, susceptible de modifier la localisation, la traduction ou encore la stabilité des transcrits impactés par cette modification (Tian et Manley, 2013; Batra *et al.*, 2014; Batra *et al.*, 2015).

- Effet sur les ARNs non codants

Parmi les différentes populations d'ARNs, la grande majorité est non codante (>95% des ARNs) mais leur expression dynamique tout au long du développement et leur conservation à travers l'évolution, suggère que ces ARNs non codants aient un rôle fonctionnel et différent des ARNm codant pour les protéines. Notamment, l'implication des ARNs non codants dans les maladies n'est plus à démontrer, et en particulier pour les





maladies musculaires et cardiaques (Erriquez *et al.*, 2013; Ounzain *et al.*, 2013). Par exemple, les micro-ARNs (miARNs) sont impliqués dans la régulation de l'expression des gènes via un « silencing » post-transcriptionnel (Amaral *et al.*, 2013). D'autres espèces d'ARNs non codants sont de plus en plus étudiées, comme les ARNs longs non codants (lncARNs) ou les ARNs longs non codants intergéniques (lincARNs) retrouvés impliqués dans des maladies, comme par exemple le lncARN DBE-T impliqué dans la dystrophie musculaire fascio scapulo humérale (FSHD) (Amaral *et al.*, 2013).

Concernant la DM1, l'implication d'un miARN particulier, miR-1 a été très bien caractérisée dans les symptômes cardiaques de la maladie (Rau *et al.*, 2011; Kalsotra *et al.*, 2014) (**Figure 39**). Ce miARN est connu pour jouer un rôle crucial dans la morphogenèse cardiaque chez l'Homme, ainsi que dans le fonctionnement normal du cœur (Deng *et al.*, 2014). Dans le cœur des patients DM1, la quantité de transcrit *miR-1* mature est fortement diminuée et associée à l'augmentation du *pré-miR-1*, suggérant un défaut de maturation du miARNs dans la maladie. Cette maturation impliquerait la protéine MBNL1, dont l'activité est réduite dans la DM1, puisqu'en condition atténuée pour MBNL1 *in vitro*, on retrouve l'altération de cette maturation. De plus, la protéine de liaison à l'ARN LIN28, connue pour réguler la maturation d'autres miARNs, est surexprimée en contexte atténué pour *MBNL1*, traduisant une possible compétition pour la maturation de *miR-1*. L'atténuation de *LIN28* en cellules permet de restaurer un profil normal de *miR-1* mûré, confirmant la compétition entre les deux protéines de liaison à l'ARN. Enfin, les cibles de *miR-1* sont surexprimées à l'état protéique dans le cœur des patients DM1 et DM2 comme le canal calcique CACNA1C, ce qui pourrait expliquer l'arythmie observée chez ces patients (Rau *et al.*, 2011). Plus récemment, une étude a identifié la dérégulation de 54 miARNs dans le cœur d'un modèle souris DM1, dont 20 étaient aussi dérégulés chez les patients DM1. Notamment, les auteurs ont montré la perturbation du réseau de régulation Mef2 chez les patients et dans un modèle souris DM1 : la protéine MEF2 est diminuée ainsi que certains miARNs qui sont des cibles de Mef2 (Kalsotra *et al.*, 2014).

De même, plusieurs miARNs ont été retrouvés dérégulés dans le muscle squelettique de patients DM1 et dans un modèle drosophile, comme *miR-1* déjà retrouvé diminué dans le cœur, ainsi que *miR-7* et *miR-10* (Fernandez-Costa *et al.*, 2013). De la même manière, *miR-206*, surexprimé dans les muscles de patients, serait capable de se lier au transcrit *dmpk* (Gambardella *et al.*, 2010; Koscianska *et al.*, 2015).



Dernièrement, la dérégulation de miARNs dans le sérum des patients a été corrélée avec la rapidité de progression de la dégénérescence musculaire (Perfetti *et al.*, 2014; Koutsoulidou *et al.*, 2015). Cette méthode d'identification des miARNs circulants pourrait être utilisée à visée diagnostique pour estimer la forme ou la sévérité de la maladie et ainsi prédire son évolution. Les auteurs ont observé une corrélation entre la dérégulation des miARNs *miR-1*, *miR-133* et *miR-206* et la progression de la perte musculaire.

Un autre type d'ARNs non codants est étudié dans la DM1 : les petits ARNs interférents (ARNi). Ils sont créés à partir des CUG<sub>exp</sub> formant des structures de type épingle à cheveux qui sont ensuite clivés par la protéine DICER, en ARNi de petite taille, capables de « silencer » des cibles spécifiques (Krol *et al.*, 2007). Un modèle de drosophile de la DM1, permettant l'expression de 250 CTG a démontré ce mécanisme : l'expression bi-directionnelle de DMPK (ou l'expression chez la drosophile de transcrits CAG et CUG), permet la formation d'ARN double brin CUG/CAG qui sont dégradés en petits ARNs d'environ 21 nucléotides. Ces ARNi ciblent alors des transcrits contenant des répétitions CAG courtes, et notamment la protéine TBP (TATA binding Protein) (Yu *et al.*, 2011).

A ce jour, l'implication des ARNs longs non codants n'a pas été mise en évidence dans la DM1 mais son rôle pathogénique dans d'autres maladies à répétitions est sans doute conservé dans la DM1 (Li *et al.*, 2013). Un type d'ARN long non codant, les ARN anti-sens naturels, peut être exclu puisque l'ARN anti-sens de *DMPK* peut être traduit par la traduction ATG-indépendante et entraîner une toxicité pour la cellule (décrit dans le [paragraphe 6](#)). De même, la fonction des ARNs longs non codants intergéniques n'est pas très bien caractérisée et son implication dans la DM1 n'a pas été étudiée.

Nous avons pu voir dans ce chapitre que la mutation en cause dans la DM1 entraîne des mécanismes de pathogénicité très variés, responsables de la très grande complexité de cette maladie. L'ensemble des mécanismes impliqués dans la pathogenèse de la DM1 est récapitulé dans la [figure 28](#).

## **8. L'apport des modèles animaux dans la DM1**

La compréhension des mécanismes moléculaires responsables du développement normal d'un organisme ou du déclenchement d'une maladie nécessite l'utilisation de modèles animaux. Dans le cas des maladies génétiques, l'utilisation d'un modèle animal proche de l'Homme, avec une forte conservation des gènes est nécessaire.

	Modèle	Phénotype observé	Référence
Modèles murins DM1	<i>KO DMPK</i>	Défauts cardiaques et musculaires	Reddy <i>et al.</i> , 1996 ; Berul <i>et al.</i> , 2000
	<i>KO SIX5</i>	Cataracte, altération de la fonction cardiaque et de la fertilité	Klesert <i>et al.</i> , 2000 ; Sarkar <i>et al.</i> , 2000
	<i>HSALR</i> (250 CTG)	Myotonie, myopathie, altération de la survie, défauts d'épissage	Mankodi <i>et al.</i> , 2000
	<i>DM300</i> (300 CTG dans le locus DMPK humain)	Foci nucléaires, atteinte musculaire (myotonie et faiblesse musculaire) et nerveuse, Instabilité germinale (Cf <i>DMSXL</i> )	Seznec <i>et al.</i> , 2001
	<i>GFP-3'NT DMPK</i> murin avec 11 ou 91 CTG	Atrophie musculaire due à une diminution de la différenciation	Storbeck <i>et al.</i> , 2004
	<i>DM5 / DM200</i> (eGFP-3'NT DMPK murin avec 5 ou 200 CTG)	Anomalie de conduction cardiaque, défauts d'épissage, myotonie <i>Non mentionné dans le texte car défauts dans modèle DM5 (toxicité due à l'expression basale du transgène)</i>	Mahadevan <i>et al.</i> , 2006
	<i>DMPK-CUG960</i> (ex15 DMPK humain avec 960 CTGi)	Foci nucléaires, augmentation du taux de CELF1, myotonie, myopathie, défauts d'épissage, cardiomyopathie, défauts de conduction et altération de la survie	Wang <i>et al.</i> , 2007 ; Orenge <i>et al.</i> , 2008
	<i>DM550</i> (Cf <i>DM300</i> )	Masse musculaire réduite, fonte musculaire due à la voie ubiquitine-protéasome	Vignaud <i>et al.</i> , 2010
	<i>DMSXL</i> (Cf <i>DM300</i> )	Démonstration de l'instabilité germinale	Gomes-Pereira <i>et al.</i> , 2007 ; Huguet <i>et al.</i> , 2012
	<i>Mbn11</i> <sup>AE3/AE3</sup>	Myotonie, myopathie, défauts d'épissage	Kanadia <i>et al.</i> , 2003
	<i>Mbn11</i> <sup>AE2/AE2</sup>	Défauts de conduction, cardiomyopathie hypertrophique, défauts d'épissage	Dixon <i>et al.</i> , 2015
	<i>Mbn12</i> <sup>Δ12/Δ12</sup>	Myotonie, défauts d'épissage	Hao <i>et al.</i> , 2008
	<i>Mbn12</i> <sup>-/-</sup>	Défauts d'épissage dans le cerveau, déficits d'apprentissage et de mémoire, hypersomnolence	Charizanis <i>et al.</i> , 2012
	<i>Mbn13</i> <sup>-/-</sup>	Perte progressive de la fonction de régénération musculaire	Poulos <i>et al.</i> , 2013
	<i>CUGBP1-TR</i> (CELF1 humain surexprimé dans les muscles et le cœur)	Retard de développement, dystrophie musculaire	Timchenko <i>et al.</i> , 2004
	<i>MCKCUG-BP</i> ( <i>CELF1</i> humain surexprimé dans les muscles et le cœur)	Dégénérescence musculaire, défauts d'épissage, centralisation des noyaux des muscles	Ho <i>et al.</i> , 2005
	<i>MHC-rtTA/TRECUGBP1</i> ( <i>CELF1</i> humain inductible)	Dysfonction systolique et diastolique, cardiomyopathie dilatée Perte et faiblesse musculaire, défauts d'épissage	Koshelev <i>et al.</i> , 2010 Ward <i>et al.</i> , 2010

Tableau 12. Les modèles murins DM1.

Pour cela, les modèles les plus utilisés en génétique sont i) la souris dont le génome ressemble à 90% à celui de l'Homme (Chinwalla *et al.*, 2002; Monaco *et al.*, 2015), ii) le nématode *C. elegans* invertébré qui présenterait 80% de ses protéines communes avec l'Homme (Lai *et al.*, 2000; Kaletta et Hengartner, 2006), iii) la drosophile, invertébré mais qui possède 75% des gènes impliqués dans des maladies conservés avec l'Homme, et iv) le poisson zèbre, vertébré qui présente 70% de ses gènes ayant un orthologue humain (Howe *et al.*, 2013).

Comme nous avons pu le voir dans les paragraphes précédents, les modèles murins ont très largement contribué à la compréhension de la pathogenèse DM1 et en particulier des mécanismes impliqués dans la dynamique de la mutation mais aussi dans la caractérisation des défauts d'épissage. La plupart d'entre eux ayant déjà été cités, ils seront brièvement décrits par ordre chronologique dans ce chapitre et son récapitulés dans le **Tableau 12**.

Pour les autres modèles animaux, il existe plusieurs modèles pour reproduire l'expansion CUG et la perturbation de la balance MBNL1/CELF1 chez le nématode (*Caenorhabditis elegans*) (Chen *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2011; Garcia *et al.*, 2014), le poisson zèbre (*Danio rerio*) (Machuca-Tzili *et al.*, 2011; deLorimier *et al.*, 2014; Todd *et al.*, 2014) et enfin pour la drosophile (*Drosophila melanogaster*) (Houseley *et al.*, 2005; de Haro *et al.*, 2006; Garcia-Lopez *et al.*, 2008; Picchio *et al.*, 2013; Chakraborty *et al.*, 2015).

- **Les modèles DM1 murins**

Les premiers modèles étudiés chez la souris ont été les modèles KO pour *DMPK* et *SIX5* contribuant à exclure l'hypothèse de l'haplo-insuffisance du gène *DMPK* comme seule responsable des symptômes de la maladie (Reddy *et al.*, 1996; Berul *et al.*, 1999; Klesert *et al.*, 2000; Sarkar *et al.*, 2000). Cependant, ces modèles ont permis de montrer le rôle du gène *SIX5* dans l'apparition des cataractes précoces et celui de *DMPK* dans le développement des symptômes cardiaques et musculaires.

Ensuite, de nombreux modèles ont recréé l'expansion CTG de manière multisystémique ou tissu-spécifique, permettant de confirmer l'hypothèse d'un gain de fonction toxique de l'ARN muté (Sicot et Gomes-Pereira, 2013). Ces modèles expriment une expansion CTG soit dans le locus *DMPK* humain (Seznec *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2007; Huguet *et al.*, 2012) ou murin (Mahadevan *et al.*, 2006) ou bien uniquement des répétitions CTG non codantes (Mankodi *et al.*, 2000).



Dans un premier temps, l'expression de répétitions non codantes a permis de confirmer la toxicité des répétitions CUG dans le noyau via l'expression de 250 répétitions dans le muscle en utilisant le promoteur de l'Actine (modèle *HSA<sup>LR</sup>*) (Mankodi *et al.*, 2000). Ces souris meurent précocement et présentent des défauts musculaires associés à des défauts d'épissage. Cependant, l'absence de dégénérescence musculaire dans ce modèle pourrait être due au transgène lui-même qui ne contient pas les gènes du locus DM1. Pour cela, l'un des modèles de choix pour l'étude de la DM1 fut généré en 2001 : ces souris contiennent un transgène exprimant environ 300 répétitions CTG provenant du locus humain *DPMK* (extrait d'un patient DM1) et appelé DM300 (Seznec *et al.*, 2001). Ce modèle récapitule la présence de foci nucléaires, l'atteinte musculaire (myotonie et faiblesse musculaire) et d'autres systèmes dont le cerveau. De plus, ce modèle reproduit l'instabilité germinale observée chez l'Homme puisque ces souris présentent une expansion au cours du temps et ont permis la génération de souris DMSXL portant plus de 1000 CTG (Gomes-Pereira *et al.*, 2007 ; Huguet *et al.*, 2012). Cependant, ces modèles présentent des phénotypes plus légers que les modèles surexprimant des répétitions CTG non codantes seules.

La génération de modèles inductibles a donc permis une expression plus forte des répétitions grâce à des promoteurs robustes. L'induction de 960 répétitions interrompues ((CTG<sub>20</sub>)CTCGA), codées par l'exon 15 du gène *DMPK*, dans le cœur entraîne une mortalité précoce chez la souris, associée aux caractéristiques de la maladie (foci, atténuation de MBNL1 et surexpression de CELF1) (Wang *et al.*, 2007). De même, l'expression de cette construction dans le muscle reproduit les phénotypes musculaires et les déterminants de la DM1 (Orengo *et al.*, 2008). Enfin, l'expression de répétitions CTG à partir de la région 3'NT de *DMPK* associée à une construction GFP a montré le lien entre le nombre de CUG exprimé et la sévérité des symptômes musculaires (Storbeck *et al.*, 2004).

Dans le même temps, le rôle des protéines MBNL et CELF a été étudié dans des modèles murins en recréant une atténuation de *MBNL* par KO ou bien une stabilisation de CELF en surexprimant la protéine, permettant de souligner leur rôle primordial dans l'épissage alternatif au cours du développement (Kanadia *et al.*, 2003a ; Timchenko *et al.*, 2004 ; Ho *et al.*, 2005a ; Ward *et al.*, 2010 ; Charizanis *et al.*, 2012 ; Poulos *et al.*, 2013). Ceux-ci ont reproduit les défauts d'épissage observés dans les modèles DM1, notamment pour *Cln1* pour le KO de *Mbnl1* et *Mbnl2* (Kanadia *et al.*, 2003a ; Hao *et al.*, 2008) mais aussi une atteinte musculaire pour les modèles murins KO pour les trois membres de la famille *MBNL* (Kanadia *et al.*, 2003a ; Hao *et al.*, 2008 ; Poulos *et al.*, 2013). Pour CELF,





plusieurs modèles de surexpression ont aussi montré des défauts d'épissage pour *Tnnt2* et *Cln1*, tout comme l'implication de CELF1 dans les symptômes cardiaques (Ho *et al.*, 2005a ; Koshelev *et al.*, 2010). Les modèles murins d'étude de ces deux protéines, déjà abordés dans le chapitre « Mécanisme de gain de fonction de l'ARN toxique *dmpk* », sont récapitulés dans le tableau 12.

- Les modèles DM1 chez le poisson zèbre

Le modèle *Danio rerio* présente plusieurs avantages et notamment celui de pouvoir être utilisé pour des cribles à grande échelle afin d'identifier des molécules ou des acteurs génétiques qui pourraient modifier la sévérité des phénotypes observés dans ce modèle DM1.

Tout d'abord, le poisson zèbre a été utilisé pour mieux comprendre le rôle de la protéine MBNL2 (Machuca-Tzili *et al.*, 2011). L'utilisation de morpholinos (anti-sens qui bloque généralement la traduction) dirigés contre *MBNL2* a montré son implication dans le développement embryonnaire puisque les morphants (poissons présentant l'atténuation de *MBNL2*) développent des symptômes musculaires et cardiaques associés à ceux de la DM1, y compris des défauts d'épissage (Machuca-Tzili *et al.*, 2011).

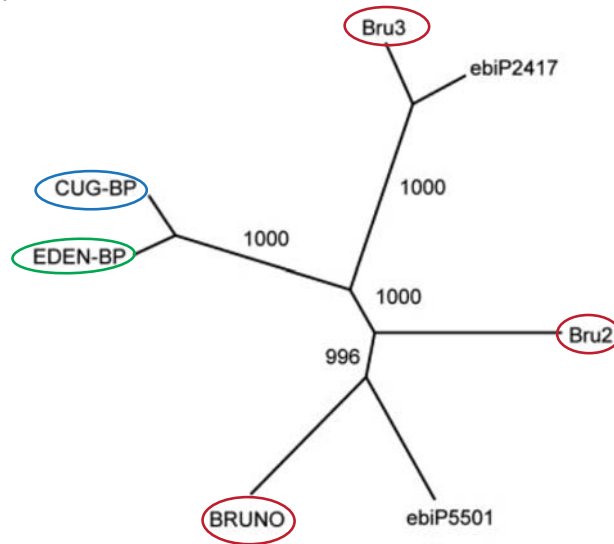
Plus récemment, un modèle poisson zèbre de la DM1 a été développé, par injection dans l'embryon d'une construction exprimant la GFP associée à 91 CUG (Todd *et al.*, 2014). Les embryons injectés présentent une survie affectée, la présence de foci ainsi que des défauts de locomotion associés à des défauts d'épissage, des défauts qui sont améliorés par l'apport de la protéine MBNL2. Cependant, à l'âge adulte, aucune déficience motrice n'est observée (Todd *et al.*, 2014). Ce modèle a notamment permis de montrer que la pseudouridylation des CUG diminue leur toxicité (deLorimier *et al.*, 2014).

- Les modèles DM1 chez le nématode

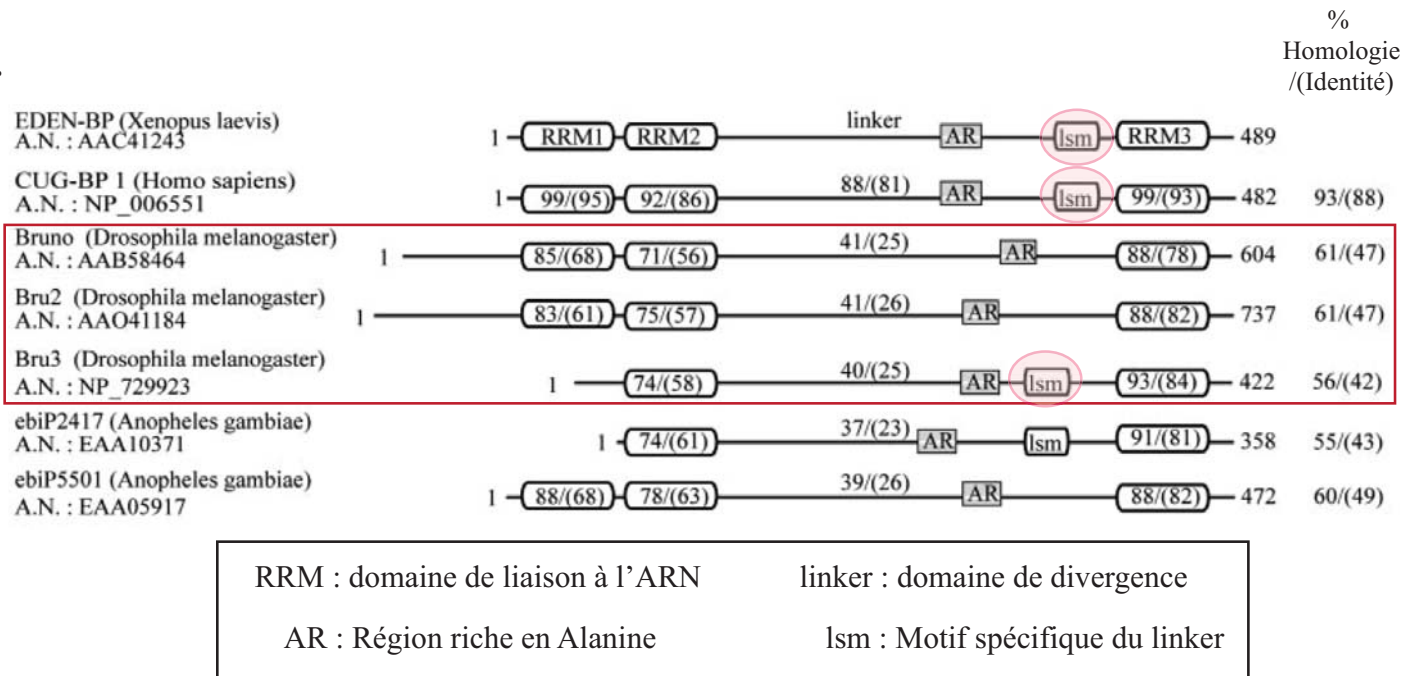
Dès 2007, le modèle *C.elegans* a été utilisé pour modéliser la DM1 et notamment pour comprendre la corrélation entre le nombre de CTG et la sévérité des symptômes. L'expression musculaire d'un nombre croissant de CUG (5, 30, 83, 125 et 213) associées à la GFP a montré l'existence d'un seuil au-delà duquel une toxicité apparaît, associée à une mortalité précoce et des défauts musculaires pour les vers exprimant le plus de répétitions (125 CUG et 213 CUG) (Chen *et al.*, 2007).

Plus récemment, le modèle avec 125 CUG a montré la formation de foci, colocalisant avec l'orthologue de MBNL1 (CeMBL), dont la surexpression dans ce modèle atténuerait les phénotypes musculaires (Wang *et al.*, 2011). L'étude de l'atténuation de cette protéine a

A.



B.



**Figure 40. Conservation des protéines CELF chez la drosophile.**

A. Concernant l'homologie avec CELF1, trois gènes codent pour des protéines de cette famille chez la drosophile : bruno (bru) ou Arrest, bruno-2 (bru-2) et bruno-3 (bru-3). Chez le xénope, EDEN-BP possède une très forte conservation avec CELF1 (ou CUGBP1). B. Ces protéines possèdent des domaines de liaison à l'ARN de type RRM très conservés au cours de l'évolution. Chez la drosophile, la comparaison des protéines Bru, Bru-2 et Bru-3 (encadré rouge) avec la protéine CELF1 humaine et EDEN-BP du xénope a montré une conservation de bru-3 avec CELF1 et EDEN-BP : seul Bru-3 possède un domaine commun avec EDEN-BP et CELF1, le domaine lsm (« linker-specific motif », en rose) et est capable de se lier au domaine EDEN, motif nécessaire à la déadénylation et donc à l'inhibition de la traduction. *Adapté d'après Delaunay et al., 2004.*

reproduit des défauts musculaires chez l'adulte et un défaut de locomotion qui serait dû à un défaut de formation des synapses (Wang *et al.*, 2008; Spilker *et al.*, 2012).

Enfin, un modèle récent a fait l'objet d'un crible pour identifier des modificateurs de la sévérité des phénotypes musculaires, augmentant les défauts de locomotion des vers exprimant 213 CUG en particulier (Garcia *et al.*, 2014). Parmi ces gènes, *smg2* code pour une hélicase impliquée dans le mécanisme de dégradation non-sens des ARNms (« Nonsense-mediated decay » ou NMD), mécanisme conservé et qui pourrait être utilisé comme outil thérapeutique pour la DM1 (Garcia *et al.*, 2014).

Dernièrement, le rôle des protéines CELF a été étudié chez le nématode et en particulier sa fonction dans l'épissage alternatif des syntaxines, protéines transmembranaires spécifiques des extrémités neuronales et impliquées dans l'exocytose des neuromédiateurs (Chen *et al.*, 2016). Des analyses de CLIP-seq ont permis d'identifier des cibles directes de l'orthologue de CELF chez le nématode, cibles qu'il pourrait être intéressant d'analyser dans d'autres modèles et qui pourraient être impliquées dans les symptômes du système nerveux chez les patients.

- Les modèles DM1 de drosophile

Tout comme le poisson zèbre et le nématode, la drosophile est un modèle d'étude simple présentant un développement rapide et une utilisation en laboratoire peu coûteuse (en comparaison de la souris), permettant son utilisation pour des cribles ou des analyses transcriptomiques à grande échelle (Sparrow *et al.*, 2008).

De plus, comme cela a déjà été abordé dans les chapitres précédents, la présence d'un seul orthologue chez la drosophile pour MBNL1 (Muscleblind, Mbl) simplifie l'analyse du rôle de la protéine dans la pathogenèse DM1 (Artero *et al.*, 1998).

Concernant l'homologie avec CELF1, trois gènes codent pour des protéines de cette famille chez la drosophile : *bruno* (*bru*) ou *Arrest*, *bruno-2* (*bru-2*) et *bruno-3* (*bru-3*) (Good *et al.*, 2000 ; Delaunay *et al.*, 2004). (**Figure 40**). Pour rappel, ces protéines possèdent des domaines de liaison à l'ARN de type RRM, très conservés entre les membres de cette famille. D'un point de vue phylogénétique, *bru* serait l'orthologue de *CELF1* (Good *et al.*, 2000 ; Delaunay *et al.*, 2004). Cependant, la comparaison des protéines Bru, Bru-2 et Bru-3 chez la drosophile avec l'orthologue de CELF1 chez le xénope, EDEN-BP (90% d'identité avec CELF1) a montré une plus forte conservation de *bru-3* avec ces deux protéines (Delaunay *et al.*, 2004). En effet, seul Bru-3 possède un domaine commun avec EDEN-BP et CELF1, le

	Nombre de répétitions CTG	Phénotype observé	Référence
<b>Modèles de drosophile De la DM1</b>	11, 48, 56 et 162 CTG clonées en aval du gène <i>DMPK</i> humain	Foci nucléaires, colocalisation avec Mbl, Pas d'effet majeur sur la survie ni sur le muscle	Houseley <i>et al.</i> , 2005
	20 et 480 CTGi (interrompues)	Foci muscles larvaires, adultes Dégénérescence musculaire restaurée par hMBNL1 et aggravée par hCELF1	De Haro <i>et al.</i> , 2006
	12, 240 et 480 CTGi	Foci nucléaires mais pas de défaut de survie, ni de défaut important dans les muscles	Le Mée <i>et al.</i> , 2008
	60 à 480 CTG ( <i>UAS-i480CTG</i> )	Dégénérescence musculaire adulte, diminution de l'espérance de vie, Dérégulation de l'épissage	Garcia-Lopez <i>et al.</i> , 2008 et 2011; Fernandez-Costa <i>et al.</i> , 2013
	240, 480, 600 et 960 iCTG	Foci nucléaires, analyse du muscle larvaire (défauts de fusion, hypercontractibilité) et analyse transcriptomique	Picchio <i>et al.</i> , 2013 <i>Cf RESULTATS</i>
	250 CTG pures	Toxicité dépendante des répétitions CTG, Production de siARN par les répétitions CTG/CAG	Yu <i>et al.</i> , 2011
	<i>UAS-i480CTG</i> inductible par choc thermique	Atrophie musculaire chez l'adulte, augmentation de l'autophagie et de l'apoptose	Bargiela <i>et al.</i> , 2015
	20 et 250 CTG pures exprimées dans le coeur	Analyse de la physiologie cardiaque adulte à 1 semaine, foci dans les cardiomyocytes, atteinte systolique et diastolique	Chakraborty <i>et al.</i> , 2015

**Tableau 13. Les modèles de drosophile de la DM1.**

domaine lsm (« linker-specific motif ») et est capable de se lier au domaine EDEN, motif nécessaire à la déadénylation et donc à l'inhibition de la traduction (Paillard *et al.*, 1998; Delaunay *et al.*, 2004). De plus, le premier modèle DM1 de drosophile a été utilisé pour analyser l'effet des CTG sur la fonction connue de Bru dans l'ovogenèse mais aucun défaut de fertilité n'a été observé chez la femelle (Houseley *et al.*, 2005).

Enfin, le rôle de *bru-3* comme orthologue de CELF1 dans la DM1 a été plus largement analysé par L. Picchio durant sa thèse (manuscrit en préparation), permettant de montrer son expression dans le muscle larvaire. Sa surexpression entraîne un défaut de locomotion des larves, comme ce qui a été observé dans le modèle DM1 qui sera détaillé plus loin (Picchio *et al.*, 2013).

La présence d'orthologues de MBNL1 et CELF1 fait donc de la drosophile un bon modèle d'étude pour la DM1 (**Tableau 13**), dont le premier modèle généré a permis de mettre en évidence la présence de foci dans les tissus surexprimant 162 CTG, clonées dans la région 3'NT du gène *DMPK* humain (Houseley *et al.*, 2005). Ces foci sont formés par les répétitions qui colocalisent avec la protéine Mbl. Cependant, ni la survie ni la structure du muscle n'étaient affectées dans ce modèle.

Un modèle qui a permis de mieux comprendre la pathogenèse de la DM1 est celui de l'équipe de Juan Botas qui consistait à exprimer 20 ou 480 répétitions CTG non codantes et interrompues de manière tissu et temps-spécifique grâce au système Gal4/UAS (de Haro *et al.*, 2006). Ces répétitions interrompues ((CTG<sub>20</sub>)CTCGA) avaient déjà été utilisées en 1998 dans un modèle cellulaire afin de montrer le rôle de la protéine CELF1 sur l'épissage de la Troponine cardiaque, épissage altéré en présence des répétitions (Philips *et al.*, 1998). L'expression des grandes répétitions chez la drosophile a permis d'observer des foci dans les muscles larvaires et adultes, associés à une perte de la capacité à voler pour les mouches adultes. Ceci était corrélé à une dégénérescence des muscles de vol, qui pouvait être restaurée par l'expression de la protéine humaine MBNL1 dans ces muscles. De plus, la surexpression de la protéine CELF1 humaine aggrave les phénotypes observés dans le muscle en contexte DM1<sub>480</sub>. Ce modèle a donc montré l'implication des protéines MBNL1 et CELF1 dans la DM1 (de Haro *et al.*, 2006).

Peu après, un autre modèle exprimant un nombre croissant de répétitions CTG (16, 240, 480) a été généré à partir des mêmes séquences interrompues provenant de l'équipe de Thomas Cooper (Le Mée *et al.*, 2008). L'expression de ces constructions (240 et 480 CTG) dans les glandes salivaires, les muscles larvaires et dans les ovaires a permis de reproduire la



formation de foci nucléaires, hormis pour la construction avec peu de répétitions (16 CTG). Comme pour le premier modèle, aucun défaut de survie n'a été observé sur ces mouches adultes exprimant de manière ubiquitaire les répétitions. Cependant, une lignée (CTG<sub>240.4</sub>) a démontré une forte toxicité des répétitions dans l'œil ainsi qu'une forte létalité quand les répétitions étaient exprimées de manière ubiquitaire. Tout comme le modèle de Houseley (Houseley *et al.*, 2005), ces deux études n'ont donc pas permis de reproduire les symptômes de la maladie observés chez les patients malgré la présence de foci, la caractéristique principale de la DM1. Les résultats divergents obtenus pour les deux études ayant utilisé la même construction (iCUG<sub>480</sub>) pourraient être dus à une différence d'intégration des transgènes dans le génome étant donné l'utilisation de la même méthode de transgénèse par élément-P (de Haro *et al.*, 2006 ; Le Mée *et al.*, 2008).

Un troisième modèle présentant 480 répétitions CTG interrompues (UAS-i480 CTG) a été généré en 2008 dans le laboratoire de Ruben Artero, afin d'être utilisé pour des cribles à grande échelle et a permis d'identifier des modificateurs génétiques et chimiques de la toxicité induite par les répétitions (Garcia-Lopez *et al.*, 2008). Ces mouches exprimant 480 CTG présentent une dégénérescence des muscles de vol et des yeux, mais aussi un défaut de survie, associés à des foci colocalisant avec la protéine Mbl, orthologue de MBNL1. Ce modèle reproduit aussi les défauts d'épissage déjà identifiés dans d'autres modèles, comme pour la Troponine T. Un crible réalisé en se basant sur le phénotype des yeux a permis d'identifier des modificateurs de la toxicité impliqués dans le remodelage de la chromatine, l'apoptose, des composants de la matrice extracellulaire ou encore régissant le transport des ARNm (Garcia-Lopez *et al.*, 2008). Par la suite, un autre crible sur ce même modèle a été réalisé à partir d'une librairie composée de 120 mélanges de plusieurs millions d'hexapeptides (García-López *et al.*, 2011). Cette étude a identifié le peptide ABP1 (Ac-ppyawe-NH<sub>2</sub>) qui est capable de supprimer la toxicité induite par les CUG en réduisant la formation de foci et la séquestration de Mbl. De plus, l'expression de cette molécule dans un modèle murin DM1 (HSA<sup>LR</sup>) permet de restaurer en partie un épissage normal de *Sercal* et *Tnnt3* (García-López, 2011). Ce modèle a aussi permis d'investiguer la perturbation des miARNs dans le muscle et a montré la dérégulation de 20 miARNs dans les muscles de mouches qui surexpriment 480 CTG dans le muscle adulte (Mhc>480 CTG), et en particulier *miR-1* et *miR-7* dont l'expression est aussi dérégulée dans des myoblastes issus de fibroblastes de patients DM1 (Fernandez-Costa *et al.*, 2013). Cette perturbation d'expression est due à l'altération de la





maturation des pré-miARNs en miARNs matures et serait dépendante de l'atténuation de Mbl chez la drosophile.

La même année, L. Picchio dans notre équipe a généré de nouveaux modèles DM1 présentant un nombre croissant de répétitions CTG (240, 480, 600 et 960 CTG) insérés de manière site-spécifique dans le génome de la drosophile (Picchio *et al.*, 2013). Ce modèle, pour lequel j'ai participé à l'analyse de gènes candidats, sera développé dans la partie **Résultats**. Les deux avantages de ce modèle par rapport aux autres sont i) l'insertion site-spécifique des différentes constructions permettant l'analyse en parallèle des différents modèles sans effet de position possible de l'insertion et ii) l'utilisation de lignées avec un grand nombre de répétitions (600 et 960 CTG) par rapport à ce qui a déjà été étudié, permettant l'étude de la corrélation entre nombre de répétitions et sévérité des symptômes.

Plus récemment, le modèle d'Artero a été modifié pour induire l'expression des 480-iCTG par choc thermique et ainsi permettre de les exprimer uniquement chez l'adulte dans une fenêtre de temps restreinte (Bargiela *et al.*, 2015). Ce modèle d'induction développe une atrophie musculaire démontrée par un phénotype des ailes « en l'air » (« up-held wings » en anglais). Ce phénotype est associé à une augmentation des processus d'autophagie et d'apoptose, restauré lorsque *Mbl* est surexprimé dans la condition 480-iCTG induite. Le rôle de ces voies de signalisation, apoptose et autophagie, dans le déclenchement de l'atrophie musculaire a été confirmé dans des biopsies musculaires de patients DM1 puisque plusieurs gènes inhibant ces deux voies sont retrouvés dérégulés négativement chez les patients, ce qui pourrait entraîner une augmentation de l'apoptose et de l'autophagie et provoquer l'atrophie du muscle (Bargiela *et al.*, 2015).

Enfin, la même équipe a généré l'an dernier un nouveau modèle inductible de 20 et 250 CTG répétitions CTG pures (c'est-à-dire non interrompues) pour étudier les phénotypes cardiaques dans la DM1 (Chakraborty *et al.*, 2015). Cette étude a montré la présence de foci dans les cardiomyocytes qui colocalisent avec la protéine Mbl, uniquement pour les mouches exprimant 250 répétitions dans le cœur. Ces répétitions provoquent une diminution de l'espérance de vie avec une perte de la rythmicité cardiaque. De plus, ce modèle présente une atteinte systolique et diastolique à 1 semaine dont certains phénotypes sont restaurés par un traitement à la Pentamidine, une molécule qui serait capable de libérer Mbl de sa séquestration par les CUG (Chakraborty *et al.*, 2015).

L'utilisation des modèles animaux pour l'étude de la DM1 a donc permis des avancées majeures dans la compréhension du mécanisme responsable de l'atteinte multisystémique.



Aujourd'hui, ces nombreux modèles sont utilisés pour des analyses transcriptomiques par séquençage en masse afin d'identifier les dérégulations géniques ou les marqueurs moléculaires responsables de chaque symptôme de la maladie. De plus, ces modèles servent sur le plan thérapeutique via des cribles de molécules chimiques pour trouver des traitements afin de soulager les patients.

Cependant, de nombreux mécanismes restent encore mal compris et sont au cœur des thématiques de recherches de ces dernières années :

- la toxicité induite par la traduction ATG-indépendante associée aux répétitions ;
- la forme congénitale de la DM1, forme clinique la plus sévère de la maladie, dont les mécanismes moléculaires pourraient se distinguer des autres formes ;
- l'étude des mécanismes impliqués dans les symptômes du cerveau ;
- l'effet de la polyadénylation alternative (PAA) ;
- les enjeux thérapeutiques, et notamment la mise en place et l'utilisation de la technique de CRISPR/Cas9 en modèle murin ;
- le développement et l'étude de modèles DM2 qui pourraient permettre de mieux comprendre certains processus communs à la DM1 ;
- et enfin, l'atteinte cardiaque dans la maladie, mal comprise jusqu'ici.

---

Ce chapitre a permis de décrire la dystrophie myotonique de type 1 (DM1). Cette maladie extrêmement complexe implique divers mécanismes pathogéniques et en particulier le gain de fonction toxique de l'ARN muté, à l'origine des nombreux symptômes de la maladie. Notamment, l'atteinte musculaire se caractérise par de la myotonie, une faiblesse et une perte musculaires progressives alors que l'atteinte cardiaque représente la deuxième cause de mortalité chez ces patients, entraînant des défauts de conduction, une arythmie ou encore des défauts de structure du cœur. Nous avons aussi vu l'intérêt des modèles animaux vertébrés ou non pour une meilleure compréhension des mécanismes en jeu dans la pathologie et c'est dans ce but que nous avons créé et analysé au sein de l'équipe un nouveau modèle de drosophile de la DM1 pour étudier les symptômes musculaires et cardiaques de la maladie.

---



# **Objectifs de travail**



La dystrophie myotonique de type 1 ou DM1 est une maladie multisystémique affectant notamment le système musculaire et le cœur, sujet d'importance dans l'équipe de K. JAGLA s'intéressant aux « Mécanismes de la diversification des cellules musculaires et cardiaques au cours du développement normal et en conditions pathologiques », et qui utilise le modèle drosophile pour la compréhension de ces mécanismes.

- **Contexte du projet de thèse**

Lors de mon arrivée au laboratoire pour mon stage de Master II en 2012, un projet de génération d'un modèle de drosophile de la DM1 était en cours dans l'équipe, projet mené par Lucie PICCHIO (Doctorat obtenu en Décembre 2013). Ce projet visait à étudier les mécanismes impliqués dans la sévérité de la DM1, sévérité corrélée au nombre de répétitions CTG. Pour cela, les lignées transgéniques inductibles UAS-i240CTG, UAS-i600CTG et UAS-i960CTG, permettant l'expression de 240, 600 ou 960 répétitions CTG, de manière tissu-spécifique et au stade de développement souhaité (utilisation du système Gal4/UAS), ont été générées. De plus, la DM1 impliquant les facteurs d'épissage alternatif MBNL1 et CELF1, le rôle de ces facteurs dans notre modèle a été étudié à l'aide de ses orthologues chez la drosophile, respectivement Mbl et Bru-3. Pour cela, les lignées ARNi pour Mbl (mimant la séquestration de MBNL1 chez les patients) et gain de fonction pour Bru-3 (mimant la stabilisation de CELF1 due à sa phosphorylation) ont été testées.

- **Les objectifs et travaux réalisés**

Mon projet de thèse s'inscrit dans la continuité des études réalisées sur les modèles de drosophile de la DM1 générés au laboratoire par L. Picchio, et s'articule en deux parties :

Le premier projet initié au cours de mon stage de master II, visait à identifier de nouveaux gènes dérégulés dans la DM1 et impliqués dans la sévérité des phénotypes musculaires au stade larvaire puis à valider leur implication chez les vertébrés par l'analyse en cellules de patients et dans un modèle murin DM1 présentant un grand nombre de répétitions CTG (modèle DMSXL).

Dans ce cadre, j'ai contribué à la validation de gènes candidats identifiés par puce ADNc dont l'expression variait en contexte DM1. Parmi les gènes candidats, se trouvaient des gènes impliqués dans le métabolisme des sucres et de l'azote, dans le cycle Krebs et des composants sarcomériques. De plus, j'ai participé à l'analyse de la fonction de la protéine Mp20 dans les phénotypes de fusion en réalisant les comptages de noyaux dans les lignées combinant les





répétitions CTG (DM1<sub>240</sub>, DM1<sub>600</sub> et DM1<sub>960</sub>) et la surexpression de Mp20, confirmant l'implication de sa dérégulation dans nos modèles DM1 pour expliquer les défauts de fusion identifiés dans les muscles larvaires SBM et VL3. Les résultats de ce projet, mené lors de mon Master II et en début de thèse ont permis la publication suivante « **Novel *Drosophila* model of myotonic dystrophy type 1: phenotypic characterization and genome-wide view of altered gene expression**. Hum. Mol. Genet. 2013, 22 (14), 2795–2810 » pour laquelle je suis 2ème auteur.

La suite de ce projet visait à élargir la sélection de gènes candidats impliqués dans la sévérité musculaire dans notre modèle pour permettre l'identification d'acteurs moléculaires dérégulés et les relier aux symptômes musculaires observés chez les patients. Pour cela, nous nous sommes concentrés sur des gènes conservés chez l'Homme dont la dérégulation a été analysée en cellules de patients (biopsies de muscles de fœtus DM1, Collaboration D. Furling) ainsi que dans un modèle murin DM1 (DMSXL, Collaboration G. Gourdon).

Le second projet, cœur de mes travaux de thèse, avait pour but la caractérisation des phénotypes cardiaques dans les différents modèles DM1 de drosophile et d'identifier des gènes responsables des symptômes cardiaques observés chez les patients, en utilisant une approche transcriptomique spécifique du cœur.

Avec L. Picchio, nous avons réalisé l'analyse physiologique cardiaque des modèles DM1 (décrits ci-dessus) dans le cœur adulte à 1 semaine et 5 semaines, en utilisant la méthode SOHA, détaillée dans les résultats. Plus précisément, mon travail consistait à effectuer les analyses physiologiques en utilisant une lignée spécifique des cardiomyocytes (*TinCd4-Gal4*) et les comparer aux résultats déjà obtenus chez l'adulte avec une lignée pilote cardiaque *Hand-Gal4*, exprimée dans les cardiomyocytes et les cellules péricardiaques. Dans ces modèles, nous avons pu constater la présence d'une cardiomyopathie dilatée chez les mouches présentant une atténuation pour *Mbl* dans le cœur, des défauts de conduction dans les lignées ARNi pour *Mbl* et gain de fonction pour *Bru-3* et enfin, une augmentation de l'arythmie (fibrillation) dans le modèle *DM1<sub>960</sub>* et dans le gain de fonction *Bru-3* à 5 semaines.

Afin d'identifier les gènes responsables de ces défauts cardiaques, j'ai adapté une technique d'isolation ARN tissu-spécifique, le TU-tagging pour isoler les ARNs du cœur adulte de drosophile. Cette méthode cœur-spécifique nous a permis de récupérer les ARNs codants et non-codants issus des lignées pathologiques (*Hand>LacZ;HA-UPRT*, *Hand>MblRNAi;HA-*



*UPRT, Hand>Bru3;HA-UPRT* et *Hand>960CTG;HA-UPRT*) à 1 et 5 semaines et de les séquencer. L'analyse des phénotypes dans ces lignées « double » (transgène UPRT et transgène DM1) a confirmé les résultats obtenus dans les lignées précédentes qui portent un transgène DM1 uniquement. L'étude de gènes candidats dérégulés dans ces conditions a permis de montrer le rôle, notamment de *Stj* et *l(2)03659* dans l'apparition des phénotypes de conduction et de fibrillation. Ces candidats sont conservés chez l'Homme et leur dérégulation sera testée ultérieurement dans un modèle murin. Les résultats de ce projet sont regroupés dans un article à soumettre intitulé « ***Drosophila* models recapitulate myotonic dystrophy type 1 heart dysfunction and reveal gene deregulations underlying DM1-associated arrhythmia and conduction defects** » pour laquelle je suis 1er auteur.

Enfin, j'ai également analysé chez la drosophile, l'effet d'une surexpression dans le cœur de la protéine CELF1 humaine. Cette étude a montré l'implication forte de CELF1 dans les phénotypes contractiles.



# **Résultats et Discussion**



**I. Identification de nouveaux gènes impliqués dans la sévérité des phénotypes musculaires de la DM1 : utilisation du modèle drosophile au stade larvaire et étude translationnelle en cellules de patients et dans les muscles murins DMSXL**

**1. Résultats publiés dans HMG « Novel *Drosophila* model of myotonic dystrophy type 1: phenotypic characterization and genome-wide view of altered gene expression »**

Cette partie de mon projet de thèse a débuté durant mon stage de Master II pour lequel j'ai participé à la validation d'une analyse transcriptomique faite sur de nouveaux modèles de drosophile de la DM1. Il a fait l'objet d'une publication en 2013 dans le journal HMG où je suis deuxième auteur notamment pour ma contribution aux résultats des figures 5 et 6.

Dans un premier temps, la doctorante Lucie Picchio a généré différents modèles de la maladie : 3 lignées transgéniques de drosophile site-spécifique (chromosome 3), inductibles (système UAS/Gal4) et exprimant un nombre croissant de répétitions CTG (240, 600 et 960) interrompues ((CTG)<sub>20</sub>CTCGA) afin de mimer la sévérité de la maladie. L. Picchio a ensuite réalisé l'analyse phénotypique de ces modèles dans le muscle larvaire de stade 3 (L3) en utilisant la lignée pilote *Mef2-Gal4* qui permet l'expression des répétitions CTG dès le développement embryonnaire et durant tous les stades larvaires. Les larves L3 *Mef2>600ctg* et *Mef2>960ctg* présentent des foci dans les noyaux musculaires, caractéristique principale de la DM1 alors que dans le modèle avec peu de répétitions (*Mef2>240ctg*), aucun foci n'a été détecté. De plus, la colocalisation de Mbl avec les répétitions a permis de confirmer que la protéine est séquestrée par les répétitions, justifiant l'analyse d'une lignée atténuée pour *Mbl* (*UAS-MblRNAi*), orthologue de *MBNL1* pour étudier le rôle de *Mbl* dans la pathogénèse.

La locomotion de ces modèles a ensuite été analysée par deux tests, mesurant le nombre de contractions pendant 30 secondes et par un test de retournement. Ils ont montré une altération de la mobilité, plus importante dans les lignées *Mef2>MblRNAi* et *Mef2>960ctg* et associée à des défauts musculaires comme des fibres manquantes, surnuméraires ou bien fendues (« splitting »). De plus, les muscles de ces modèles sont plus petits et présentent un nombre de noyaux réduits, suggérant la perturbation du processus de fusion musculaire. En effet, les muscles ne font que croître durant les stades larvaires et donc le nombre de noyaux dans ces modèles reflète les événements de fusion qui ont eu lieu durant la myogénèse embryonnaire. Enfin, cette analyse phénotypique a aussi démontré la présence d'une hypercontractibilité dans ces modèles DM1, dépendante de Mbl.





Afin d'identifier des gènes dérégulés et responsables de ces défauts musculaires, une analyse transcriptomique a été effectuée sur ces quatre modèles, les trois lignées DM1 (240, 600 et 960) et la lignée atténuée pour *Mbl*. Mon projet de Master II consistait à valider l'implication de gènes candidats en confirmant leur dérégulation par RT-qPCR. La sélection de la première partie de ces candidats a été réalisée par L. Picchio : elle s'est focalisée sur des gènes dérégulés négativement et impliqués dans le cycle de Krebs, la glycolyse, le métabolisme des sucres et de l'azote mais aussi dans le métabolisme d'oxydation-réduction, des voies de signalisation primordiales pour la formation et le fonctionnement musculaire.

Parmi les candidats validés, nous avons identifié des gènes dérégulés de différentes manières et notamment dépendants du nombre de répétitions CTG (CTG-dépendants) c'est-à-dire dérégulés plus fortement dans la lignée DM1<sub>960</sub> que dans la lignée DM1<sub>600</sub> comme *Amy-d* impliqué dans les premières étapes de la glycogénolyse ou *CG32444* qui permet l'isomérisation du glucose. D'autres gènes étaient dérégulés de manière dépendante à la fois des répétitions CTG et de l'atténuation de *Mbl* (*Mbl*-dépendants) comme *CG9466* ou *CG9468* qui participent à la dégradation des glycanes. Parmi les gènes *Mbl*-dépendants, certains gènes codent pour des transcrits uniques, c'est-à-dire ne présentant qu'une seule isoforme connue et ne sont donc pas soumis à l'épissage alternatif. Cette troisième catégorie suggère un effet de *Mbl* en dehors de sa fonction d'épissage alternatif (Figure 5).

L'intérêt principal de nos modèles étant l'analyse possible de la corrélation entre le nombre de répétitions et la sévérité de la maladie, nous nous sommes ensuite focalisés sur des gènes CTG-dépendants, et dont les résultats de puce ADNc montraient une différence de dérégulation entre les larves *Mef2>600ctg* et *Mef2>960ctg*. Nous avons en particulier validé la dérégulation sensible aux répétitions pour des gènes impliqués dans la structure des sarcomères comme *Mhc* (orthologue de *MYH*) et *Up* (orthologue de la *troponine T*) et dans le transport (*CG17597* et *Smt*) (Figure 5).

Concernant les défauts de fusion dans nos modèles, nous avons caractérisé en particulier le rôle du gène *Mp20* (*Muscle Protein 20*), dont l'expression est diminuée dans nos modèles et identifié précédemment dans notre équipe comme un régulateur positif de la fusion (Bataillé et al., 2010). Nous avons validé par RT-qPCR la diminution d'expression de ce gène dans les larves DM1 confirmant son implication possible dans les défauts de fusion. Ensuite, nous avons pu montrer une restauration d'un nombre normal de noyaux dans les muscles larvaires ventraux (VL3 et SBM) des lignées DM1 pour lesquels nous avons surexprimé la protéine Mp20 (Figure 6).



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

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

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

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

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

## INTRODUCTION

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

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

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

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

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

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

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

## RESULTS

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

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

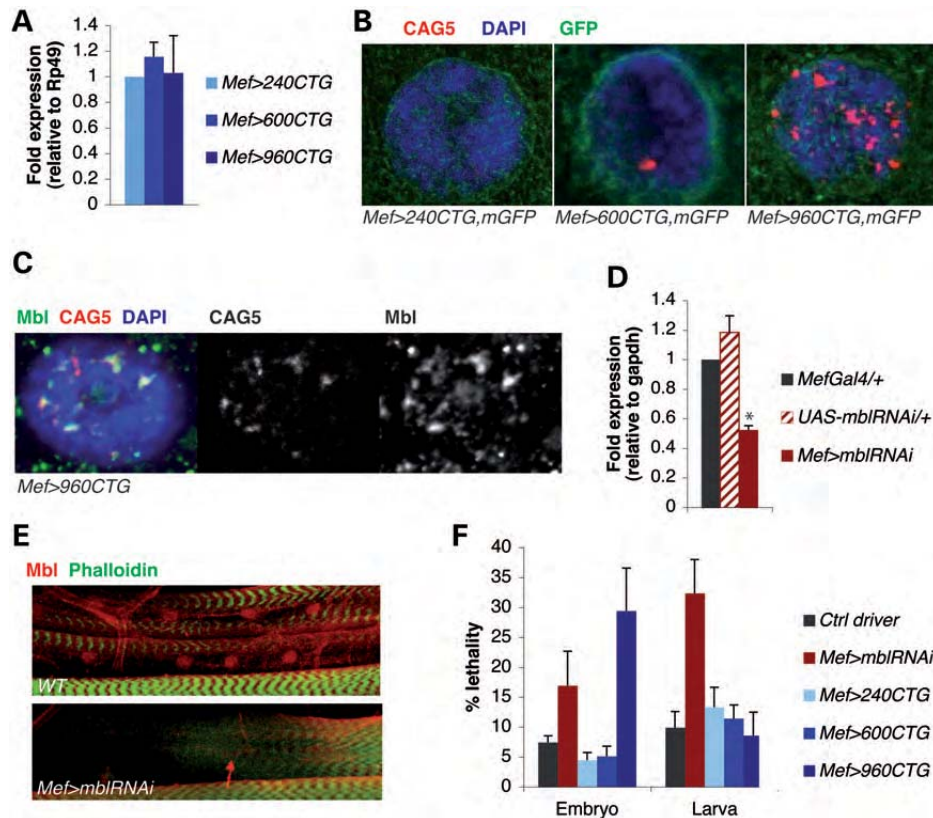
including our model. To avoid effects of insertion sites on transgene expression, we applied a phage C31 integrase-driven site-specific transgenesis system (25,26). In previously described *Drosophila* DM1 models, only adult muscles and in particular the indirect flight muscles have been targeted and analyzed. However, there are two waves of myogenesis during the *Drosophila* life cycle. The first wave leads to the formation of larval musculature. The second wave, occurring during metamorphosis, gives rise to the adult fly muscles. We reasoned that targeting muscle cells from the early developmental stages with increasing number of repetitions would result in affecting larval muscles. To test this hypothesis, we first analyzed larval muscles for nuclear foci formation which are associated with DM1 pathogenesis (5,6). When crossed to a muscle-specific *Mef-GAL4* driver, the *UAS-iCTG* repeat lines led to the synthesis of a non-coding RNA expressed at the same level in larval somatic muscles in all DM1 lines (Fig. 1A). Nevertheless, the longer the repeats are, the more foci we could detect in larval muscle nuclei. No foci could be observed in the DM1<sub>240</sub> line, only few foci were detected in DM1<sub>480</sub> (not shown) or DM1<sub>600</sub> lines, whereas numerous foci were present in the DM1<sub>960</sub> line (Fig. 1B). Since in a given line all muscle nuclei displayed a similar pattern of foci, we estimate that the *Mef-GAL4*-induced pan-muscular expression of the *iCTG* transgenes was relatively homogenous. Thus, the presence and the repeat-size-dependent abundance of nuclear foci suggest that larval musculature can be suitable for analyzing DM1 phenotypes.

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

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

### Reduced motility and affected muscle morphology of DM1 larvae

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

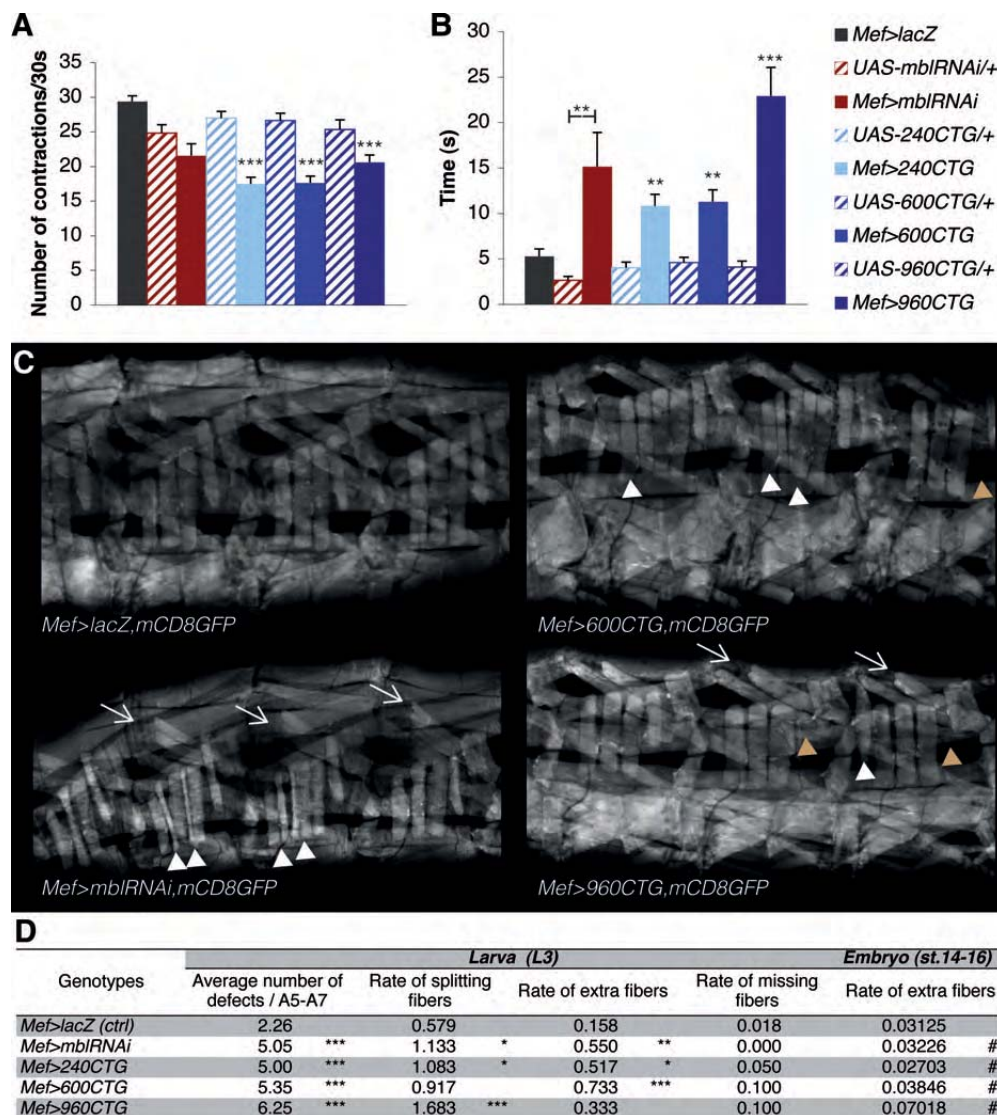


**Figure 1.** Validation of a new site-specific larval *Drosophila* model of DM1 and Mbl attenuated line. (A) RT-qPCR shows that site-specific third instar larvae expressing 240 CUG, 600 CUG and 960 CUG repeats in somatic muscles produce the same level of CUG transcripts. (B) *In situ* hybridization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

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

in the line *Mef*>240CTG which did not display detectable foci. In order to understand why motility is impaired, we analyzed the morphology of muscles and their pattern in mutant lines. We found several morphological abnormalities in body wall musculature of *Mef*>*mblRNAi* and DM1 larvae such as muscle splitting as well as loss of muscle fibers or presence of extra fibers (Fig. 2C). The average number of defects observed was significantly increased in pathological lines compared with the control line. Interestingly, the greater the number of repeats in DM1 lines, the more morphological defects we observed (Fig. 2D), a phenotype that correlates with the affected motility (Fig. 2B). The only exception was the DM1<sub>960</sub> line, which displayed a significantly increased rate of splitting muscles compared with other DM1 lines, but a lower rate of extra fibers (Fig. 2D). We hypothesized that extra fibers could be a consequence of splitting that the affected muscles underwent from one end to the other. As we did not detect any extra fibers in DM1 embryos (Fig. 2D), extra fibers do not form by abnormal specification,



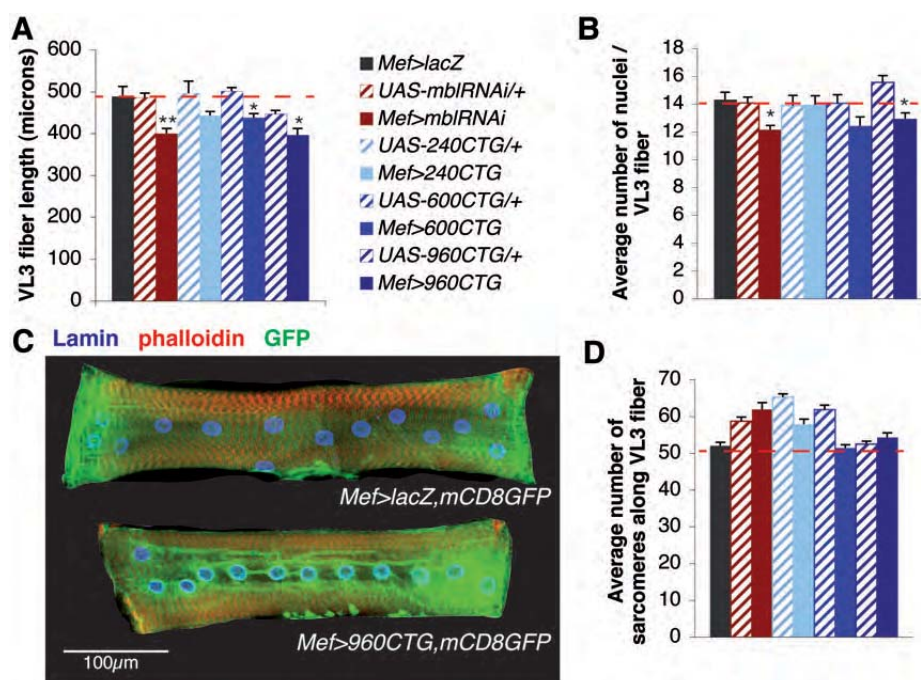


**Figure 2.** Altered motility in DM1 larvae is associated with an affected muscle pattern including splitting fibers. (A and B) Third instar larvae behavioral assays. (A) DM1 larvae display a crawling phenotype compared with controls (driver control and transgenic control). The graph shows the average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

but rather result from the affected integrity of growing muscles, leading to their fragmentation during larval stages. In the case of the DM1<sub>960</sub> line, which exhibited relatively high lethality during the late embryonic stage (Fig. 1E), a reduced rate of extra fibers observed may be due to the fact that individuals with increased muscle fragmentation do not survive until the first larval instar.

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

size of relaxed VL3 fibers was significantly decreased in DM1<sub>600</sub> and DM1<sub>960</sub> lines and in the line attenuated for *mbl* compared with their respective controls. Besides that, the number of nuclei per muscle was significantly reduced (Fig. 3B and C), indicating that the fusion process was affected in these pathological lines and that Mbl was involved in regulating myoblast fusion. The same observation was made in SBM fibers where fusion was also affected in all these lines (Supplementary Material, Fig. S1B and C). As the fusion process takes place in embryonic and not in larval stages, we conclude that the defects observed in larval muscles result in part from the deleterious effects of CTG repeats on



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

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

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

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

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

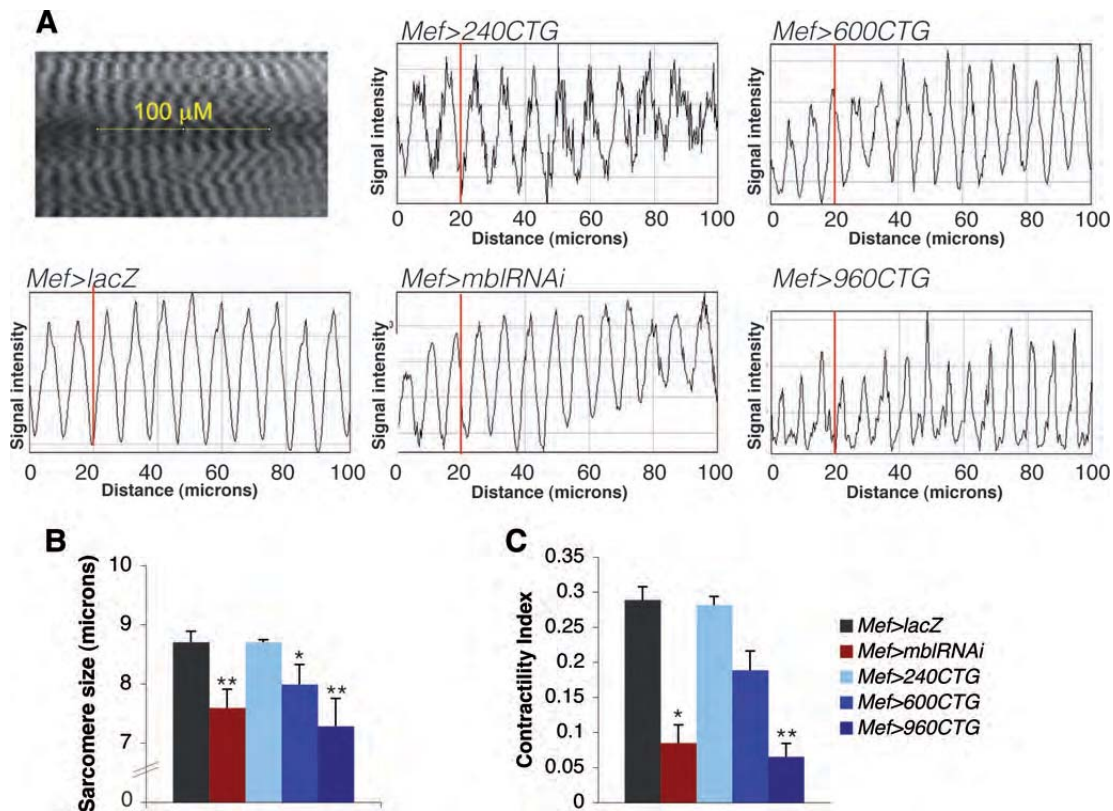
fiber scale. To confirm this possibility, we measured the contractility index of each line by comparing the size of fibers relaxed with EDTA with the size of contracted fibers. We observed that the contractility index was strongly affected in the line attenuated for *mbl* and in the DM1<sub>960</sub> line (Fig. 4C). We expected that in these two genetic contexts, fibers would not undergo efficient relaxation when treated with EDTA and thus display a particularly low contractility index. Several channels already shown to be mis-spliced in the disease, such as the chloride channel 1 (11) and possibly the Ca pump SERCA (30) could be responsible for this phenotype.

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

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

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





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

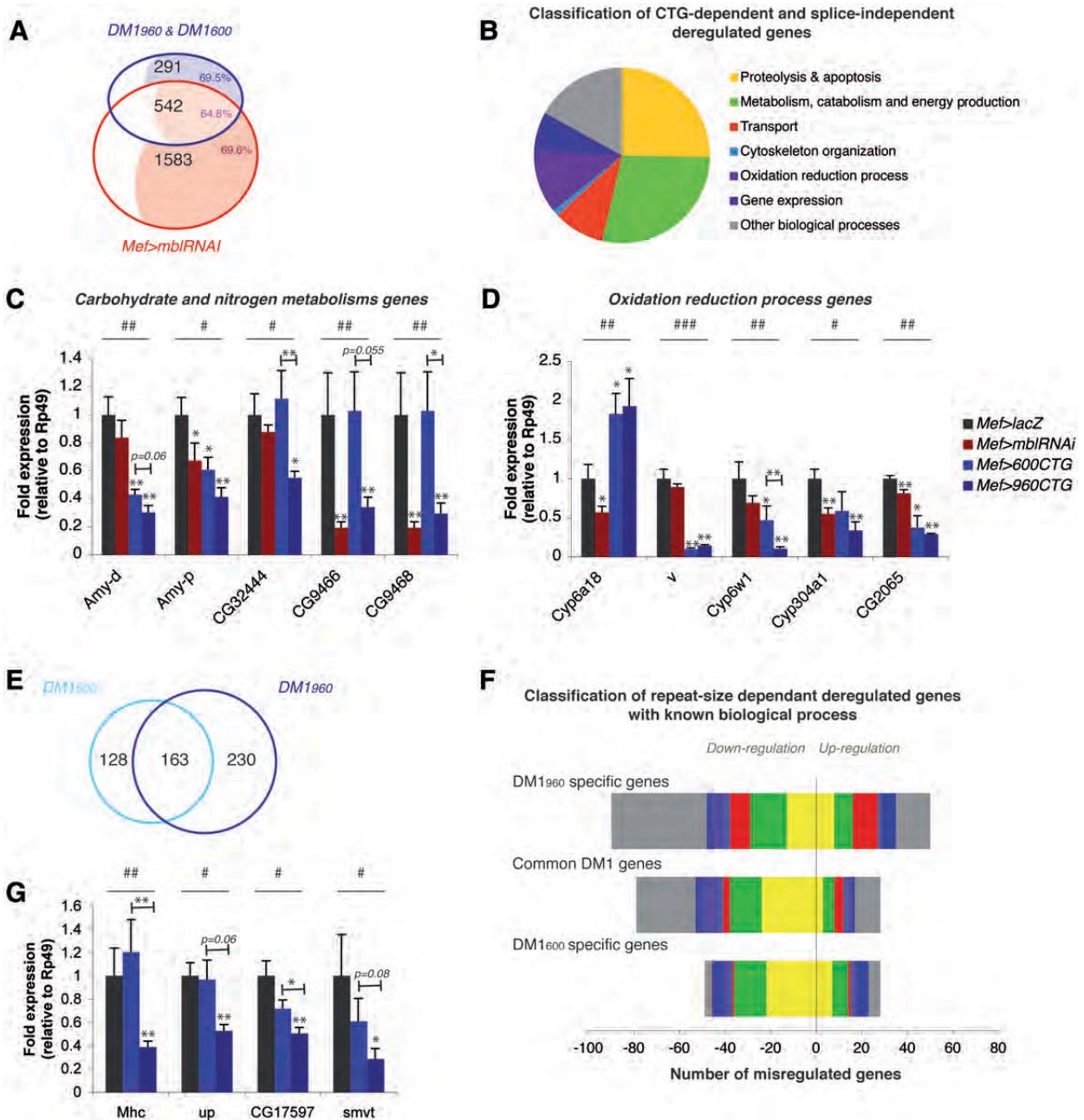
genes (Supplementary Material, Table S1) in *Mef>600CTG* and *Mef>960CTG* contexts, those whose expression changed in CTG repeat lines but not in the *Mef>mbIRNAi* line (Fig. 5A) represented ~35% (291 genes out of 833 with at least 2-fold up- or down-regulation).

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

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

#### A global view of repeat-size-dependent gene deregulation

Interestingly, in the validation experiments presented above, we observed that expression of *Amy-d*, *CG32444*, *CG9466*, *CG9468* and *Cyp6w1* was more strongly affected in the DM1<sub>960</sub> line than in the DM1<sub>600</sub> line (Fig. 5C and D and Supplementary Material, Table S3a). This prompted us to classify identified candidate genes with a more stringent fold-change threshold (2.3) to determine whether some biological processes are sorted out as being affected in a repeat-size-dependent manner (Fig. 5E and F). We assigned misregulated candidates to three groups: DM1<sub>600</sub>-specific genes, DM1<sub>960</sub>-specific genes and common DM1 genes. We note (i) that more genes were deregulated in the DM1<sub>960</sub> condition than in the DM1<sub>600</sub> line (Fig. 5E) and (ii) that they were most



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

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

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

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

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

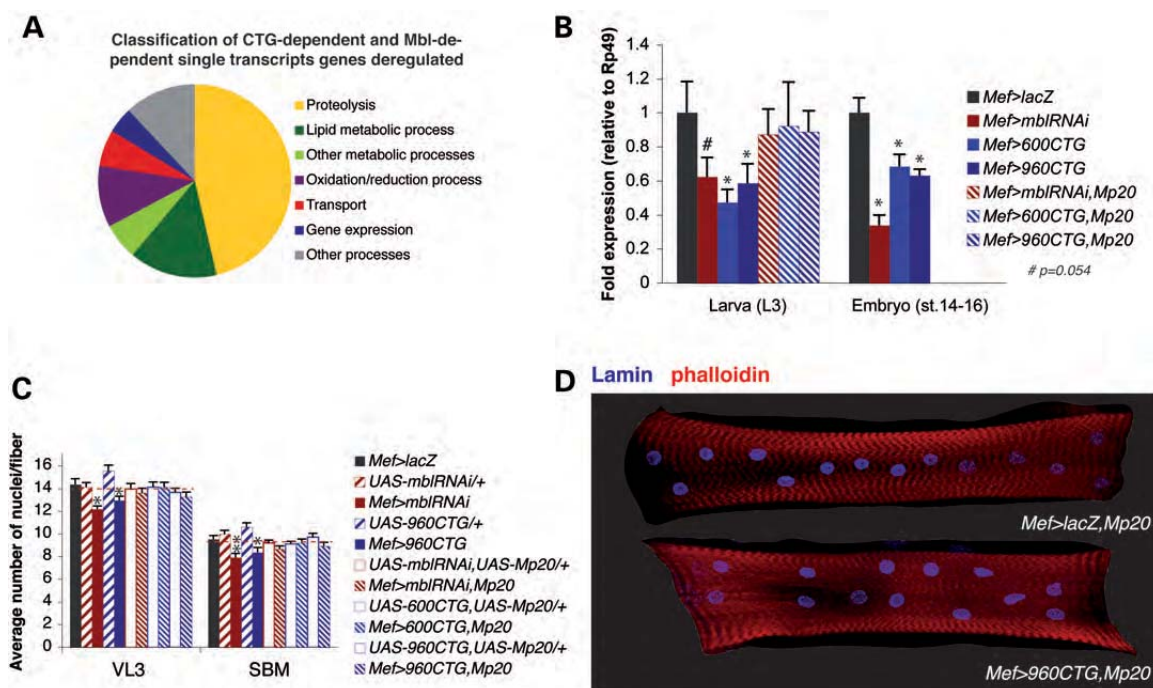
phenotypes (Fig. 6C and D), reestablishing wild type-like numbers of nuclei.

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

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

As shown previously, both DM1 lines and the *mbl* attenuated line exhibited altered contractility (Fig. 4C), which could be due to a transcriptional deregulation or mis-splicing of calcium channels and/or chloride channels. Interestingly, among the common *in silico*/microarray Mbl targets identified we found *dSERCA* encoding a calcium pump. Since *in silico* prediction sorted out *dSERCA* as a target of the Mbl splicing factor and microarray data revealed differential expression of only a subset of *dSERCA* probes, it seems likely that *dSERCA* transcripts could be mis-spliced in DM1 muscles as already observed for *SERCA1* in patients' muscles (30). More precisely, the position of differentially expressed microarray probes suggests that the isoforms containing exon 8 or 11, encoding a sequence for the putative transmembrane domain (according to prosite scan software), could be down-regulated. In order to confirm that *dSERCA* was mis-spliced, we performed an RT-qPCR with a set of primers designed to specifically recognize the exons (8 or 11) coding for the transmembrane domain, and another set of primers designed to target the exons specific to the isoform A (exons 13 and 14) which does not contain this putative transmembrane domain (Fig. 7C). In normal conditions, we found that the transmembrane isoform was predominantly expressed (Fig. 7D). However, under pathological conditions, we observed a decreased expression of transcripts containing the transmembrane domain and an increased expression of transcripts coding for the isoform A (Fig. 7D). *dSERCA* expression in larval muscles was assessed by immunostaining and showed reduced or absent *dSERCA* expression at muscle surface in the DM1<sub>960</sub> line and *mbl* attenuated line (Fig. 7E), but also in sarcomere for *Mef*>*mblRNAi* larvae in which *dSERCA* expression was more strongly affected. In addition, DM1 lines exhibited ectopic expression of *dSERCA* in nuclei. Thus *dSERCA* was mis-spliced in DM1 lines as well as in line attenuated for *mbl*, indicating that Mbl contributes to the mis-splicing. The accumulation in the nuclei of *dSERCA* in these lines (Fig. 7E) may correspond to an accumulation of *dSERCA*-A proteins.





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

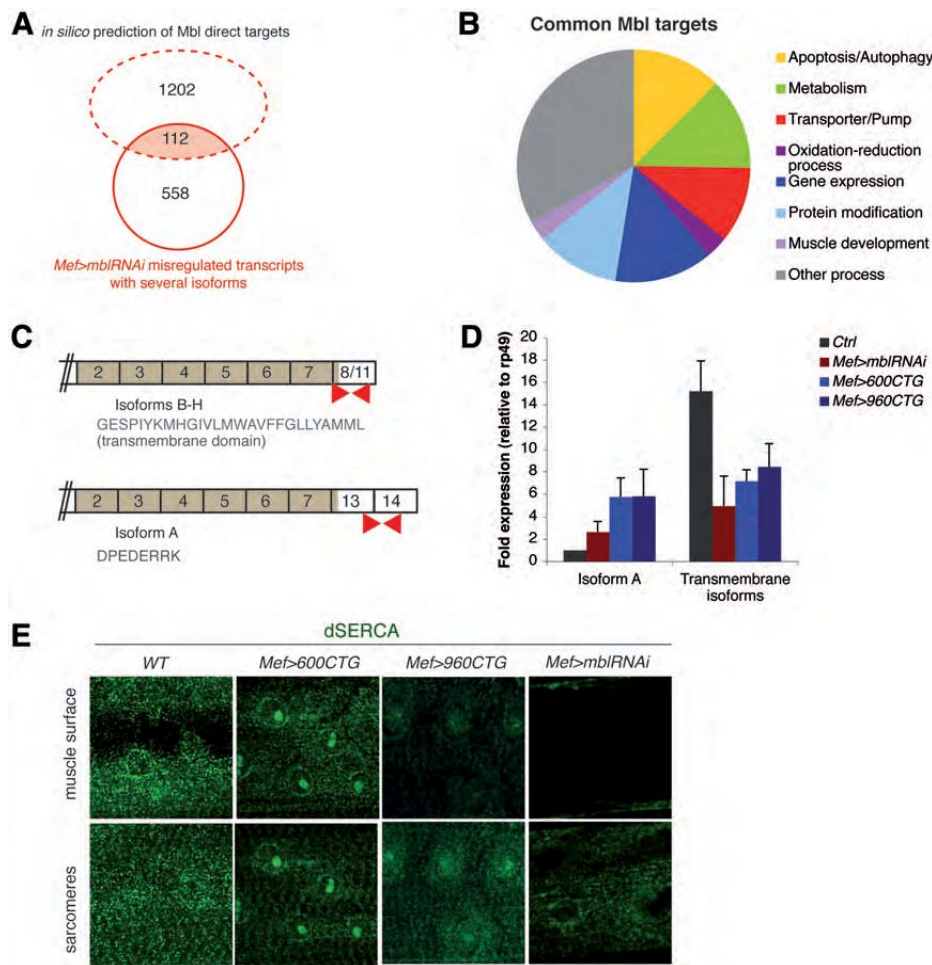
As previously mentioned, dSERCA could be involved in DM1 hypercontracted phenotype. In order to validate this hypothesis, we first tested the effect of cyclopiazonic acid (CPA), a specific SERCA inhibitor (37), on the contractility index of the control line and hypercontracted lines. The *Mef>lacZ* control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

## DISCUSSION

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

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

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



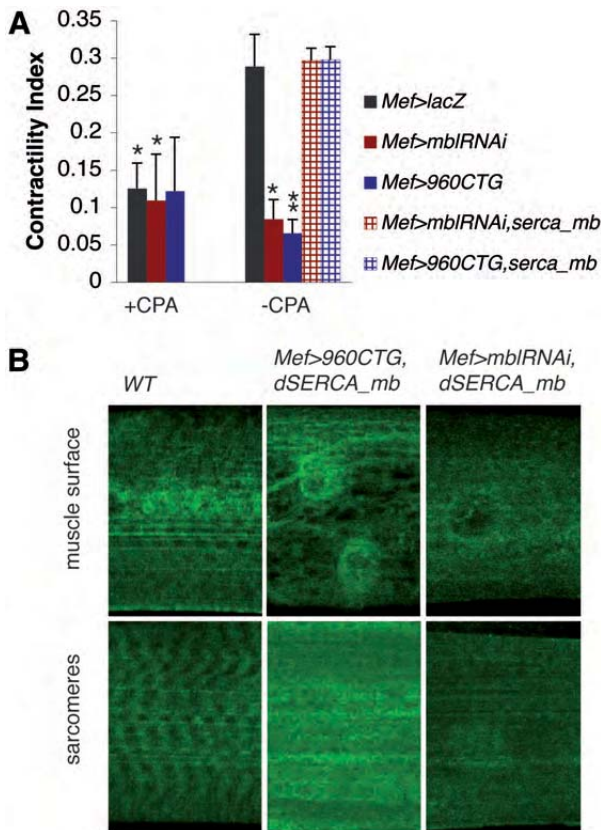
**Figure 7.** *In silico* prediction of Mbl targets associated with transcriptomic analysis allowed identification of mis-splicing of *dSERCA* in a *Drosophila* larval model of DM1. (A) Venn diagram showing transcript distribution between Mbl predicted spliced targets and *Mef>mbIRNAi* misexpressed transcripts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

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

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

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

Global analysis of muscle pattern in our model revealed a histopathological defect called ‘splitting fibers’ already observed in *mbnl1* knockout mice (43) as well as in DM1 patients (23,24). Here, splitting occurs during larval stages characterized by rapid muscle growth. As observed in dorsal oblique fibers, it is initiated at muscle endings at the level of interaction with tendon cells. This suggests that splitting results from affected muscle attachment to tendon cells and (or) abnormal sarcomeric organization that weaken the integrity of myofibrils. This latter hypothesis is supported by decreased expression of two sarcomere components (Mhc, up) in the DM1<sub>960</sub> line. Surprisingly, the *Mef>240CTG* line which did not exhibit visible foci within muscle nuclei displayed altered motility associated with muscle splitting but



**Figure 8.** Involvement of dSERCA in muscle hypercontraction phenotypes. (A) Hypercontraction observed in DM1<sub>960</sub> line and *mbI* attenuated line can be reproduced by dSERCA inhibition by cyclopiazonic acid (CPA). Contractility index in the presence of CPA is the difference between the average length of the VL3 fiber in the presence of 25  $\mu$ M CPA and 25 mM EDTA and the average length of the contracted VL3 fiber. For each mutant genotype, this index is normalized with the average length of VL3 fiber relaxed with EDTA only. Contractility index is rescued in lines overexpressing dSERCA transmembrane isoform dissected in the absence of CPA. (B) Fluorescent immunostaining of larval muscles with dSERCA antibody (green) in rescue lines. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  versus *Mef>lacZ* (-CPA) line.

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

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

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

Finally, we report here that mutant larvae and in particular those from DM1<sub>960</sub> and *mbI* attenuated lines display altered motility with affected complex movements. Interestingly, by measuring the contractility index and sarcomere size, we found that both the lines exhibited hypercontraction, a phenotype related to myotonia. It was previously shown that *mbn1* disruption in the mouse also leads to myotonia (43). In our *Drosophila* DM1 model, we observed the effect of CTG repeat size on the severity of myotonia, so that the DM1<sub>600</sub> line exhibits intermediate hypercontraction phenotypes when compared with DM1<sub>240</sub> and DM1<sub>960</sub>. As not only hypercontraction but also affected myoblast fusion account for a reduced muscle size in pathological lines, we assume that both parameters need to be repaired to fully rescue muscle length.

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

As demonstrated here, the severity of several phenotypes is positively correlated with the size of the CTG repeats. This prompted us to carry out comparative transcriptional profiling on DM1<sub>600</sub> and DM1<sub>960</sub> lines. First, during validation of selected candidate genes from microarray analyses we identified repeat-size-dependent deregulation of genes involved in carbohydrate and nitrogen metabolism. A more systematic classification of candidates deregulated in a repeat-size-dependent manner and having human orthologs was then performed based on the ratio of their fold-change between the two conditions and on their function. Our data revealed that genes encoding transporter proteins were significantly enriched among gene categories down-regulated in larvae carrying high repeat numbers (DM1<sub>960</sub> line).

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

We also found that two genes involved in the sarcomere structure *Mhc* and *up* were both down-regulated specifically in the DM1<sub>960</sub> context. In DM1 patients, it was shown that *Mhc* ortholog *MYH14* (31) and *up* orthologs *TNNT2* and *TNNT3* (13,32,43) were mis-spliced. Besides, a recent report provided evidence that in a *Drosophila mbl* null mutant, *up* transcripts are mis-spliced as well (46). However, the link between the *Mhc* and *up* gene deregulations and DM1 muscle phenotypes and their impact on DM1 pathogenesis have not yet been investigated. We speculate that down-regulation of *Mhc* and *up* might be involved in splitting fiber phenotype observed in DM1 larvae.



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

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

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

<sup>a</sup>Indicates transcription factors sorted out by *in silico* prediction.

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

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

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

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

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

As discussed before, we observed in DM1<sub>960</sub> larvae an Mbl-dependent muscle hypercontraction phenotype related to myotonia. By associating microarray data with *in silico* prediction of Mbl direct targets, we identified *dSERCA* gene as a putative candidate for Mbl-driven mis-splicing and hypercontraction phenotype. We confirmed by an RT-qPCR that the isoforms B-H of *dSERCA* containing exons 8 or 11 encoding the transmembrane domain showed decreased expression in *mbl* attenuated and in DM1<sub>960</sub> lines. This indicates that in the Mbl-deficient context, the exons 8 or 11 of *dSERCA* were spliced out, leading to the production of dSERCA isoforms devoid of the transmembrane domain. This switch in dSERCA isoforms is consistent with the immunostaining of DM1 larval muscles, in which the membrane-associated dSERCA protein was barely detectable at muscle surface or even in sarcomere for the *Mef*>*mblRNAi* line, whereas the level of free dSERCA in nuclei appeared to be enhanced in DM1 lines. It was previously shown that in DM1 patient muscles, as a result of MBNL1 sequestration, *SERCA1* exon 22 in the 3' part of the transcript is excluded (30,49) leading to the formation of a neonatal isoform of *SERCA1*. This isoform was expected to cause muscle degeneration, but so far, no functional analysis has been performed to confirm this hypothesis. However, patients with Brody's disease, which is caused by different mutations in the *SERCA1a* gene, manifest impairment of skeletal muscle relaxation among other symptoms (50,51). In addition, it has been shown that dSERCA plays a key role in muscle contraction and heartbeat frequency and rhythmicity in flies (52,53), suggesting that it might be involved in muscle hypercontraction phenotypes and myotonia in DM1 muscles.

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

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

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

## MATERIALS AND METHODS

### Transgenic *Drosophila* line generation and *Drosophila* stocks

All stocks were maintained at 25°C in standard medium in a 12:12 h light-dark cycling humidified incubator. *UAS-iCTG<sub>240</sub>*, *UAS-iCTG<sub>480</sub>* and *UAS-iCTG<sub>600</sub>* plasmids were generated following published procedures (56). *UAS-CTG<sub>960</sub>* was generated with repeats excised from a *DMPK-CAG<sup>960</sup>* plasmid (13,57). All these constructs were generated by concatamerization of synthetic double-stranded DNA oligonucleotides of 20 CTG units interrupted by the sequence CTCGA. Site-specific transgenesis (performed by the Fly Facility platform, www.fly-facility.com) was then used to generate DM1 repeat lines. The site-specific *M{vas-int.Dm}ZH-2A*, *M{3xP3-RFP.attP}ZH-86Fb* (BL#24749, Bloomington) host line was used for injections (Fly Facility, Clermont-Ferrand, France). The *UAS-Serca<sub>mb</sub>* rescue construct was subcloned from *GH26644* (BDGP ESTs Collection) by amplification with high-fidelity DNA polymerase (Phusion, Biolabs), sequenced and cloned into the pUASattb transformation vector (26). The following pair of primers was used for amplification of *Serca<sub>mb</sub>* sequence: 5'-atagcggcgcctgaacgaaggataacg-3' 5'-atactcgagataatgaagtggcctatgg-3'. The site-specific *PBac{y[+]-attP-3B}VK00037* (BL#9752) host line was used for injection (Fly facility, Clermont-Ferrand, France). *w<sup>1118</sup>*; *P{GD13374}v28732* line referred to as *UAS-mblRNAi* (32) line was obtained from the Vienna *Drosophila* RNAi Center (VDRC, Vienna, Austria). The *UAS-Mp20* rescue line was a gift from Bataillé *et al.* (33). The *y[1] w[\*];P{w[+mC]} = GAL4-Mef2.R}3* mentioned as *Mef-Gal4* line was ordered from the Bloomington Stock Center (BL#27390). The *Mef*>*mCD8GFP* line was a kind gift from A. Paululat.



### Lethality test

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

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

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

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

### Muscle measurements

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

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

### Motility tests and muscle pattern assessment

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

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

### RT-qPCR

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

### In silico prediction of Mbl targets

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

## Microarray analysis

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

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

## General statistical analysis

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

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at *HMG* online.

## ACKNOWLEDGMENTS

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

*Conflict of Interest statement.* None declared.

## FUNDING

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

## REFERENCES

1. Brook, J.D., McCurrach, M.E., Harley, H.G., Buckler, A.J., Church, D., Aburatani, H., Hunter, K., Stanton, V.P., Thirion, J.P., Hudson, T *et al.* (1992) Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell*, **69**, 385.
2. Fu, Y.H., Pizzuti, A., Fenwick, R.G. Jr, King, J., Rajnarayan, S., Dunne, P.W., Dubel, J., Nasser, G.A., Ashizawa, T., de Jong, P *et al.* (1992) An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science*, **255**, 1256–1258.
3. Krokmark, A.K., Ekstrom, A.B., Bjorck, E. and Tulinius, M. (2005) Myotonic dystrophy: muscle involvement in relation to disease type and size of expanded CTG-repeat sequence. *Dev. Med. Child. Neurol.*, **47**, 478–485.
4. Mooers, B.H., Logue, J.S. and Berglund, J.A. (2005) The structural basis of myotonic dystrophy from the crystal structure of CUG repeats. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **102**, 16626–16631.
5. Taneja, K.L., McCurrach, M., Schalling, M., Housman, D. and Singer, R.H. (1995) Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues. *J. Cell. Biol.*, **128**, 995–1002.
6. Davis, B.M., McCurrach, M.E., Taneja, K.L., Singer, R.H. and Housman, D.E. (1997) Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of myotonic dystrophy protein kinase transcripts results in nuclear retention of transcripts. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **94**, 7388–7393.
7. Mankodi, A., Urbinati, C.R., Yuan, Q.P., Moxley, R.T., Sansone, V., Krym, M., Henderson, D., Schalling, M., Swanson, M.S. and Thornton, C.A. (2001) Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2. *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 2165–2170.
8. Kuyumcu-Martinez, N.M., Wang, G.S. and Cooper, T.A. (2007) Increased steady-state levels of CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation. *Mol. Cell*, **28**, 68–78.
9. Kino, Y., Washizu, C., Oma, Y., Onishi, H., Nezu, Y., Sasagawa, N., Nukina, N. and Ishiura, S. (2009) MBNL and CELF proteins regulate alternative splicing of the skeletal muscle chloride channel CLCN1. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 6477–6490.
10. Savkur, R.S., Philips, A.V. and Cooper, T.A. (2001) Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat. Genet.*, **29**, 40–47.
11. Charlet, B.N., Savkur, R.S., Singh, G., Philips, A.V., Grice, E.A. and Cooper, T.A. (2002) Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol. Cell*, **10**, 45–53.
12. Fugier, C., Klein, A.F., Hammer, C., Vassilopoulos, S., Ivarsson, Y., Toussaint, A., Tosch, V., Vignaud, A., Ferry, A., Messadecq, N *et al.* (2011) Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy. *Nat. Med.*, **17**, 720–725.
13. Philips, A.V., Timchenko, L.T. and Cooper, T.A. (1998) Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science*, **280**, 737–741.
14. Rau, F., Freyermuth, F., Fugier, C., Villemin, J.P., Fischer, M.C., Jost, B., Dembele, D., Gourdon, G., Nicole, A., Duboc, D *et al.* (2011) Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **18**, 840–845.
15. Ebralidze, A., Wang, Y., Petkova, V., Ebralidze, K. and Junghans, R.P. (2004) RNA leaching of transcription factors disrupts transcription in myotonic dystrophy. *Science*, **303**, 383–387.
16. Gourdon, G., Radvanyi, F., Lia, A.S., Duros, C., Blanche, M., Abitbol, M., Junien, C. and Hofmann-Radvanyi, H. (1997) Moderate intergenerational and somatic instability of a 55-CTG repeat in transgenic mice. *Nat. Genet.*, **15**, 190–192.
17. Mankodi, A., Logigian, E., Callahan, L., McClain, C., White, R., Henderson, D., Krym, M. and Thornton, C.A. (2000) Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science*, **289**, 1769–1773.
18. de Haro, M., Al-Ramahi, I., De Gouyon, B., Ukani, L., Rosa, A., Faustino, N.A., Ashizawa, T., Cooper, T.A. and Botas, J. (2006) MBNL1 and CUGBP1 modify expanded CUG-induced toxicity in a *Drosophila* model of myotonic dystrophy type 1. *Hum. Mol. Genet.*, **15**, 2138–2145.
19. Yu, Z., Teng, X. and Bonini, N.M. (2011) Triplet repeat-derived siRNAs enhance RNA-mediated toxicity in a *Drosophila* model for myotonic dystrophy. *PLoS Genet.*, **7**, e1001340.
20. Houseley, J.M., Wang, Z., Brock, G.J., Soloway, J., Artero, R., Perez-Alonso, M., O'Dell, K.M. and Monckton, D.G. (2005) Myotonic dystrophy associated expanded CUG repeat muscleblind positive ribonuclear foci are not toxic to *Drosophila*. *Hum. Mol. Genet.*, **14**, 873–883.
21. Garcia-Lopez, A., Monferrer, L., Garcia-Alcover, I., Vicente-Crespo, M., Alvarez-Abril, M.C. and Artero, R.D. (2008) Genetic and chemical modifiers of a CUG toxicity model in *Drosophila*. *PLoS One*, **3**, e1595.

22. Garcia-Lopez, A., Llamusi, B., Orzaez, M., Perez-Paya, E. and Artero, R.D. (2011) In vivo discovery of a peptide that prevents CUG-RNA hairpin formation and reverses RNA toxicity in myotonic dystrophy models. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **108**, 11866–11871.
23. Grimby, G., Hedberg, M., Henriksson, K.G., Johansson, G., Wigerstad-Lossing, I., Sellden, U. and Orndahl, G. (1988) Muscle function and morphology in myotonic dystrophy. *Acta Med. Scand.*, **224**, 349–356.
24. Maynard, J.A., Cooper, R.R. and Ionaescu, V.V. (1977) An ultrastructure investigation of intrafusal muscle fibers in myotonic dystrophy. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histol.*, **373**, 1–13.
25. Bateman, J.R., Lee, A.M. and Wu, C.T. (2006) Site-specific transformation of *Drosophila* via phiC31 integrase-mediated cassette exchange. *Genetics*, **173**, 769–777.
26. Bischof, J., Maeda, R.K., Hediger, M., Karch, F. and Basler, K. (2007) An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **104**, 3312–3317.
27. Mudher, A., Shepherd, D., Newman, T.A., Mildren, P., Jukes, J.P., Squire, A., Mears, A., Drummond, J.A., Berg, S., MacKay, D *et al.* (2004) GSK-3beta inhibition reverses axonal transport defects and behavioural phenotypes in *Drosophila*. *Mol. Psychiatry*, **9**, 522–530.
28. Furling, D., Coiffier, L., Mouly, V., Barbet, J.P., St Guily, J.L., Taneja, K., Gourdon, G., Junien, C. and Butler-Browne, G.S. (2001) Defective satellite cells in congenital myotonic dystrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 2079–2087.
29. Amack, J.D. and Mahadevan, M.S. (2001) The myotonic dystrophy expanded CUG repeat tract is necessary but not sufficient to disrupt C2C12 myoblast differentiation. *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 1879–1887.
30. Kimura, T., Nakamori, M., Lueck, J.D., Pouliquin, P., Aoiike, F., Fujimura, H., Dirksen, R.T., Takahashi, M.P., Dulhunty, A.F. and Sakoda, S. (2005) Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase in myotonic dystrophy type 1. *Hum. Mol. Genet.*, **14**, 2189–2200.
31. Rinaldi, F., Terracciano, C., Pisani, V., Massa, R., Loro, E., Vergani, L., Di Girolamo, S., Angelini, C., Gourdon, G., Novelli, G *et al.* (2011) Aberrant splicing and expression of the nonmuscle myosin heavy-chain gene MYH14 in DM1 muscle tissues. *Neurobiol. Dis.*, **45**, 264–271.
32. Vihola, A., Bachinski, L.L., Sirito, M., Olufemi, S.E., Hajibashi, S., Baggerly, K.A., Raheem, O., Haapasalo, H., Suominen, T., Holmlund-Hampf, J *et al.* (2010) Differences in aberrant expression and splicing of sarcomeric proteins in the myotonic dystrophies DM1 and DM2. *Acta Neuropathol.*, **119**, 465–479.
33. Bataille, L., Delon, I., Da Ponte, J.P., Brown, N.H. and Jagla, K. (2010) Downstream of identity genes: muscle-type-specific regulation of the fusion process. *Dev. Cell*, **19**, 317–328.
34. Teplova, M. and Patel, D.J. (2008) Structural insights into RNA recognition by the alternative-splicing regulator muscleblind-like MBNL1. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 1343–1351.
35. Du, H., Cline, M.S., Osborne, R.J., Tuttle, D.L., Clark, T.A., Donohue, J.P., Hall, M.P., Shiue, L., Swanson, M.S., Thornton, C.A *et al.* (2010) Aberrant alternative splicing and extracellular matrix gene expression in mouse models of myotonic dystrophy. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**, 187–193.
36. Goers, E.S., Voelker, R.B., Gates, D.P. and Berglund, J.A. (2008) RNA binding specificity of *Drosophila* muscleblind. *Biochemistry*, **47**, 7284–7294.
37. Seidler, N.W., Jona, I., Vegh, M. and Martonosi, A. (1989) Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, **264**, 17816–17823.
38. Fernandez-Costa, J.M., Garcia-Lopez, A., Zuniga, S., Fernandez-Pedrosa, V., Felipo-Benavent, A., Mata, M., Jaka, O., Aiausti, A., Hernandez-Torres, F., Aguado, B *et al.* (2012) Expanded CTG repeats trigger miRNA alterations in *Drosophila* that are conserved in myotonic dystrophy type 1 patients. *Hum. Mol. Genet.*, **22**, 704–716.
39. Leeflang, E.P. and Arnheim, N. (1995) A novel repeat structure at the myotonic dystrophy locus in a 37 repeat allele with unexpectedly high stability. *Hum. Mol. Genet.*, **4**, 135–136.
40. Braid, C., Stefanatos, R.K., Adam, B., Mahajan, N., Smeets, H.J., Niel, F., Goizet, C., Arveiler, B., Koenig, M., Lagier-Tourenne, C *et al.* (2010) Variant CCG and GGC repeats within the CTG expansion dramatically modify mutational dynamics and likely contribute toward unusual symptoms in some myotonic dystrophy type 1 patients. *Hum. Mol. Genet.*, **19**, 1399–1412.
41. Musova, Z., Mazanec, R., Krepelova, A., Ehler, E., Vales, J., Jaklova, R., Prochazka, T., Koukal, P., Marikova, T., Kraus, J *et al.* (2009) Highly unstable sequence interruptions of the CTG repeat in the myotonic dystrophy gene. *Am. J. Med. Genet. A*, **149A**, 1365–1374.
42. Wang, G.S., Kearney, D.L., De Biasi, M., Taffet, G. and Cooper, T.A. (2007) Elevation of RNA-binding protein CUGBP1 is an early event in an inducible heart-specific mouse model of myotonic dystrophy. *J. Clin. Invest.*, **117**, 2802–2811.
43. Kanadia, R.N., Johnstone, K.A., Mankodi, A., Lungu, C., Thornton, C.A., Esson, D., Timmers, A.M., Hauswirth, W.W. and Swanson, M.S. (2003) A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science*, **302**, 1978–1980.
44. Shibukawa, Y., Yamazaki, N., Daimon, E. and Wada, Y. (2012) Rock-dependent calponin 3 phosphorylation regulates myoblast fusion. *Exp. Cell Res.*, **319**, 633–648.
45. Schroeder, F., Zhou, M., Swaggerty, C.L., Atshaves, B.P., Petrescu, A.D., Storey, S.M., Martin, G.G., Huang, H., Helmkamp, G.M. and Ball, J.M. (2003) Sterol carrier protein-2 functions in phosphatidylinositol transfer and signaling. *Biochemistry*, **42**, 3189–3202.
46. Irion, U. (2012) *Drosophila* muscleblind codes for proteins with one and two tandem zinc finger motifs. *PLoS One*, **7**, e34248.
47. Masuda, A., Andersen, H.S., Doktor, T.K., Okamoto, T., Ito, M., Andresen, B.S. and Ohno, K. (2012) CUGBP1 and MBNL1 preferentially bind to 3' UTRs and facilitate mRNA decay. *Sci. Rep.*, **2**, 209.
48. Potier, D., Atak, Z.K., Sanchez, M.N., Herrmann, C. and Aerts, S. (2012) Using cisTargetX to predict transcriptional targets and networks in *Drosophila*. *Methods Mol. Biol.*, **786**, 291–314.
49. Hino, S., Kondo, S., Sekiya, H., Saito, A., Kanemoto, S., Murakami, T., Chihara, K., Aoki, Y., Nakamori, M., Takahashi, M.P *et al.* (2007) Molecular mechanisms responsible for aberrant splicing of SERCA1 in myotonic dystrophy type 1. *Hum. Mol. Genet.*, **16**, 2834–2843.
50. Odermatt, A., Barton, K., Khanna, V.K., Mathieu, J., Escolar, D., Kuntzer, T., Karpati, G. and MacLennan, D.H. (2000) The mutation of Pro789 to Leu reduces the activity of the fast-twitch skeletal muscle sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA1) and is associated with Brody disease. *Hum. Genet.*, **106**, 482–491.
51. Odermatt, A., Taschner, P.E., Khanna, V.K., Busch, H.F., Karpati, G., Jablecki, C.K., Breuning, M.H. and MacLennan, D.H. (1996) Mutations in the gene-encoding SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase, are associated with Brody disease. *Nat. Genet.*, **14**, 191–194.
52. Sanyal, S., Consoulas, C., Kuromi, H., Basole, A., Mukai, L., Kidokoro, Y., Krishnan, K.S. and Ramaswami, M. (2005) Analysis of conditional paralytic mutants in *Drosophila* sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase reveals novel mechanisms for regulating membrane excitability. *Genetics*, **169**, 737–750.
53. Sanyal, S., Jennings, T., Dowse, H. and Ramaswami, M. (2006) Conditional mutations in SERCA, the Sarco-endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase, alter heart rate and rhythmicity in *Drosophila*. *J. Comp. Physiol. B*, **176**, 253–263.
54. Difranco, M., Yu, C., Quinonez, M. and Vergara, J.L. (2012) Age-Dependent Chloride Channel Expression in Skeletal Muscle Fibers of Normal and Hsarl Myotonic Mice. *J. Physiol.*, **591**, 1347–1371.
55. Laursen, M., Bublitz, M., Moncoq, K., Olesen, C., Moller, J.V., Young, H.S., Nissen, P. and Morth, J.P. (2009) Cyclopiazonic acid is complexed to a divalent metal ion when bound to the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *J. Biol. Chem.*, **284**, 13513–13518.
56. Fernandez-Funez, P., Nino-Rosales, M.L., de Gouyon, B., She, W.C., Luchak, J.M., Martinez, P., Turiegano, E., Benito, J., Capovilla, M., Skinner, P.J *et al.* (2000) Identification of genes that modify ataxin-1-induced neurodegeneration. *Nature*, **408**, 101–106.
57. Ho, T.H., Savkur, R.S., Poulos, M.G., Mancini, M.A., Swanson, M.S. and Cooper, T.A. (2005) Colocalization of muscleblind with RNA foci is separable from mis-regulation of alternative splicing in myotonic dystrophy. *J. Cell. Sci.*, **118**, 2923–2933.
58. Chartier, A., Benoit, B. and Simonelig, M. (2006) A *Drosophila* model of oculopharyngeal muscular dystrophy reveals intrinsic toxicity of PABPN1. *EMBO J.*, **25**, 2253–2262.
59. Haines, N., Seabrooke, S. and Stewart, B.A. (2007) Dystroglycan and protein O-mannosyltransferases 1 and 2 are required to maintain integrity of *Drosophila* larval muscles. *Mol. Biol. Cell.*, **18**, 4721–4730.







## 2. Résultats non publiés

### a. Nouvelle sélection de gènes candidats et validation chez la drosophile

Les résultats présentés ci-dessus nous ont encouragé à rechercher d'autres candidats dérégulés d'une manière CTG-dépendante dans le but d'identifier des marqueurs moléculaires de la sévérité de la maladie. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux gènes dérégulés négativement car il est plus facile chez la drosophile d'obtenir des outils génétiques d'atténuation de gènes (lignées ARNi) que des lignées gain de fonction. Ensuite, avec Yoan Renaud, bioinformaticien dans notre équipe, nous avons sélectionné des gènes dont le différentiel d'expression entre le contexte DM1 avec beaucoup de répétitions (*Mef2>960ctg*) et la condition contrôle était d'au moins 2,3 fois (Fold Change (FC) > 2,3). A partir de ces gènes, de nouveaux critères de sélection ont été appliqués et deux types de listes ont été générées : 1) une liste de gènes dérégulés à la fois en contexte avec un fort nombre de CTG mais aussi en contexte *Mef2>600ctg* et *Mef2>mblRNAi*, gènes qui sont des marqueurs de la maladie en général et qui pourraient être responsables des symptômes communs aux différents modèles ; et 2) une liste de gènes dérégulés uniquement en contexte *Mef2>960ctg* qui pourraient être considérés comme des marqueurs de la sévérité de ces symptômes (**Figure 41A**). Dans le but de valider ces candidats chez les patients, nous avons sélectionné uniquement les gènes conservés chez l'Homme et analysé à quels processus biologiques ils étaient associés (**Figure 41B, C**). Nous avons ensuite choisi pour chaque liste les candidats les plus dérégulés négativement et pour lesquels les processus biologiques pouvaient correspondre à des défauts musculaires pour la validation par RT-qPCR.

Parmi les 174 candidats potentiels marqueurs de la maladie, les gènes sélectionnés sont impliqués dans le transport, la protéolyse ou la réponse au stress thermique alors que pour les 31 gènes choisis pour leur rôle dans la sévérité de la maladie, les candidats intéressants étaient engagés dans le transport, le métabolisme des sucres ou encore les processus d'oxydation-réduction. Dans un premier temps, 5 gènes par catégorie ont été vérifiés par RT-qPCR permettant d'observer deux types de profil : des gènes dont l'expression diminue similairement dans les contextes *Mef>600ctg* et *Mef>960ctg* comme *Hsp26*, *CG11911* ou *CG17167* et d'autres comme *Apc*, *CG33138* ou *Cyp4e1* dont la régulation semble dépendre du nombre de répétitions CTG puisqu'ils sont plus dérégulés dans le contexte DM1 avec plus de répétitions CTG (**Figure 41D**).

Gène drosophile	Orthologues humains Gène/ Score DIOPT	Orthologues souris Gène/Score DIOPT	Gènes choisis pour la validation
<i>Amy-d</i>	<b>AMY2B / 10</b> AMY2A / 8 AMY1C / 8	<b>Amy2a2 / 9</b>	AMY2B / Amy2a2 (DIOPT)
<i>Cyp6w1</i>	<b>CYP3A4 / 4</b>	<b>Cyp3a13 / 3</b>	CYP3A4 / Cyp3a13 (DIOPT)
<i>Mhc</i>	<b>MYH7 / 8</b> <b>MYH6 / 8</b> MYH4 / 7 MYH1 / 7 MYH7B / 7 MYH15 / 7	<b>Myh6 / 8</b> <b>Myh7 / 8</b> Myh4 / 5	MYH7 (DIOPT) / Myh7 et Myh4 (DIOPT et expression)
CG32444	<b>GALM / 7</b>	<b>Galm / 7</b>	GALM/ Galm (DIOPT)
<i>Up</i>	TNNT1 / 5 <b>TNNT2 / 6</b> TNNT3 / 5	Tnnt1 / 5 Tnnt2 / 5 <b>Tnnt3 / 6</b>	TNNT1 / Tnnt1 et Tnnt3 (données d'expression)
CG17597	<b>SCP2 / 9</b>	<b>Scp2 / 10</b>	SCP2/ Scp2 (DIOPT)
<i>Smyt</i>	<b>SLC5A1 / 2</b>	<b>Slc5a1 / 2</b> Slc5a6 / 2 Slc5a8 / 2	SLC5A1 / Slc5a1 (DIOPT)
<i>Apc</i>	<b>APC / 7</b> <b>APC2 / 7</b> AXIN1 / 7	<b>Apc / 7</b> <b>Apc2 / 7</b> Axin2 / 7	APC et APC2 / Apc et Apc2 (DIOPT)
<i>Cyp4e1</i>	CYP4V2 / 3 <b>CYP4F12 / 3</b>	Cyp4f37 / 3 Cyp4f10 / 3 Cyp4f16 / 3	CYP4F12 (DIOPT) / Cyp4f14 (orthologie Humain)
CG33138	<b>GBE1 / 11</b>	<b>Gbe1 / 10</b>	GBE1/ Gbe1 (DIOPT)

**Tableau 14. Recherche d'orthologie avec l'outil DIOPT chez l'Homme et la souris.**

Résultats de l'analyse d'orthologie faite sur les gènes candidats de drosophile à l'aide de l'outil DIOPT. Les orthologues humains et murins des gènes de drosophile sont représentés avec leur score DIOPT qui permet leur classification : plus le score est haut, plus le gène est susceptible d'être un bon orthologue. Les gènes en gras sont les mieux conservés.

**b. Etude translationnelle chez la souris DMSXL et en cellules de patients DM1**

Afin de vérifier l'implication de ces candidats dans la DM1, nous avons choisi de valider leur dérégulation dans des modèles vertébrés différents : un modèle cellulaire issu de biopsies de fœtus atteints de la DM1 ou de patients contrôle, grâce à une collaboration avec D. Furling (Paris, Institut de Myologie) et un modèle murin de la DM1 présentant un grand nombre de répétitions CTG (DMSXL, Huguet *et al.*, 2012) grâce à une collaboration avec G. Gourdon (Paris, Institut Imagine). Ces deux modèles nous ont permis dans un cas de valider l'implication des candidats les plus intéressants directement chez l'Homme (*in vitro*) et pour le modèle souris, d'analyser un plus grand nombre de gènes dans les tissus musculaires.

- **Recherche des orthologues humains et murins**

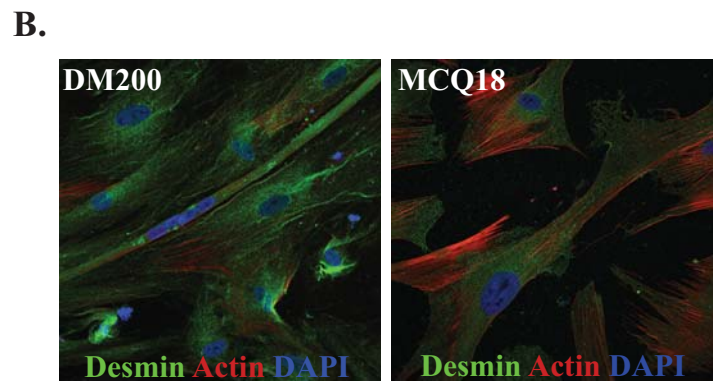
Pour cela, nous avons recherché les orthologues humains et murins des gènes candidats de drosophile pour leur validation dans les deux modèles (Contribution de Caroline GIRARDIN, stagiaire Master II). Cette recherche d'orthologues a été faite à l'aide de l'outil en ligne DIOPT (DRSC Integrative Ortholog Prediction Tool, ) qui permet de compiler les résultats d'analyse d'orthologie de différentes bases de données, s'appuyant sur la comparaison de séquence (Isobase, Homoloecene, Inparanoid) ou bien sur la phylogénie (Compara, Phylome, OrthoDB).

L'analyse croisée entre la drosophile et les vertébrés a été compliquée, de part la redondance fonctionnelle qui existe chez les vertébrés. En effet, pour un seul gène de drosophile, nous avons pu identifier plusieurs candidats chez l'Homme ou la souris, compliquant le travail de validation par RT-qPCR. Dans la plupart des cas, l'orthologue choisi est celui dont le score DIOPT est le plus élevé. Cependant, pour certains gènes qui présentent un grand nombre d'orthologues putatifs, nous avons ajouté comme critère les patrons d'expression des gènes dans le tissu à analyser (muscle embryonnaire humain ou muscle post-natal murin). Par exemple, pour *Mhc*, *MYH6* et *MYH7* semblent être les orthologues humains mais *MYH7* est exprimé dans le muscle embryonnaire, justifiant son choix. Chez la souris, *Myh4* semble plus fortement exprimé dans le muscle post-natal, nous avons donc analysé *Myh4* et *Myh7* (meilleur score DIOPT). De même pour *Up*, l'orthologue avec le meilleur score est *Tnnt2* mais ce gène code pour la Troponine T cardiaque, nous avons donc décidé d'analyser *TNNT1* chez l'Homme et *Tnnt1* et *Tnnt3* chez la souris, exprimés dans le muscle squelettique.

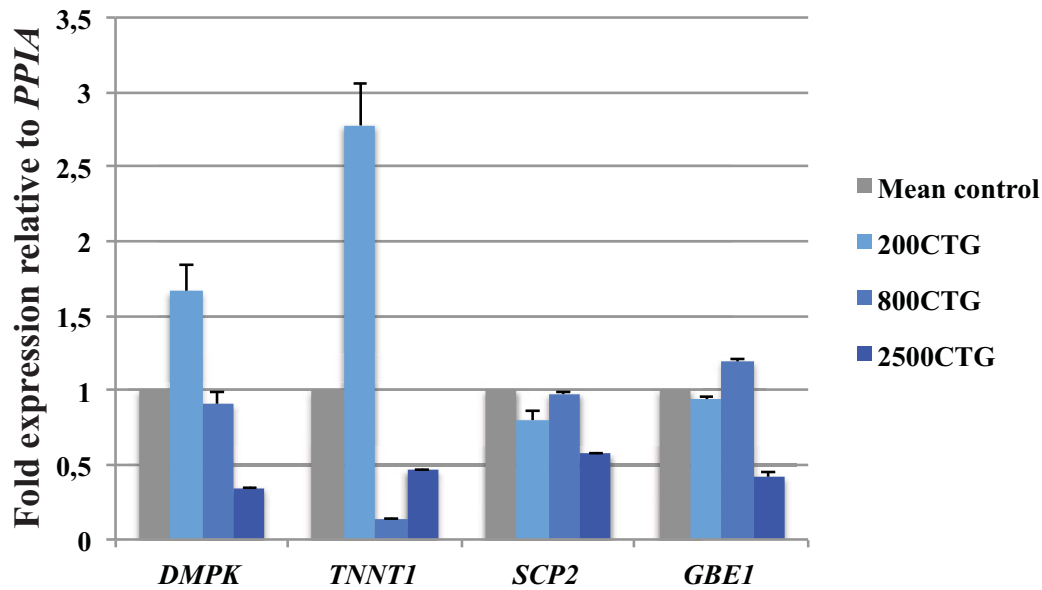


**A.**

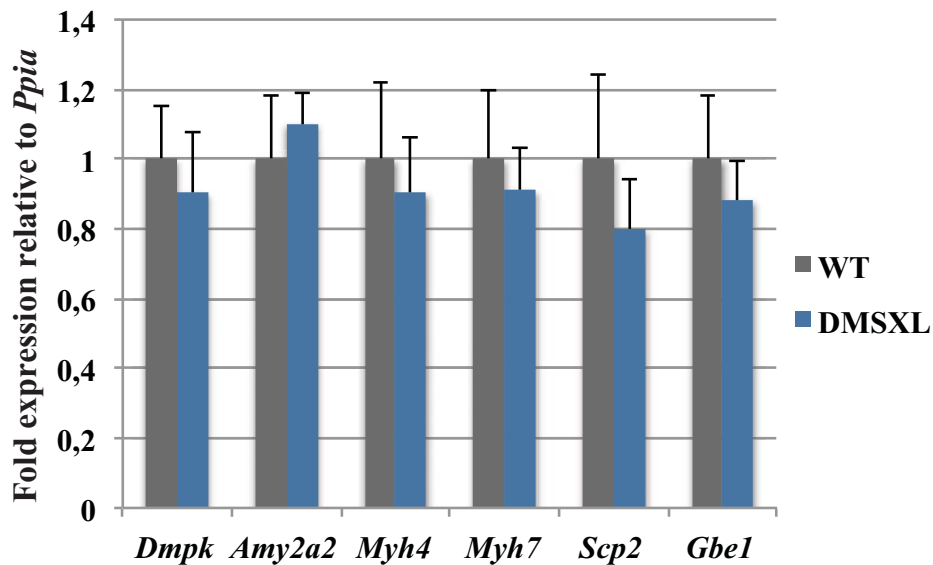
Gène drosophile	Orthologues humain/murin analysés
/	<i>DMPK / Dmpk</i>
<i>Amy-d</i>	<i>Amy2a2</i>
<i>Mhc</i>	<i>Myh4 Myh7</i>
<i>Up</i>	<i>TNNT1</i>
<i>CG17597</i>	<i>SCP2 / Scp2</i>
<i>CG33138</i>	<i>GBE1 / Gbe1</i>



**C.** Gènes humains testés en cellules de patients DM1



**D.** Gènes testés dans le muscle gastrocnémien des souris DMSXL



**Figure 42. Validation des gènes candidats en cellules de patients et dans un modèle murin DM1.**

A. Tableau représentant l'orthologie avec la drosophile des gènes testés en cellules de patients DM1 (C) et dans les muscles murins DMSXL (D). B. Immunomarquage (Desmin) pour vérifier la myogénicité des cellules de patients. C. Résultats de RT-qPCR pour les orthologues définis dans le tableau (A) et testés dans les cellules de patients DM1. D. Résultats de RT-qPCR pour les orthologues (A) testés dans le muscle gastrocnémien de souris DMSXL.

Les résultats complets de la recherche d'orthologie avec DIOPT sont regroupés dans les annexes 1 et 2 et les gènes sélectionnés dans le **tableau 14**.

- **Validation RT-qPCR**

L'analyse par RT-qPCR a été réalisée sur des cellules issues de biopsies de muscle quadriceps obtenues sur des fœtus âgés entre 12 et 15 semaines, sains (3 contrôles) ou atteints de DM1 (200, 800 ou 2500CTG) ou bien sur des biopsies musculaires de muscle gastrocnémien de souris contrôle ou DMSXL (1100-1300 CTG) âgées de 2 mois. Nous nous sommes heurtés à plusieurs problèmes techniques lors de cette analyse (manque de matériel de qualité pour les cellules ou choix d'amorces spécifiques pour les gènes murins) mais certains candidats ont pu être analysés, soit uniquement dans les cellules de patients (comme *TNNT1*) ou dans les tissus murins (comme *Amy2a2*) ou bien dans les deux modèles (**Figure 42 A**). Avant de réaliser les extractions ARN sur les cellules issues de patients, nous avons validé la myogénicité des cellules grâce à un marquage contre la Desmine. Un exemple est présenté pour une lignée DM1 (DM200) et une lignée contrôle (MCQ18) (**Figure 42 B**).

Les analyses de RT-qPCR faites en cellules de patients, malgré un échantillon trop petit (n=2 expériences indépendantes) semblent indiquer une dérégulation dépendante du nombre de CTG pour *SCP2* et *GBE1* (**Figure 42 C**). De plus, le gène *DMPK* portant la mutation semble aussi être moins exprimé chez l'individu avec plus de 2500 CTG. Cependant, les analyses faites sur le muscle gastrocnémien murin n'ont pas permis de confirmer les résultats obtenus chez la drosophile et dans les cellules de patients (**Figure 42 D**).

### **3. Matériel et méthodes**

#### **a. Extraction ARN sur les larves L3 de drosophile**

L'extraction ARN a été réalisée selon le protocole décrit dans Picchio *et al.*, 2013. Pour chaque condition analysée, 6 réplicats biologiques ont été analysés et chaque réplicat est constitué d'un ensemble de 7 larves de stade 3.

#### **b. Recherche des orthologues**

L'analyse d'homologie entre la drosophile et l'Homme ou la souris a été faite grâce à l'outil en ligne DIOPT (DRSC Integrative Ortholog Prediction Tool, [http://www.flyrnai.org/cgi-bin/DRSC\\_orthologs.pl](http://www.flyrnai.org/cgi-bin/DRSC_orthologs.pl)). A partir des résultats de DIOPT, nous avons conservé l'orthologue putatif avec le score le plus élevé (le plus retrouvé dans les



différentes bases de données analysées par DIOPT), sauf pour certains pour lesquels une analyse du patron d'expression du gène a été faite dans le tissu à analyser.

### **c. Culture cellulaire et extraction ARN**

Au total, 6 échantillons cellulaires ont été analysés et envoyés par D. Furling (Institut de Myologie, Paris) : 3 lignées de myoblastes sains (14SA, fœtus de 12 semaines ; Me16-P, fœtus de 14 semaines ; MCQ18, fœtus de 15 semaines) et 3 lignées DM1 (DM200 : fœtus de 13 semaines avec +/- 200 CTG ; DM16-M : fœtus de 14 semaines avec +/- 800 CTG ; DM15 : fœtus de 15 semaines avec +/- 2500 CTG).

Environ  $1 \times 10^6$  cellules sont décongelées rapidement à 37°C dans du milieu de prolifération (MP : DMEM + 20% SVF (sérum de veau fœtal) + 1% Penicilline/Streptomycine) et centrifugées 5 minutes à 500g. Le culot de cellules est repris dans du MP, transféré dans une boîte cellulaire 100mm et incubé à 37°C. Le lendemain, les cellules sont trypsinées (3-5 minutes à 37°C), comptées et réensemencées à  $1-2 \times 10^5$  cellules et sont maintenues jusqu'à 70-80% de confluence. Pour la différenciation, le MP est éliminé, les cellules sont lavées au DMEM et le milieu de différenciation (MD : DMEM + Insuline 10µg/mL + 1% Penicilline/Streptomycine) est ajouté. Les cellules sont laissées à différencier pendant 4 à 6 jours en changeant le MD tous les deux jours.

La nature myogénique des cellules a été vérifiée par immunomarquage contre la Desmine. Pour cela, les cellules sont ensemencées sur des lamelles en verre préalablement recouvertes de gélatine 0,5% et mises à différencier dans du milieu MD. Pour le marquage, les cellules sont lavées au PBS 1X puis fixées au PFA 4%. Après lavage, le blocage se fait dans une solution contenant du PBS 1X, Triton 0,5% et SVF 1% pendant 30 minutes. Après lavage, l'anticorps anti-Desmin (Rabbit, SIGMA D 8281) est incubé 1 heure à température ambiante (TA) dans une chambre humide. Les cellules sont rincées au PBS 1X puis incubées avec l'anticorps secondaire (anti-Rabbit 488) et la *Phalloïdin-Cy3* (Jackson ImmunoResearch) pendant 1 heure à TA. Après lavage, la préparation est montée dans un milieu Vectashield + DAPI.

Pour l'extraction ARN, le milieu MP ou MD est éliminé, les cellules sont rincées au PBS 1X froid. Ensuite, 1 mL de TRIZOL est ajouté sur les cellules. On gratte les cellules et on les transfère dans un tube Eppendorf 1,5 mL. La suite de l'extraction est réalisée en suivant les instructions du fabricant. La quantité et la qualité des ARNs sont analysées, respectivement au Qubit (HS RNA assay kit, Invitrogen) et au bioanalyseur (Agilent RNA



6000 Nano Kit, Agilent technologies) en suivant les instructions du fabricant. Les ARNs sont ensuite stockés à -80°C.

#### **d. Extraction des ARNs murins**

Les échantillons de muscles murins ont été envoyés par G. Gourdon (Institut Imagine, Paris). L'extraction des ARNs totaux est effectuée sur des muscles gastrocnémien ou soléaire de souris sauvages ou DMSXL (>1000 CTG) (n= 5 réplicats biologiques par condition) par broyage dans du TRIZOL (Invitrogen) à l'aide de tubes Precellys (CK-14, Bertin Technologies) selon les instructions du fabricant. La quantité et la qualité des ARNs sont vérifiées (Cf ci-dessus). Les ARNs sont ensuite stockés à -80°C.

#### **e. Rétro-transcription et RT-qPCR**

Pour la rétro-transcription, un traitement à la DNase I (Invitrogen) est réalisé sur 1µg d'ARN puis rétrotranscrit avec la Superscript III ou IV Reverse Transcriptase (Invitrogen) selon les instructions du fabricant. Les qPCR sont réalisées en duplicat : pour chaque condition, le mélange réactionnel contient pour chaque puits 5 µL de SYBR GREEN (Roche, AppliedScience), 1 µL d'un mélange d'amorce sens et anti-sens (0,5 µM) et 2 µL d'ADNc pour un volume final de 10 µL. L'ADNc est amplifié en utilisant le LightCycler® 480 Real Time PCR system (Roche, Applied Science). La méthode de  $\Delta\Delta C_t$  est utilisée pour l'analyse des données avec *Rp49* comme gène de référence chez la drosophile, *Rpl30*, *Rps17* et *Ppia* chez la souris et *PPIA* chez l'Homme. Les séquences des amorces utilisées sont regroupées dans l'annexe 3.

### **4. Discussion**

Ces nouveaux modèles de drosophile de la DM1 générés dans notre équipe ont donc permis d'analyser plusieurs caractéristiques de la maladie, peu étudiés jusque-là. Tout d'abord, les lignées avec un nombre croissant de CTG ont permis d'analyser la corrélation entre le nombre de répétitions et la sévérité de la maladie. Cependant, pour permettre de maintenir une stabilité des répétitions et pouvoir les amplifier par PCR (impossible lorsqu'elles sont « pures » en trop grand nombre), elles sont interrompues par un motif CTCGA tous les (CTG)<sub>20</sub>. Cette stratégie a été choisie en se basant sur ce qui était pratiqué lors de la génération de ce modèle. En effet, plusieurs modèles, chez la drosophile et la souris, utilisent ces interruptions pour amplifier les répétitions au-delà de 200 CTG et n'ont pas détecté de toxicité due aux interruptions (de Haro *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2007). Enfin, des interruptions des répétitions CTG sont aussi retrouvées chez les patients DM1 et auraient



tendance à stabiliser ou permettre la contraction des répétitions (Musova *et al.*, 2009 ; Braida *et al.*, 2010).

Le stade de développement choisi pour l'analyse de ces modèles, le troisième stade larvaire, a permis de mettre en évidence d'autres caractéristiques par rapport aux études déjà menées chez la drosophile et focalisées sur le muscle adulte. En effet, comme nous avons pu le voir dans la synthèse bibliographique, le muscle adulte est formé suite à la deuxième vague de myogénèse lors de la métamorphose et sa structure est moins bien caractérisée que celle de l'embryon. D'un point de vue pratique, le muscle larvaire présente une structure bien décrite et stéréotypée, reflet de la myogénèse embryonnaire mais plus facilement analysable que l'embryon (les muscles sont plus gros). De plus, les larves se déplacent et donc leurs muscles sont fonctionnels, permettant l'analyse de la mobilité et de l'hypercontractibilité (myotonie), un symptôme majeur de la DM1. Enfin, dès la fin de l'embryogénèse, les larves se nourrissent pour permettre leur croissance, ce qui suggérait une utilisation possible dans ce modèle de cribles de molécules, où l'on pourrait par exemple tester des drogues, à intégrer directement dans la nourriture.

La caractérisation phénotypique de ces modèles DM1 a permis de mettre en évidence les altérations musculaires majeures observées chez les patients : la présence de foci dans les noyaux musculaires, une myopathie avec des muscles plus petits associés à un défaut de fusion mettant en jeu la protéine Mp20 et un phénomène de fissuration ou « splitting » des fibres musculaires. La sévérité de ces phénotypes est dépendante du nombre de répétitions CTG, confirmant la corrélation entre le nombre de CTG et la sévérité de la maladie chez les patients. Enfin, une hypercontractibilité musculaire est observée dans les modèles DM1, elle est dépendante de Mbl, l'orthologue de MBNL1 et fait intervenir un défaut d'épissage de l'orthologue drosophile de l'ATPase Calcium-dépendante du réticulum endoplasmique dSERCA, semblable à ce qui est observé chez les patients DM1 avec l'altération de l'épissage de SERCA1 (Kimura *et al.*, 2005).

Une analyse transcriptomique a ensuite été menée pour tenter d'identifier des marqueurs moléculaires de la sévérité de la maladie. En effet, des études ont permis de mettre en évidence des biomarqueurs de la faiblesse musculaire liés à une dérégulation de l'épissage alternatif (Nakamori *et al.*, 2013). Notre étude se démarque en se focalisant sur des dérégulations transcriptionnelles, indépendantes de l'épissage alternatif principalement en analysant des gènes codant pour des transcrits uniques. Elle a notamment montré l'implication dans la sévérité des phénotypes musculaires, des composants sarcomériques





*Mhc* et *Up* mais aussi des transporteurs comme *Smyt* ou *CG17597*. Ces marqueurs pourraient être utilisés chez les patients à visée diagnostique ou thérapeutique. Nous avons donc voulu confirmer leur implication dans des modèles plus proches des patients, à l'aide d'un modèle cellulaire issu de biopsies de muscles fœtaux de patients (collaboration D. Furling) et dans un modèle murin présentant un grand nombre de CTG (collaboration G. Gourdon, Huguet *et al.*, 2012). Les travaux préliminaires dans ces deux modèles n'ont pas permis de valider complètement l'implication des candidats identifiés chez la drosophile. Cependant, le gène drosophile *CG33138* dérégulé négativement dans notre modèle DM1 et codant pour une enzyme de branchement du glycogène, est conservé chez l'Homme (*GBE1*, *Glycogen Branching Enzyme 1*) et retrouvé diminué dans une lignée cellulaire musculaire issue d'un fœtus DM1 possédant plus de 2500 CTG. De plus, ce gène est muté dans une maladie de stockage du glycogène (Glycogen storage disease IV, GSD IV), dont l'atteinte neuromusculaire se présente sous différentes formes de sévérité comme la DM1. Ce candidat devra donc être analysé en détail dans notre modèle car sa dérégulation, dépendante des CTG pourrait contribuer aux défauts musculaires observés.

Les perspectives pour ce projet sont donc de confirmer les résultats observés dans le modèle cellulaire en augmentant le nombre d'expériences indépendantes mais aussi d'analyser un autre muscle murin, le muscle soléaire des souris DMSXL dont l'analyse physiologique a montré plus de foci de taille importante et une expression du transgène plus forte par rapport au muscle gastrocnémien (Huguet *et al.*, 2012). Enfin, nous avons accès à des tissus murins avec un seul type de répétitions CTG (DMSXL, 1100-1300 CTG), ce qui nous permettra uniquement de confirmer si ces gènes sont dérégulés dans le contexte DM1 vertébré. Il faut envisager qu'il soit difficile d'observer cet effet de dérégulation dépendant de la taille des CTG dans les modèles cellulaires car de nombreuses études cliniques chez les patients, n'ont pas pu mettre en évidence de corrélation directe entre la sévérité d'un symptôme et le nombre de CTG, suggérant une réponse spécifique des patients à la toxicité induite par les répétitions.



## II. Analyse des phénotypes cardiaques dans le modèle drosophile DM1 et identification des gènes impliqués par la méthode du TU-tagging

### 1. Publication « *Drosophila* models recapitulate myotonic dystrophy type 1 heart dysfunction and reveal gene deregulations underlying DM1-associated arrhythmia and conduction defects »

La deuxième partie de ce projet s'intéresse aux symptômes cardiaques de la maladie, responsables de la deuxième cause de mortalité chez les patients DM1. Au début de ce projet, peu d'analyses étaient menées sur le cœur, hormis les études cliniques principalement descriptives. Un seul modèle murin spécifique du cœur avait décrit les phénotypes d'arythmie, de cardiomyopathie associée à une dysfonction diastolique et systolique chez des souris surexprimant 960 iCTG. Cependant, l'analyse dans ce modèle murin a été compliquée par une forte létalité, seulement deux semaines après l'induction des répétitions (Wang *et al.*, 2007). C'est pourquoi, il était intéressant de réaliser une étude du cœur chez la drosophile, pour laquelle le cœur n'est pas vital. En effet, la fonction cardiaque étant séparée de l'apport d'oxygène, qui se fait via le système trachéal, la drosophile peut survivre à des mutations qui sont létales dans d'autres modèles animaux. De plus, c'est un modèle utilisé depuis de nombreuses années pour étudier les cardiomyopathies comme celle observée dans la DM1 (Ocorr *et al.*, 2007). Cette étude visait donc à utiliser nos modèles inductibles pour exprimer les répétitions CTG dans le cœur de drosophile et à analyser en parallèle l'effet d'une atténuation de *Mbl* et d'une surexpression de *Bru-3* afin de déterminer l'implication de chacun de ces facteurs dans l'atteinte cardiaque.

Les résultats de ce travail sont regroupés dans une publication à soumettre et intitulée « *Drosophila* models recapitulate myotonic dystrophy type 1 heart dysfunction and reveal gene deregulations underlying DM1-associated arrhythmia and conduction defects », pour laquelle je suis 1er auteur. L. Picchio a contribué à ce manuscrit notamment par l'analyse des phénotypes cardiaques présentés plus loin, en utilisant la lignée pilote *Hand-Gal4* et C. Girardin (stagiaire Master II) a participé à l'analyse des candidats. L'analyse bioinformatique a été menée par Yoan Renaud.

Dans un premier temps, nous avons exprimé les 960 répétitions CTG à l'aide d'une lignée pilote *Hand-Gal4* exprimée dans le cœur, dès le stade embryonnaire et pendant toute la vie de la mouche. Nous avons observé la présence de foci chez les mouches adultes *Hand>960iCTG* (*Hand>DM1<sub>960</sub>*) âgées d'une semaine, dans les cardiomyocytes (CMs) et



dans les cellules péricardiaques (CPs). Ces foci sont aussi observables chez les mouches adultes âgées de 5 semaines (données non montrées).

Ensuite, nous avons décrit le patron d'expression des protéines Mbl et Bru-3 dans le cœur par immunomarquage. La protéine Mbl présente un profil sarcomérique dans les fibres longitudinales qui entoure le cœur ainsi que dans les muscles abdominaux. De plus, Mbl est faiblement exprimée dans le noyau des CMs et plus fortement dans le cytoplasme des CPs. Concernant Bru-3, la protéine est retrouvée très fortement exprimée dans les noyaux des CMs et plus faiblement les noyaux des CPs. Afin de valider les modèles *Hand>MblRNAi* et *Hand>Bru-3*, j'ai vérifié par RT-qPCR l'atténuation de *Mbl* et la surexpression de *Bru-3* dans le cœur de mouches adultes d'une semaine.

Pour les analyses physiologiques cardiaques des drosophiles, nous avons choisi d'utiliser la méthode SOHA (Semi-automated Optical Heartbeat Analysis), décrite dans le matériel et méthodes de l'article, qui permet d'analyser les paramètres rythmiques et contractiles du cœur en se basant sur une préparation de cœur semi-intacte, des films de 30 secondes et une analyse utilisant le logiciel Matlab (Ocorr *et al.*, 2007 ; Fink *et al.*, 2009). De plus, nous avons travaillé sur des femelles ayant un cœur est plus gros et donc plus facile à disséquer et l'analyse a été faite à deux temps, à 1 et 5 semaines pour observer l'effet du vieillissement sur le cœur de ces mouches DM1. En effet, la DM1 étant une maladie dégénérante, nous avons envisagé observer un effet additif de la maladie sur les effets de l'âge.

Nous avons ensuite pu analyser les phénotypes cardiaques de la lignée atténuée pour *Mbl* : ces mouches développent des défauts rythmiques et contractiles dès 1 semaine et qui persistent avec l'âge. Notamment, ce modèle présente une augmentation de la période cardiaque (sytole (contraction) + diastole (dilatation)). De plus, ces mouches sont plus arythmiques (augmentation de l'index d'arythmie) et on un cœur plus dilaté (augmentation des diamètres systolique et diastolique), associé à la réduction de la fraction de raccourcissement, qui traduit la difficulté du cœur à se contracter efficacement. Les mouches *Hand>MblRNAi* développent une cardiomyopathie dilatée causant une dysfonction systolique et diastolique.

Concernant la surexpression de *Bru-3* dans le cœur, elle provoque des défauts rythmiques, caractérisés principalement à 5 semaines par l'augmentation de l'intervalle systolique associée à la diminution de l'intervalle diastolique (de manière non significative). De plus et comme les mouches atténuées pour *Mbl*, le modèle *Hand>Bru-3* présente des



défauts contractiles avec une augmentation des diamètres de contraction et de relaxation à 1 et 5 semaines. Ce modèle présente en plus deux symptômes caractéristiques de la maladie : des défauts de conduction à 1 semaine, aussi observés dans le modèle *Hand>MblRNAi*, et une augmentation des taux de fibrillation à 5 semaines, que l'on retrouve dans le modèle *Hand>DMI<sub>960</sub>*.

Suite à l'analyse physiologique et pour tenter d'identifier les acteurs moléculaires responsables des phénotypes observés, nous avons réalisé une analyse transcriptomique par séquençage sur des échantillons ARN spécifiques du cœur, obtenus par la méthode tissu-spécifique du TU-tagging dont le protocole est détaillé dans le matériel et méthodes de l'article (Miller *et al.*, 2009). La validation par RT-qPCR puis le séquençage ont montré un enrichissement des transcrits cardiaques comme *Hand*, *H15* ou *Tin* dans les fractions spécifiques du cœur. L'analyse des données, faite par Y. Renaud a permis d'identifier des gènes dérégulés à 1 et 5 semaines dans les trois conditions analysées *Hand>MblRNAi*, *Hand>Bru-3* et *Hand>DMI<sub>960</sub>* parmi lesquels se trouvent une grande proportion de transcrits uniques. Ceci suggère comme pour les analyses précédentes dans le muscle larvaire, un rôle de Mbl et Bru-3 dans le cœur indépendant de l'épissage.

Ensuite, pour identifier des gènes dérégulés impliqués dans la fibrillation et les défauts conduction, les deux symptômes les plus représentés dans la DM1, nous avons respectivement croisé les listes de gènes dérégulés communs à *Hand>Bru-3* et *Hand>DMI<sub>960</sub>* à 5 semaines (fibrillation) et *Hand>MblRNAi* et *Hand>Bru-3* à 1 semaine (conduction). Ceci nous a permis d'identifier en particulier le gène *l(2)03659*, orthologue de *ABCC9*, un transporteur de la famille des protéines ABC (ATP-Binding Cassette), important pour le transport du potassium. L'atténuation de ce gène dans le cœur de la drosophile provoque une augmentation de l'arythmie à 5 semaines, corrélée à une augmentation de la fibrillation, comme observé dans les modèles DM1. De plus, ces mouches développent dès 1 semaine, des défauts sévères de conduction cardiaque. Des défauts de conduction sont aussi observés à 1 semaine, chez les mouches surexprimant *Straightjacket (Stj)*, l'orthologue de *CACNA2D*, qui code pour une sous-unité d'un canal calcique voltage-dépendant. Ce phénotype mime ce qui a été observé à 1 semaine chez les mouches *Hand>MblRNAi* et *Hand>Bru-3*.

Cette étude cardiaque des modèles DM1 a donc permis de reproduire chez la mouche les symptômes caractéristiques de l'atteinte du cœur chez les patients : de l'arythmie associée à une fibrillation, des défauts de conduction mais aussi une atteinte de la structure du cœur avec une cardiomyopathie dilatée. Les analyses transcriptomiques ont montré une





dérégulation de deux candidats qui pourraient expliquer l'arythmie et l'atteinte de la conduction, respectivement l'orthologue d'*ABCC9 l(2)03659* et l'orthologue de *CACNA2D Straightjacket*.



***Drosophila* models recapitulate Myotonic Dystrophy type 1 heart dysfunction and reveal gene deregulations underlying DM1-associated arrhythmia and conduction defects**

Emilie Plantié, Yoan Renaud\*, Cristiana Dondi, Lucie Picchio and Krzysztof Jagla#

*GReD - INSERM U1103, CNRS UMR6293, Clermont Université,  
28, Place Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand, France*

\* Actually: [www.byonet.fr](http://www.byonet.fr)

# Corresponding author

Phone: +33 4 73 17 81 81

Fax: +33 4 73 27 61 32

E-mail: [christophe.jagla@udamail.fr](mailto:christophe.jagla@udamail.fr)

*Keywords:* DM1, heart, *Drosophila*, TU-tagging, arrhythmia, conduction defects

*Short title:* DM1-associated cardiac gene deregulations in *Drosophila* models

## **ABSTRACT**

Altered heart function is at the origin of decreased life expectancy in Steinert disease, also called Myotonic Dystrophy Type 1 (DM1), a complex toxic CTG repeats disorder affecting multiple tissues. Accumulation of transcripts carrying CUG expanded repeats leads to misbalance between two RNA binding factors, MBNL1 and CELF1. However, molecular and genetic pathways linking toxic repeats with cardiac involvement in DM1 remain poorly understood. Here, we applied heart-targeted expression of 960CTG repeats, attenuation of MBNL1 and overexpression of CELF1 orthologs in *Drosophila* to mimic DM1 cardiac symptoms and identify underlying gene deregulations. Cell-specific transcriptional profiling of cardiac cells via TU-tagging allowed to identifying specific gene deregulation signatures common for the three pathological contexts, and suggesting accelerated cardiac aging in DM1. We also found that down regulation of *l(2)03659/ABCC9/SUR2*, a regulatory subunit of KATP potassium channel recapitulates DM1-associated arrhythmic symptoms, whereas increased level of *Straightjacket/CACNA2D4* encoding a component of voltage gated calcium channel mimics conduction disturbance, observed in DM1. Collectively, we provide the first global view of heart-specific gene deregulations in *Drosophila* DM1 models and identify conserved candidate genes involved in the main cardiac DM1 symptoms, arrhythmia and conduction defects.

## **INTRODUCTION**

Myotonic Dystrophy Type 1 (DM1) is the most prevalent muscular dystrophy found in adults, affecting one out of 8000 people worldwide<sup>1</sup>. This multisystemic disorder is caused by a CTG triplet repeat expansion in the 3' untranslated region of the *Dystrophia Myotonica Protein Kinase (DMPK)* gene located on chromosome 19 in human. DM1 targets mainly skeletal muscles and the heart with a correlation between the number of CTG repeats and the severity and age of onset, leading to several clinical forms of the disease. The mutated *dmpk* transcripts, containing expanded CUGs, form hairpin-like secondary structures in the nuclei, sequestering RNA-binding proteins with affinity to CUG-rich sequences. Among them, the alternative splicing factor (ASF) Muscleblind-like 1 (MBNL1) is trapped within the repeats forming nuclear foci aggregates, a hallmark of the disease<sup>2,3</sup>. In parallel the ASF CUGBP- and ELAV-like Family member 1 (CELF1) gets stabilized due to its phosphorylation by PKC<sup>4</sup>. This creates misbalance between MBNL1 and CELF1 and in consequence, missplicing of their target transcripts known as directly linked to disease symptoms. This includes shift from adult to fetal isoforms of *CLCN1*, *IR* and *SCN5A* respectively associated to myotonia<sup>5</sup>, insulin resistance<sup>6</sup> and heart conduction defects<sup>7</sup>. In spite of splicing defects, repeats toxicity in DM1 is associated with splice-independent perturbations such as the RAN translation, transcription factor leaching but also transcriptional gene deregulations and affected transcript's stability<sup>8</sup>. Thus, a combination of splice-dependent and independent events underlies DM1 pathogenesis.

About 80% of DM1 patients show altered heart function, encountering irregular heart beating and conduction disturbance, which can cause conduction blocks and eventually give rise to a heart block and sudden death<sup>9-11</sup>. Consequently, cardiac symptoms are at the origin of decreased patient life expectancy and after respiratory deficiency represent the second cause of death in DM1. However, to date only a restricted number of heart-oriented studies have been performed to identify molecular determinants of DM1-associated cardiac dysfunction. Among them, mice with targeted expression of 960 CTG repeats in the heart were found to recapitulate the main cardiac DM1 manifestations<sup>12</sup> and lead to identify a PKC inhibitor as ameliorating conduction and contraction defects<sup>13</sup>. More recently, the DMSXL

mouse model showed alteration of the sodium current properties as a contributor to contractile cardiac dysfunction<sup>14</sup>. In parallel, a *Drosophila* model expressing 250 pure CUG repeats specifically in the heart has also been found to recapitulate the main cardiac DM1 defects<sup>15</sup>.

*Drosophila* heart development and function is under control of conserved cardiac master genes including *Tinman* (*Nkx2.5*), *Neuromancer* (*Tbx20*), *dHand* (*Hand*) and *pannier* (*GATA4/6*)<sup>16–18</sup>. The simple tubular structure of the fly heart is composed of the contractile cells called cardiomyocytes and is surrounded by loosely associated pericardial cells. Like the vertebrate heart, some cardiomyocytes get specialized as pacemaker cells and are responsible for sending the impulse along the tube allowing its autonomous contraction<sup>19,20</sup>. Importantly, the main actors controlling heart contractions such as the K<sup>+</sup> channels KATP or KCNQ or the Calcium ATPase dSERCA are also conserved making *Drosophila*, a well suited model to dissect the molecular mechanisms underlying cardiac dysfunction and contractility defects in DM1<sup>21,22</sup>.

Here, we took advantage of our previously described inducible DM1 *Drosophila* model with 960 interrupted CTGs (*DM1<sub>960</sub>*) that recapitulated main disease manifestations such as foci formation and muscle hypercontractility when expressed in larval muscles<sup>23</sup>. In this study, we targeted the 960 CTGs to the heart (*Hand*>*DM1<sub>960</sub>*) showing that adult flies display DM1 heart beating phenotypes such as fibrillation and arrhythmicity. Moreover, cardiac specific attenuation of *Drosophila* *MBNL1* orthologue *Muscleblind* (*Mbl*) leads to dilated cardiomyopathy (DCM) and conduction disturbance whereas overexpression of *CELF1* orthologue *Bruno-3* (*Bru-3*) leads to fibrillation and conduction defects. Thus, these three pathogenic contexts recapitulated collectively the main DM1 cardiac symptoms and prompted us to perform transcriptional profiling to identify associated gene deregulations. By combining heart targeted TU-tagging approach<sup>24</sup> with RNA sequencing, the global gene expression profiles specific to each pathogenic condition in young and aged flies have been generated revealing deregulation of several conserved candidate genes and suggesting accelerated heart aging in DM1.

Altogether, we provide evidence for DM1-associated cardiac symptoms in three different fly DM1 models and report the first global analysis of heart-specific gene deregulations associated with DM1 including the depleted levels *I(2)03659/ABCC9/SUR2* encoding regulatory subunit of potassium KATP channel and up-regulation of voltage-gated calcium channel component *Stj/CACNA2D4* involved in fibrillation and conduction defects, respectively.

## **MATERIAL AND METHODS**

### ***Drosophila* stocks**

All fly stocks were maintained at 25°C on standard fly food in a 12:12 hours light–dark cycling humidified incubator. To generate the DM1 *Drosophila* models, the following inducible lines were used: *UAS-i960CTG* (Picchio *et al.*, 2013<sup>25</sup>), *UAS-MbIRNAi* (v28732, VDRC, Vienna, Austria), *UAS-Bru3 37* (*bru-3<sup>d09837</sup>*, BDSC, Bloomington, USA) and crossed with the driver line *Hand-Gal4* (Kind gift from L. Perrin, TAGC, Marseille) to specifically target transgenes expression to the fly heart (cardiomyocytes and pericardial cells). Control lines were generated, crossing the above-cited lines with *w<sup>1118</sup>* flies. For TU-tagging experiments, the UPRT line (*UAS-HA-UPRT* 3.2, #27604, BDSC, Bloomington, USA) was combined with the previously cited UAS lines and with *UAS-LacZ* (#1776, BDSC, Bloomington, USA) as a control, generating *UAS-LacZ;UAS-HA-UPRT*, *UAS-MbIRNAi;UAS-HA-UPRT*, *UAS-bru3;UAS-HA-UPRT* and *UAS-960iCTG;UAS-HA-UPRT* stocks. The following lines were used for candidate genes analyses: *UAS-I(2)03659RNAi* (VDRC, KK100105) and *UAS-Stj* (FlyORF, F 001252).

## **Optical heartbeat analyses of adult *Drosophila* hearts**

To assess cardiac physiology in adult flies, the previously described method<sup>26,27</sup> was used. Briefly, 1-week or 5-weeks old flies were anesthetized using FlyNap (# 173025, Carolina) and dissected in artificial hemolymph solution, removing the head, legs, wings, gut, ovaries and fat body. The hearts were allowed to equilibrate with oxygenation for 15-20 minutes prior to making 30-seconds movies with Hamamatsu camera (Frame rate >100 frames/sec) under Zeiss microscope (10X magnification). Movie analysis was performed using SOHA (Semi-automatic Optical Heartbeat Analysis) method based on Matlab R2009b (Mathworks, Natick, MA, USA) application to collect contractility (diastolic and systolic diameters, fractional shortening) and rhythmicity (heart period, diastolic and systolic intervals and arrhythmicity index) parameters.

## **Fluorescence in situ hybridization (FISH) and immunofluorescence staining**

To confirm foci formation in our model, fly hearts were dissected as described above and the in situ hybridization protocol was used as described previously<sup>28</sup> using a *Cy3-(CAG)<sub>10</sub>* probe (Eurogentec). For immunostainings, hearts were washed three times with PBST (PBS 1X, Triton 0,5%) after fixation and blocked 20 minutes with 20% Horse Serum in PBST. Then, primary antibodies were incubated at room temperature (RT) for 2 hours (Sheep Anti-Mbl antibody (Kind gift from Darren Monckton) and Rabbit anti-Bru-3 (1:1000; Millegen, Toulouse, France). After three washes, fluorescent secondary antibodies were incubated 1 hour at RT (Jackson ImmunoResearch) for Bru-3 condition. For Mbl, a biotinylated anti-sheep antibody (Biotin-SP-AffiniPure Donkey Anti-Sheep IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch) was incubated 1h30 at RT. After washes, DTAF-Conjugated Streptavidin (Jackson ImmunoResearch) was incubated 30 minutes. The hearts were mounted in Vectashield mounting medium with DAPI (Vectashield, Vector Laboratories).

## **RNA extraction and RT-qPCR**

Total RNA was extracted from about 10, 1-week or 5-weeks old, entire or dissected (head, legs, wings and ovaries removed) adult flies, using TRIzol reagent (Invitrogen) following manufacturer's instructions. RNA quality and quantity were then assessed using Agilent RNA 6000 Pico kit on Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) for the quality and using Qubit RNA HS assay kit on Qubit 3.0 Fluorometer (Thermo Fischer Scientific) for RNA quantity.

## **TU-tagging experiments**

The TU-tagging protocol was adapted from previously published studies<sup>24,29</sup>.

### *4TU treatment, fly collection and total RNA extraction*

TU-tagging experiments were performed on the following 1-week and 5-weeks old adult flies: *Hand>LacZ;HA-UPRT*, *Hand>MblRNAi;HA-UPRT*, *Hand>Bru3;HA-UPRT* and *Hand>960CTG;HA-UPRT*. Briefly, flies were starved at 25°C for 6 hours and transferred to fresh food media containing 4TU (Sigma) at 1 mM. After a 12 hours incubation at 29°C, about 30 to 40 flies of the described genotypes were dissected (head, wings, legs, ovaries and gut removal) in DPBS 1X (Gibco, Life Technologies) and immediately transferred to Eppendorf tubes and shock-frozen in liquid nitrogen. Total RNA isolation was performed as described above in TRIzol following manufacturer's instructions (ThermoFischer Scientific).

### *Purification of TU-tagged RNA*

Bio-thio coupling was performed on about 30 µg of total RNA with 1 mg/mL Biotin-HPDP (Pierce) for three hours followed by two chloroform purification steps to eliminate the

unbound Biotin, as described in Miller et al., 2009<sup>24</sup>. To confirm the biotinylation step efficiency a RNA-dot blot was performed using Streptavidin-HRP antibody. Next, the Streptavidin purification step allowed collecting the thiolated-RNA fraction (4-TU cardiac specific) and the unbound fraction (non cardiac RNAs) using  $\mu$ MACS Streptavidin kit (MACS, Miltenyi Biotec) following manufacturer's instructions. The purified fraction was precipitated as described in Miller et al., 2009<sup>24</sup>. Again, RNA quality and quantity were assessed using Bioanalyzer and Qubit systems as described above. RT-qPCR was performed to check for enrichment of *Hand* and *H15* cardiac genes) comparing 4-TU fraction relative to the input fraction (i.e the biotinylated fraction containing cardiac and non cardiac RNAs) and using *Rp49* gene as reference.

## **RNA-sequencing**

### *Library preparation*

Library preparation was performed on about 50 ng of cardiac specific RNA from the previously described conditions, using the Ovation RNA-Seq Systems 1-16 for Model Organisms adapted to *Drosophila* (NuGEN, #0350-32) following manufacturer's instructions with few modifications. First-strand synthesis was performed with the integrated DNase treatment (HL-dsDNase, ArcticZymes) and cDNA was fragmented using Bioruptor sonication system (Diagenode) with 30 cycles of 30 seconds ON/OFF on low power. 15 PCR cycles for library amplification were performed for 50 ng of starting RNA and a size-selection bead purification step was done using RNAClean XP beads (Agencourt AMPure, Beckman Coulter). Quantitative and qualitative assessment of the library was performed using Agilent dsDNA HS kit on Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).

### *Sequencing parameters*

The indexed Illumina libraries prepared from the cardiac specific *Hand>LacZ;HA-UPRT*, *Hand>MblRNAi;HA-UPRT*, *Hand>Bru3;HA-UPRT* and *Hand>960ctg;HA-UPRT* RNA fractions were mixed at equal concentration and sequenced (100-bp paired-end reads) on the same lane of a HiSeq 2000 (EMBL Gene Core Illumina Sequencing facility, Heidelberg, Germany). The four-genotype conditions were sequenced in duplicate for 1-week and 5-weeks old flies, representing a total of 16 samples sequenced.

### *Data analysis*

The good quality of the RNA-sequencing data was examined using the package FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Each sample was aligned to the reference genome Dmel release 5.49 using Bowtie2<sup>30</sup>. The aligned reads were sorted and indexed using SAMtools<sup>31</sup> and Pearson correlation was determined for each duplicate on each condition. Gene differential expression was obtained using a pipeline based on Deseq2 package. Rlog transformation was applied on the raw count data obtained for the different duplicates of each condition before computing differential expression. The genes are tested individually for expression differences between conditions. We fixed the fold-change lower threshold at 1.7 and the p-value threshold at 0.05 for meaningful up differential expression and fold-change upper threshold at 0.59 and p-value threshold at 0.05 for meaningful down differential expression.

## **Statistical analyses**

All statistical analyses were performed using Graph Pad Prism (GraphPad Inc, USA, version 5.02) software.



## **RESULTS**

### ***Characterization of new cardiac DM1 Drosophila models***

To characterize the cardiac symptoms in our previously established DM1 *Drosophila* model<sup>25</sup>, the *UAS-960iCTG* line was crossed with a cardiac-specific *Hand-Gal4* line, driving expression in cardiomyocytes and pericardial cells<sup>32</sup>. The resulting *Hand>DM1<sub>960</sub>* adult flies exhibit foci formation in the nuclei of two targeted cardiac-cell populations (Fig.1A), recapitulating the main DM1 manifestation.

Since DM1 is a splicing RNA-dominant disorder involving the ASFs MBNL1 and CELF1, we first tested expression of their *Drosophila* orthologues, Mbl and Bru-3 in the adult fly heart. The Mbl protein displays sarcomeric pattern in heart-associated longitudinal muscle fibers and, as expected, is present in the nuclei of cardiomyocytes (arrows in Fig. 1B). In addition, a faint cytoplasmic Mbl signal is detected in the cytoplasm of pericardial cells (large arrow in Fig. 1B). In agreement with previously published data<sup>33</sup>, Mbl expression is also found in the sarcomeres of adult abdominal muscles (arrowhead in Fig. 1B). The *Drosophila* CELF1 orthologue Bru-3 displays a distinct cardiac expression pattern. It is highly expressed in the nuclei of cardiomyocytes and it is also detected at a lower level in the nuclei of pericardial cells but not in the longitudinal muscles (Fig. 1C). Taking together, finding that MBNL1 and CELF1 orthologues are expressed in the *Drosophila* heart and particularly in contractile cardiomyocytes, makes the fruit fly an adapted model to assess cardiac defects in the DM1 contexts. Also, using the GAL4/UAS system on the selected lines allowed attenuating the expression of *Mbl* and overexpressing *Bru-3* specifically in cardiac cells as demonstrated by RT-qPCR, mimicking disease-associated modulation of their levels (Fig. 1D, E).

### ***The Drosophila Hand>DM1<sub>960</sub>, Hand>MblRNAi and Hand>Bru-3 lines display the main cardiac DM1 symptoms observed in patients***

To assess the cardiac physiology of our DM1 fly models, we used the already described SOHA method<sup>21,27</sup> that allows analyzing contractility and rhythmicity parameters of the adult *Drosophila* heart. Since the fly heart shows decreased cardiac function with age, we tested cardiac parameters of the DM1 flies in 1-week and 5-weeks old flies. We assumed that it could help observing an additive toxic effect of DM1, which could accelerate age-related degenerative processes. We also designed experiments in a way to compare cardiac defects induced by heart-targeted expression of the toxic repeats (*Hand>DM1<sub>960</sub>*) with those that result from the misbalance between MBNL1/Mbl and CELF1/Bru-3 proteins. To do so, we analyzed cardiac performance in *Hand>MblRNAi* and *Hand>Bru-3* lines, mimicking the sequestration of Mbl by the toxic repeats and Bru-3 protein stabilization, respectively.

We found that the *Hand>MblRNAi* flies exhibit at 1 and 5-weeks an increased heart period (consisting of the diastolic and the systolic intervals) mainly due to increased diastolic interval (Fig. 2A). Moreover, the attenuation of *Mbl* leads to increased arrhythmicity, revealed by an increased Arrhythmia Index (AI) (Fig. 2B). This arrhythmicity condition is also observed in individually analyzed *Hand>MblRNAi* flies at 5-weeks, showing more variation of heart periods from the beating heart of one fly (Fig. 2C). In addition to heart beating defects, we observe an increased diameter of *Hand>MblRNAi* hearts (Fig. 2D), a phenotype confirmed by the analysis of contractility parameters showing that both diastolic and systolic diameters are significantly higher (Fig. 2E, F). Thus, these observations associated to a decreased fractional shortening indicate that *Hand>MblRNAi* flies develop a dilated cardiomyopathy (DCM) phenotype (Fig. 2G), suggesting that these DM1 symptoms could result specifically from reduced MBNL1/Mbl levels.

Next, we characterized the cardiac phenotypes of the *Hand>Bru-3* and *Hand>DMI<sub>960</sub>* adult flies. Both these lines, and to a higher extent the *Hand>DMI<sub>960</sub>* flies, develop altered heart period at 5-weeks (Fig. 3A), correlated with affected systolic (Fig. 3B) and diastolic (Fig. 3C) intervals. Moreover, *Hand>Bru-3* flies display contractility defects with increased heart diameters at 1 and 5-weeks (Fig. 3D, E). At 5-weeks, both *Hand>Bru-3* and *Hand>DMI<sub>960</sub>* flies also develop an increased fibrillation phenotype (Fig. 3F). In *Hand>DMI<sub>960</sub>* flies, this fibrillation defect is associated with increased periods of sustained dilation, called asystole leading to an increased arrhythmia index (Movie 1).

We then tested whether our models display conduction defects, a common cardiac DM1 symptom causing fatigue, shortened breath or even sudden death<sup>34</sup>. Since the fly heart is a linear tube and the pacemaker node cells are at the anterior and posterior extremities of this tube, the impulse that goes from anterior to posterior or from posterior to anterior is normally imperceptible. For this reason, to identify a conduction disturbance in *Drosophila*, we tested whether two adjacent segments of the dorsal vessel display different beating rate. Indeed, as shown in the movie 2, such a differential heart beating rate could be observed in 1-week old *Hand>MblRNAi* flies. When comparing M-modes of asynchronously beating heart segments, we found that in *Hand>MblRNAi* flies, one segment could beat twice as fast as the adjacent segment (Fig. 4A). This delay in conduction was observed and quantified in the *Hand>MblRNAi* and *Hand>Bru-3* pathologic flies at 1-week of age but unexpectedly is no longer observed at 5-weeks (Fig. 4B). As the conduction defects can lead to cardiac arrest and increased death risk in DM1 patients, we tested whether it could also be at the origin of reduced survival in the fly DM1 models, which would explain why we do not detect conduction phenotypes in older flies. However, the *Hand>MblRNAi* and *Hand>Bru-3* flies displaying conduction defects survive almost normally compared to control flies (Fig. 4C). This could be due to the fact that oxygen supply is provided by the tracheal system and thus independent from the heart. It also suggests that a compensation mechanism exists in *Drosophila* that allows correcting the originally observed delay in conduction.

Taken together, the performed analyses revealed that all cardiac symptoms associated with DM1, including fibrillation, conduction defects and DCM, could be detected in our fly models, some of them specific for a given pathological context and accentuated with age. Thus, we hypothesized that by performing transcriptional profiling of cardiac cells from the characterized *Drosophila* DM1 lines could help deciphering the molecular actors responsible for DM1-associated cardiac symptoms.

### ***Genome wide transcriptional profiling of cardiac cells from DM1 flies using TU-tagging approach***

To get insight into the molecular mechanisms underlying DM1 cardiac phenotypes, we performed transcriptomic analyses on adult cardiac cells from the DM1 fly models using cell-specific approach called TU-tagging<sup>24</sup>. This method allows tissue-specific RNA isolation by expressing the Uracil Phospho Ribozyl Transferase (UPRT) enzyme in a tissue-specific manner with the Gal4/UAS system. This enzyme allows the incorporation of a modified Uracil, the 4-thio-Uracil (4-TU) in the tissue of interest and generation of TU-tagged transcripts. We applied the Gal4/UAS system to drive UPRT expression in cardiac cells leading to incorporation of Uracil into neo-synthesized RNAs in adult heart cells only (Fig. 5A). To collect cardiac specific RNA from our DM1 models, we created *Drosophila* lines (see Experimental Procedures) combining a *UAS-UPRT* transgene and the transgenes for the DM1 models (*UAS-MblRNAi*, *UAS-Bru-3* and *UAS-960-iCTG*) and confirmed, after crossing with *Hand-Gal4* driver, that these transgenes are expressed specifically in cardiomyocytes and pericardial cells (Fig. S1). Then, the thiolated RNA was isolated as described in Experimental Procedures (Fig. 5B, C). After purification steps, the cardiac specificity of

isolated transcripts was verified by RT-qPCR (Fig. 5D, E). In all contexts analyzed on 1-week old flies, we found a high enrichment of *Hand* and *H15* transcripts (9,7 to 16 times and 12,4 to 29,7 times, respectively) that are heart specific. Moreover, the non-cardiac *Gcm1* and *Bicoid* transcripts expressed respectively in glial cells and ovaries were depleted (Fig. 5D). Similar results were obtained after TU-tagging performed on 5-weeks old flies with enrichment of cardiac genes and depletion of the negative control genes but to a lesser extent (Fig. 5E). These differences of relative expression are not due to a decrease of cardiac transcripts collection but to a decrease of *Hand* and *H15* expression in older flies of all the genotypic contexts analyzed (Fig. S2). The validated cardiac-specific RNA fractions from pathological and from control conditions were then submitted to RNA sequencing leading to identification of gene deregulations in a context and time-specific manner (Fig. 5F, Fig.6).

Comparing the RNA-sequencing data obtained from *Hand>LacZ;HA-UPRT* 1-week old flies to the total RNA fraction allowed identifying an enrichment of cardiac-specific genes such as *Hand* and *H15* transcripts, previously used for RT-qPCR validation, which show respectively 9 and 30 times enrichment in the fly heart (Fig. 5F). In the same extent, the *Nkx2.5* orthologue, *tin* known as a cardiac master gene was also found enriched 12 times and *mid*, the *TBX20* orthologue shows a 8 times enrichment, together with other known cardiac genes such as *shaw* (*KCNC* orthologue) and *tup* (*ISL1* orthologue) respectively enriched 4,9 and 2,9 times (Table 1).

Thus, adapting the TU-tagging approach to *Drosophila* cardiac system and DM1 models turned out to be well suited for transcriptional profiling of adult cardiac cells.

### ***Heart specific gene deregulation signatures in DM1 Drosophila models***

As stated before, RNA sequencing data from cardiac specific TU-tagged transcripts have been generated in control (*Hand>LacZ;HA-UPRT*) and 3 different DM1 pathological contexts (*Hand>MblRNAi;HA-UPRT*, *Hand>Bru-3;HA-UPRT* and *Hand>DM1<sub>960</sub>;HA-UPRT*) in young (1 week) and aged (5 weeks old) flies. For each genetic context and time point, only candidates with a threshold of  $FC > 1,7$  for up-regulated genes or  $FC < 0,58$  for down-regulated genes with an adjusted  $p$ -value  $< 0,05$  have been selected. This allowed identifying a relatively restricted number of up (ranging from 138 genes in 1 week *Hand>Bru-3* context to 759 genes in 5 weeks old *Hand>DM1<sub>960</sub>* flies) and down regulated genes (ranging from 192 genes in *Hand>Bru-3* to 404 genes in *Hand>DM1<sub>960</sub>* 1 week contexts) (Fig. 6, see Venn diagrams). Interestingly, around 60% of deregulated genes fit into single-transcript genes category (Fig. 6) confirming an important contribution of splice-independent gene deregulations in DM1 fly models, already observed in the context of transcriptional profiling of larval muscle-targeted DM1 models<sup>25</sup>. High proportion of evolutionary conserved single-transcript genes that we find deregulated (Fig. 6) strongly suggests that splice-independent gene deregulation contributes to DM1 pathogenesis in Human, including cardiac symptoms. To identify DM1 cardiac gene deregulation signatures, we analyzed common candidate genes for the three genetic contexts and found they fit to particular gene categories. For example, the main class of genes that are up-regulated in 1 week aged DM1 hearts corresponds to Cytochrome P450 (Cyp) family involved in oxidation-reduction metabolic processes (Fig. 6A) whereas in aged flies (at 5 weeks) up-regulated genes are involved in defense response, proteolysis and apoptosis (Fig. 6B). These categories of genes are known to be involved in aging processes and could indicate an accelerated aging in our fly cardiac DM1 model. On the other hand, our comparative analyses reveal a distinct DM1 heart signature of down-regulated genes including *Tim17* and other mitochondrial inner membrane translocases, non-inhibitory Serpins (*Spn75*) and Kinesin-like microtubule motor, *Klp54D*. Down-regulation of these categories of genes is seen at 1 and at 5 weeks of age in all pathological contexts (Fig. 6). In spite of *Tim17* whose reduced levels has been found

associated with dilated cardiomyopathy and heart failure in human<sup>35</sup>, cardiac involvement for other candidates remains to be assessed. To have a global view on biological processes, which are affected in fly cardiac DM1 models we performed gene ontology (GO) analyses combining both up and down deregulations (Fig. 6 and Fig. S3). When focusing on *Hand>DMI<sub>960</sub>* context at 1 week, we found that the largest gene category deregulated fits into metabolic and more particularly to “oxidation-reduction” processes (Fig. 6A). The GO distribution of deregulated genes in *Hand>DMI<sub>960</sub>* context at 5 weeks is dramatically different with the majority of genes fitting into “defense response” and “proteolysis” classes (Fig. 6B). Since deregulation of defense response genes represents a hallmark of aging<sup>36</sup>, our data support a view that DM1 condition induces aging-related processes. Interestingly, similar age-related GO distribution could be observed in *Hand>MblRNAi* 5-weeks flies (Fig. S3). In contrast to *DMI<sub>960</sub>* and *MblRNAi* contexts, the GO analysis of deregulated genes in *Hand>Bru-3* condition (Fig. S3) reveals prevalence of “peptide metabolism” and “translation” categories. This observation suggests that Bru-3 when overexpressed could accumulate in the cytoplasm of cardiac cells, bind to a subset of transcripts and regulate their translation. It also supports previous finding that CELF1 has no major role in alternative splicing regulation in differentiating myoblasts<sup>37</sup> and our unpublished observations (Picchio L. and Jagla K.) that Bru-3 in addition to nuclear localization also localizes to the cytoplasm of muscle fibers and controls translation of sarcomeric proteins.

### ***Gene deregulations underlying cardiac defects observed in DM1 fly models***

The RNA sequencing data generated from the different DM1 genetic contexts that are characterized by specific cardiac phenotypes such as dilated cardiomyopathy in *Hand>MblRNAi* or fibrillation in *Hand>DMI<sub>960</sub>* and *Hand>Bru-3* flies allowed performing comparative analyses and identifying gene deregulations underlying particular cardiac defects (Fig. 7 and 8, Fig. S4). Among selected candidates, ranking was performed taking in consideration three criteria: i) the strength of deregulation (fold change), ii) gene conservation in human and iii) age-involving deregulation (Table 2). Candidate genes clustering according to their level of deregulation and their Gene Ontology has also been performed and illustrated using heatmaps and volcano graphs for each condition (Fig. 7 and 8, Fig. S4).

Candidates potentially involved in DCM corresponded to genes deregulated exclusively in the *Hand>MblRNAi* context, excluding those also deregulated in two other genetic conditions analyzed and selecting only genes deregulated in the same way at 1-week and 5-weeks (Fig. S4). This has led to selecting two candidates that could explain the DCM: *inactive (iav)* and *big brain (bib)*. *iav* encodes a transient receptor potential cation channel from V subfamily (TRPV) orthologous to human TRPV5/6. It has been reported that one member of this family, TRPV2 is involved in normal cardiac function and structure in mice and when mutated leads to a dilated heart and conduction defects<sup>38</sup>. The second candidate, *big brain (bib)* codes for a transmembrane protein homologous to mammalian aquaporin (AQP) previously shown to be deregulated after myocardial infarction<sup>39</sup> but also to interact with *pannier (pnr)*, GATA4/6 orthologue required for heart function<sup>40</sup>. As DCM is only a rare cardiac DM1 manifestation, here we did not focus on those candidates, however analyzing their function would be of interest to better characterize genetic determinants of dilated cardiomyopathy.

Candidates potentially involved in fibrillation were selected by comparing genes deregulated in *Hand>DMI<sub>960</sub>* and *Hand>Bru-3* contexts at 5-weeks (Fig. 7). Among the top-ranked candidates deregulated in both these contexts, are three genes: i) *l(2)03659* whose human orthologue encodes ATP binding cassette subfamily C (ABCC); ii) *CG31106*, orthologue of *Solute Carrier Protein family 22 (SLC22)* and iii) *CG43980* orthologue of *Ankyrin Repeat And BTB (POZ) Domain Containing 2 (ABTB2)* gene in human. A member of



ABCC family, *ABCC9* was found mutated in patients showing DCM and altered heart rhythm whereas *SLC22* members are important for the regulation of acido-basic cardiac balance<sup>41</sup> indicating that their deregulation could impact the normal heart function.

Finally, to select candidates with potential role in conduction disturbance, we analyzed pool of genes that were deregulated both in *Hand>MblRNAi* and in *Hand>Bru-3* contexts at 1 week (Fig. 8). Top ranked candidates included *inactivation no afterpotential D (inaD)*, *syntrophin-like 1 (syn1)* and *Straightjacket (Stj)* whose respective human orthologues are *FRMPD2*, *SNTA1* and *CACNA2D4*. In *Drosophila*, the voltage-gated calcium channel *Stj* was already described for its function in synaptic signalling in *Drosophila* neural cells and in human, mutations for the *CACNA2D4* were associated with familial atrial fibrillation<sup>42,43</sup>. The structural protein alpha-1 Syntrophin, *syn1* coding gene orthologue, was shown mutated in patients with long QT syndrome, a disorder involving abnormal heart repolarization and leading in some cases to ventricular arrhythmia and sudden death<sup>44</sup>. Finally, *inaD* plays a role in the *inaD*-signalling complex responsible for photo-transduction through a calcium-mediated process and attached to the transient receptor potential (TRP) channel<sup>45</sup>.

Thus, for each phenotypic category 2 or 3 top ranked candidates have already been involved in cardiac function and could potentially contribute to the DM1-associated cardiac defects.

### ***The deregulation of l(2)03659/ABCC9 and Straightjacket (Stj)/CACNA2D4 mimic fibrillation and conduction defects observed in DM1***

Functional analyses of selected candidates consisted in assessing particular cardiac phenotypes in RNAi or in gain-of-function contexts to test whether the transcriptional deregulation of candidates could be at the origin of cardiac DM1 symptoms.

Among candidates, we first assessed the effects of *l(2)03659* gene deregulation in the heart, using a UAS-RNAi line since its expression is decreased in the heart of *Hand>DM1<sub>960</sub>* and *Hand>Bru-3* flies (Fig. 7A). When expression of *ABCC9* orthologue is attenuated in the heart, about 35% of the flies develop a fibrillation phenotype at 5-weeks, which is reminiscent of the defects observed in aged *Hand>DM1<sub>960</sub>* and *Hand>Bru-3* flies (Fig. 7B). This increased fibrillation is associated to increased arrhythmia index (Fig. 7C). Moreover, our data reveal that *l(2)03659/ABCC9* also regulates cardiac conduction since its attenuation leads to important conduction defects in 1-week and 5-weeks old flies with respectively 70% and 60% of the flies showing these conduction defects (Fig.7D).

We also analyzed the effect of *Stj* deregulation by crossing a *UAS-Stj* line with the cardiac driver line *Hand-Gal4* to mimic overexpression of *Stj* detected in 1-week old *Hand>MblRNAi* and in *Hand>Bru-3* flies (Fig. 8A). We found that increasing expression of *Stj* in the heart phenocopies the conduction defects observed in *Hand>MblRNAi* and in *Hand>Bru-3* contexts (Fig. 8B) since about 20% of the flies show disorganized rhythmicity conduction between two adjacent segments. Moreover, to a lesser extent, *Hand>Stj* flies exhibit fibrillation at 1-week (Fig 8C). Since these conduction and fibrillation defects are no longer present in 5-weeks old flies, we could imagine that the overexpression is no longer efficient (due to a lower *Hand-Gal4* expression in older flies) or that some other gene deregulations take place in this context that could counteract the overexpression of *Stj*.

Altogether, we provide evidence for DM1-associated cardiac involvement of two top ranked candidate genes, validating heart specific genome-wide transcriptional profiling as a way to identify functionally relevant disease-associated gene deregulation.

## **DISCUSSION**

Cardiac defects are the second major cause of death in DM1. Here, we used *Drosophila* models to get insights into molecular determinants of cardiac dysfunction in DM1 pathological contexts. We took advantage of the Gal4/UAS system allowing cardiac targeting to analyze heart phenotypes in previously characterized DM1 conditions<sup>25</sup>. We found that a defined cardiac defect could be associated with a given DM1 context. For example, *Hand>DMI<sub>960</sub>* flies specifically display arrhythmic heart beating with fibrillations, whereas conduction defects are observed in *Hand>MblRNAi* and *Hand>Bru-3* conditions only. These observations support a view<sup>15</sup> that *Drosophila* represents an adapted model for studying cardiac involvement in DM1 and reveal that a complex genetic regulation underlies DM1 heart dysfunctions.

To tackle this so far unsolved issue, we decided to apply cardiac-specific transcriptional profiling to get a global and unbiased view on gene deregulations associated with DM1 cardiac phenotypes. To this end, we adapted TU-tagging approach previously found suitable for transcriptomic analyses of neural cell subsets<sup>24</sup>. We tested several conditions to optimize TU-label incorporation, subsequent isolation of tagged biotinylated transcripts and generation of ribosomal RNA depleted cDNA libraries. As an outcome, we describe here a modified and validated TU-tagging protocol adapted to *Drosophila* adult heart RNA-sequencing analyses. This represents an attractive tool for future cell-specific genome-wide analyses of rare cells in adult flies, which could easily be adapted to other model organisms.

### ***Transcriptional profiling of cardiac DM1 models reveals specific gene deregulation signatures and suggests accelerated aging***

Our global cardiac cell-specific analyses have led to several observations. We first noticed that cardiac targeting allowed identifying restricted lists of up and down regulated genes for each DM1 context, thus facilitating further selection of candidates for functional analyses. Like in the case of muscle targeting<sup>25</sup>, high contribution of single transcript genes (ranging from 55 to 63%) has been found in DM1 heart targeting contexts. Interestingly, the single transcript and thus splice-independent gene deregulations represent about 60% in *Hand>MblRNAi* and *Hand>Bru-3* conditions strongly suggesting that these two RNA binding factors could contribute to DM1 pathogenesis by regulating gene expression in a splice-independent way. This view is supported by the high evolutionary conservation of deregulated single-transcript genes and also by recent report that both MBNL1 and CELF1<sup>46</sup> bind not only intronic splice-involved motifs but also show high affinity binding to 3'UTR sequences of a large set of genes and antagonistically regulate mRNAs localization and stability.

When focusing on genes commonly deregulated in cardiac cells of *Hand>MblRNAi*, *Hand>Bru-3* and *Hand>DMI<sub>960</sub>* contexts, we found that gene expression signatures differ at 1 and 5 weeks. Among the common up regulated candidate genes at 1 week, are several *Cyp* (*Cytochrome P450*) family members involved in oxidation-reduction processes as well as genes acting in carbohydrate metabolism. Increased expression of this class of genes suggests that DM1 condition leads initially to boosting energy production most probably because of a higher energy demand to ensure heart function in the pathological context. At 5 weeks, cardiac signature of commonly up-regulated genes in the three DM1 contexts changes dramatically. We observe high expression levels of genes encoding defense and stress response proteins, such as small secreted Turandot (Tot) peptides, but also genes involved in proteolysis, apoptosis and autophagy, previously found associated with cardiac aging in *Drosophila*<sup>36,47</sup>. Thus, finding that at 5-weeks the expression levels of aging-related genes is

higher in DM1 than in control fly hearts strongly suggests that in DM1 contexts cardiac cells accelerate their aging. Similarly, Gene Ontology (GO) analyses in *Hand>DM1<sub>960</sub>* context clearly show that in aged DM1 hearts the majority of deregulated genes fit into defense response and proteolysis GO categories. Altogether, this supports a view<sup>48</sup> that DM1 models could serve for studying aging processes. In addition, one of commonly up-regulated at 5-weeks genes is *Niemann-Pick type C-2a (Npc2a)*, encoding cholesterol transporter and causing rare neurodegenerative Niemann-Pick disease characterized by strong cardiac involvement<sup>49</sup>. It is well known that sterol homeostasis is critical for heart beating, however whether *Npc2a* plays a role in healthy and in DM1 hearts remains to be assessed.

Finally when analyzing genes commonly down regulated in *Hand>MblRNAi*, *Hand>Bru-3* and *Hand>DM1<sub>960</sub>* contexts, we found a restricted gene expression signature with few genes, which remain down regulated in all contexts in 1 week and in 5-weeks old flies. Among them are non-inhibitory Serpins (*Spn75B/F*), kinesin-like microtubule motor (*Klp54D*) and mitochondrial inner membrane translocase (*Tim17b1*). Impact of *Spn75B/F* and *Klp45D* gene down regulations on heart function is unknown but reduced expression of *TIMI7* has previously been reported as associated with heart failure in human<sup>35</sup>.

Thus, global heart-specific transcriptional profiling led to identifying DM1-associated signatures of up and down regulated genes, notably revealing hallmarks of accelerated aging in DM1 condition as well as down regulation of a set of mitochondrial inner membrane translocases including *Tim17b1* associated with heart failure.

### **Regulatory subunits of potassium *l(2)03659/ABCC9/SUR2* and calcium channels *Stj/CACNA2D4* are involved in DM1-associated arrhythmia and conduction defects, respectively**

Finding that two main cardiac DM1 symptoms, arrhythmia and conduction defects, are observed in different genetic DM1 contexts (*Bru-3/DM1<sub>960</sub>* and *MblRNAi/Bru-3*, respectively) provided us with a mean to identify gene deregulations underlying these cardiac defects. We first ranked evolutionarily conserved candidate genes according to their deregulation (fold change) and then applied data mining to select candidates with potential cardiac functions. Among the functionally tested genes the attenuation of ATP binding cassette subfamily C member *l(2)03659/ABCC9/SUR2* encoding a key regulatory subunit of ATP-sensitive potassium (KATP) channel has led to highly arrhythmic heart phenotypes in 5 weeks old *Hand>l(2)03659RNAi* flies, thus mimicking cardiac defects observed in *Hand>Bru-3* and *Hand>DM1<sub>960</sub>* 5 weeks flies.

Canonical KATP channels are hetero-octameric complexes of pore-forming subunits encoded by *Kir-6.1/KCNJ8* and *Kir-6.2/KCNJ11* genes associated with regulatory SUR subunits, encoded by 2 *SUR* genes, *ABCC8/SUR1* and *ABCC9/SUR2*<sup>50</sup>. Kir6 subunits generate the channel pore and SUR subunits serve the regulatory role, with each channel being a functional octamer of 4 Kir6 subunits and 4 SUR subunits. The metabolically controlled gate of the channel is located at the cytoplasmic end of the inner cavity. ATP binds to Kir6 subunits, and this provides the energetic push to channel closure. Channel activation then arises from the activating effects of Mg nucleotides, particularly Mg associated to ADP, on the SUR subunit<sup>50</sup>. It has long been recognized that KATP channels provide a large potential ionic conductance in the surface membranes of cardiac myocytes. Under normal metabolic conditions, cardiac sarcolemmal KATP channels are predominantly closed, and they do not significantly contribute to cell excitability. However, these channels can open when exposed to a severe metabolic stress and SUR subunits are here of key importance to preserve cardiac function. Accordingly, *ABCC9* when mutated causes atrial fibrillation<sup>51</sup>, idiopathic dilated cardiomyopathy<sup>52</sup> but is also associated with cardiomegaly and concentric ventricles hypertrophy observed in Cantu syndrome<sup>53</sup>. It has also been found that *ABCC9/SUR2* is

alternatively spliced and gives rise to two protein variants (SUR2A and SUR2B) that confer distinct physiological and pharmacological properties on the channel complex<sup>54</sup>. However, whether DM1 associated splice factors MBNL1 and CELF1 could regulate *ABCC9/SUR2* alternative splicing remains to be analyzed. Interestingly, the *Drosophila ABCC9* counterpart *l(2)03659* encoding, according to Flybase (<http://flybase.org/reports/FBgn0010549.html>), two variants constituted of 11 or 10 exons potentially also undergoes differential splice. However, our RNA sequencing data show that both *l(2)03659* isoforms are down-regulated in *DM1<sub>960</sub>* and *Bru-3* contexts suggesting a splice-independent mechanism of its regulation in cardiac cells.

The second highly ranked gene *Straightjacket (Stj/CACNA2D4)* selected as a candidate causing conduction defects in *Hand>MblRNAi* and *Hand>Bru-3* contexts encodes a voltage gated calcium channel alpha-2/delta regulatory subunit known to alter the properties of pore-forming alpha-1 Cav1.2 subunits. Importantly, *CACNA2D4* deregulation has been already associated with cardiac conduction disturbance<sup>43</sup>. Moreover, unusual splice variants of *CACNA2D4* and second calcium channel subunit gene *CACNB2* have been identified in two different families displaying atrial fibrillation<sup>43</sup>. *CACNB2* functions as a partner of Cav1.2, is strongly expressed in the heart, and has been linked with Brugada syndrome, cardiac conduction disease, sudden death<sup>55</sup> and the Long QT syndrome<sup>56</sup>. Expression studies of *CACNA2D4* have identified high-mRNA levels in both heart and skeletal muscle whereas studies in transfected HEK293 cells have demonstrated that *CACNA2D4* mediates the influx of calcium into the cell via a formed protein complex with Cav1.2<sup>57</sup>. It is also well known that Cav1.2 gain-of-function mutations delay cardiomyocyte repolarization thereby increasing risk of arrhythmias<sup>58</sup>. In our *Drosophila* models, we found that *CACNA2D4* orthologue *Stj* is highly up-regulated and that its cardiac targeted overexpression leads to conduction defects mimicking *MblRNAi* and *Bru-3* induced cardiac phenotypes. Thus, like *Cav1.2* in mouse models, the gain of function of *Stj/CACNA2D4* affects heart beating. It remains to be determined whether *Stj* encoding 3 different variants is submitted to differential splice regulation in fly DM1 models, as it is the case of *CACNA2D4* in patients with atrial fibrillation. Reported here RNA sequencing data revealing similar up-regulation of all the *Stj* variants are rather in support of a possibility that *Stj* mRNA levels are regulated via 3'UTR dependent tuning of transcript stability.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by the French Association against Myopathies (AFM-Telethon), the Agence Nationale de la Recherche (ANR) and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). We are grateful to Caroline Girardin, the master student that helped for the cardiac analyses of candidate genes.

## **Conflict of Interest statement**

The authors declare no conflict of interest.

## **REFERENCES**

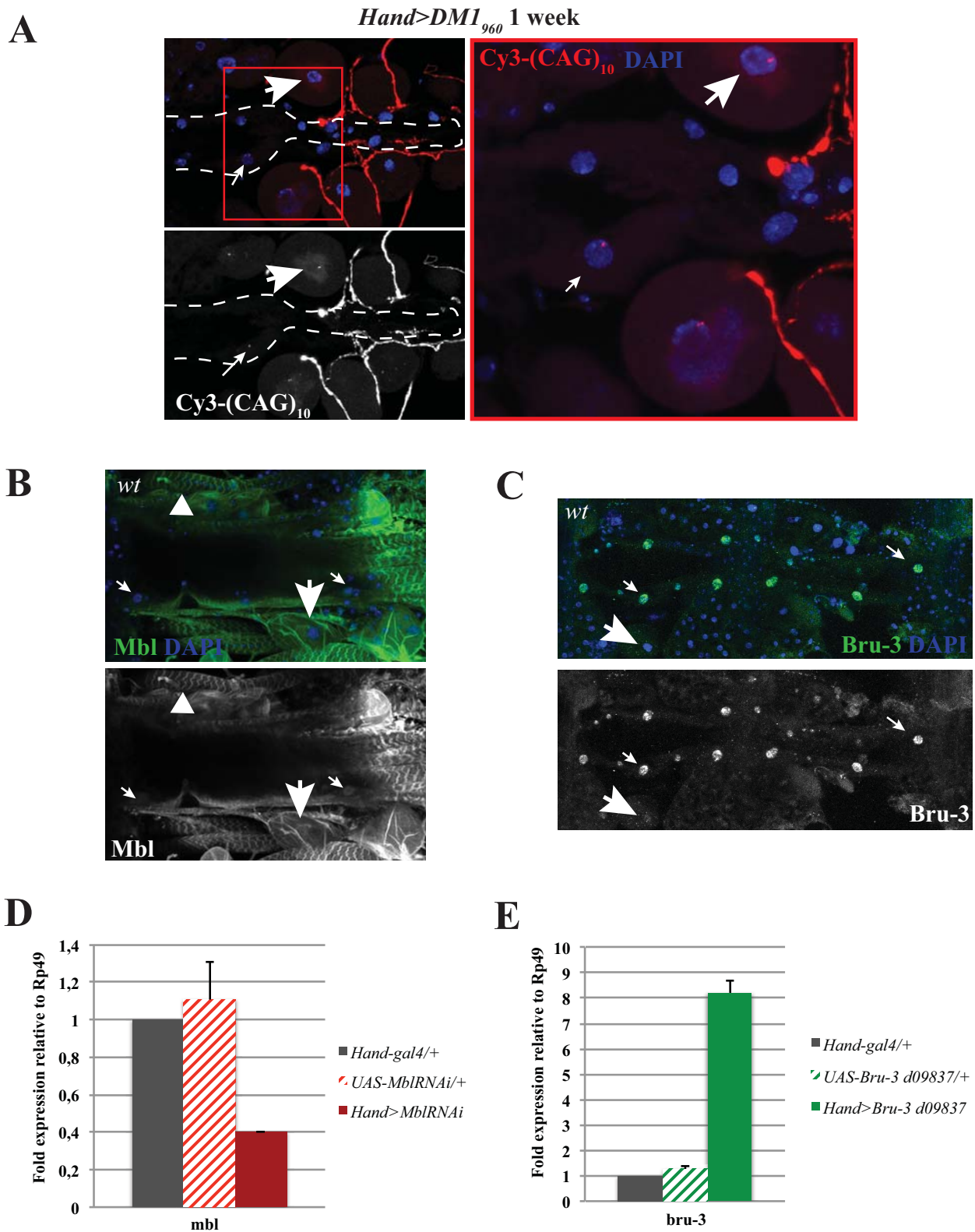
1. Theadom, A. *et al.* Prevalence of Muscular Dystrophies: A Systematic Literature Review. *Neuroepidemiology* 43, 259–268 (2014).
2. Taneja. Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues. *J. Cell Biol.* 128, 995–1002 (1995).
3. Davis, B. M., McCurrach, M. E., Taneja, K. L., Singer, R. H. & Housman, D. E. Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of myotonic



- dystrophy protein kinase transcripts results in nuclear retention of transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 7388–7393 (1997).
4. Kuyumcu-Martinez, N. M., Wang, G.-S. & Cooper, T. A. Increased steady-state levels of CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation. *Mol. Cell* 28, 68–78 (2007).
  5. Kino, Y. *et al.* MBNL and CELF proteins regulate alternative splicing of the skeletal muscle chloride channel CLCN1. *Nucleic Acids Res.* 37, 6477–6490 (2009).
  6. Savkur, R. S., Philips, A. V. & Cooper, T. A. Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat. Genet.* 29, 40–47 (2001).
  7. Freyermuth, F. *et al.* Splicing misregulation of SCN5A contributes to cardiac-conduction delay and heart arrhythmia in myotonic dystrophy. *Nat. Commun.* 7, 11067 (2016).
  8. Sicot, G., Gourdon, G. & Gomes-Pereira, M. Myotonic dystrophy, when simple repeats reveal complex pathogenic entities: new findings and future challenges. *Hum. Mol. Genet.* 20, R116–R123 (2011).
  9. de Die-Smulders, C. E. *et al.* Age and causes of death in adult-onset myotonic dystrophy. *Brain* 121, 1557–1563 (1998).
  10. Mathieu, J., Allard, P., Potvin, L., Prevost, C. & Begin, P. A 10-year study of mortality in a cohort of patients with myotonic dystrophy. *Neurology* 52, 1658–1658 (1999).
  11. Groh, W. J. *et al.* Electrocardiographic Abnormalities and Sudden Death in Myotonic Dystrophy Type 1. *N. Engl. J. Med.* 358, 2688–2697 (2008).
  12. Wang, G.-S., Kearney, D. L., De Biasi, M., Taffet, G. & Cooper, T. A. Elevation of RNA-binding protein CUGBP1 is an early event in an inducible heart-specific mouse model of myotonic dystrophy. *J. Clin. Invest.* 117, 2802–2811 (2007).
  13. Wang, G.-S. *et al.* PKC inhibition ameliorates the cardiac phenotype in a mouse model of myotonic dystrophy type 1. *J. Clin. Invest.* 119, 3797–3806 (2009).
  14. Algalarrondo, V. *et al.* Abnormal sodium current properties contribute to cardiac electrical and contractile dysfunction in a mouse model of myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul. Disord.* (2014). doi:10.1016/j.nmd.2014.11.018
  15. Chakraborty, M. *et al.* Pentamidine rescues contractility and rhythmicity in a Drosophila model of myotonic dystrophy heart dysfunction. *Dis. Model. Mech.* dmm.021428 (2015). doi:10.1242/dmm.021428
  16. Bodmer, R. The gene tinman is required for specification of the heart and visceral muscles in Drosophila. *Dev. Camb. Engl.* 118, 719–729 (1993).
  17. Taylor, M. V. Muscle development: molecules of myoblast fusion. *Curr. Biol.* 10, R646–R648 (2000).
  18. Olson, E. N. Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. *Science* 313, 1922–7 (2006).
  19. Dulcis, D., Levine, R. B. & Ewer, J. Role of the neuropeptide CCAP in Drosophila cardiac function. *J. Neurobiol.* 64, 259–274 (2005).
  20. Wasserthal, L. T. Drosophila flies combine periodic heartbeat reversal with a circulation in the anterior body mediated by a newly discovered anterior pair of ostial valves and venous channels. *J. Exp. Biol.* 210, 3707–3719 (2007).
  21. Ocorr, K. *et al.* KCNQ potassium channel mutations cause cardiac arrhythmias in Drosophila that mimic the effects of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 3943–3948 (2007).

22. Taghli-Lamallem, O., Plantié, E. & Jagla, K. *Drosophila* in the Heart of Understanding Cardiac Diseases: Modeling Channelopathies and Cardiomyopathies in the Fruitfly. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* 3, 7 (2016).
23. Picchio, L., Plantie, E., Renaud, Y., Poovthumkadavil, P. & Jagla, K. Novel *Drosophila* model of myotonic dystrophy type 1: phenotypic characterization and genome-wide view of altered gene expression. *Hum. Mol. Genet.* 22, 2795–2810 (2013).
24. Miller, M. R., Robinson, K. J., Cleary, M. D. & Doe, C. Q. TU-tagging: cell type-specific RNA isolation from intact complex tissues. *Nat. Methods* 6, 439–441 (2009).
25. Picchio, L., Plantie, E., Renaud, Y., Poovthumkadavil, P. & Jagla, K. Novel *Drosophila* model of myotonic dystrophy type 1: phenotypic characterization and genome-wide view of altered gene expression. *Hum. Mol. Genet.* 22, 2795–2810 (2013).
26. Ocorr, K. *et al.* KCNQ potassium channel mutations cause cardiac arrhythmias in *Drosophila* that mimic the effects of aging. *Proc Natl Acad Sci U A* 104, 3943–8 (2007).
27. Fink, M. *et al.* A new method for detection and quantification of heartbeat parameters in *Drosophila*, zebrafish, and embryonic mouse hearts. *BioTechniques* 46, 101–113 (2009).
28. Houseley, J. M. *et al.* Myotonic dystrophy associated expanded CUG repeat muscleblind positive ribonuclear foci are not toxic to *Drosophila*. *Hum. Mol. Genet.* 14, 873–883 (2005).
29. Gay, L., Karfilis, K. V., Miller, M. R., Doe, C. Q. & Stankunas, K. Applying thiouracil tagging to mouse transcriptome analysis. *Nat. Protoc.* 9, 410–420 (2014).
30. Langmead, B. & Salzberg, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* 9, 357–359 (2012).
31. Li, H. *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 25, 2078–2079 (2009).
32. Han, Z. & Olson, E. N. Hand is a direct target of Tinman and GATA factors during *Drosophila* cardiogenesis and hematopoiesis. *Development* 132, 3525–3536 (2005).
33. Llamusi, B. *et al.* Muscleblind, BSF and TBPH are mislocalized in the muscle sarcomere of a *Drosophila* myotonic dystrophy model. *Dis. Model. Mech.* 6, 184–196 (2013).
34. Stojanovic, V. R. *et al.* Cardiologic predictors of sudden death in patients with myotonic dystrophy type 1. *J. Clin. Neurosci.* 20, 1002–1006 (2013).
35. Yang, J. *et al.* Decreased SLIM1 expression and increased gelsolin expression in failing human hearts measured by high-density oligonucleotide arrays. *Circulation* 102, 3046–3052 (2000).
36. Monnier, V. *et al.* dJun and Vri/dNFIL3 are major regulators of cardiac aging in *Drosophila*. *PLoS Genet.* 8, e1003081 (2012).
37. Peng, X. *et al.* Celf1 regulates cell cycle and is partially responsible for defective myoblast differentiation in myotonic dystrophy RNA toxicity. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* (2015). doi:10.1016/j.bbadis.2015.04.010
38. Katanosaka, Y. *et al.* TRPV2 is critical for the maintenance of cardiac structure and function in mice. *Nat. Commun.* 5, 3932 (2014).
39. Zhang, H. Z., Kim, M. H., Lim, J. H. & Bae, H.-R. Time-Dependent Expression Patterns of Cardiac Aquaporins Following Myocardial Infarction. *J. Korean Med. Sci.* 28, 402–408 (2013).
40. Peña-Rangel, M. T., Rodriguez, I. & Riesgo-Escovar, J. R. A misexpression study examining dorsal thorax formation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 160, 1035–1050 (2002).

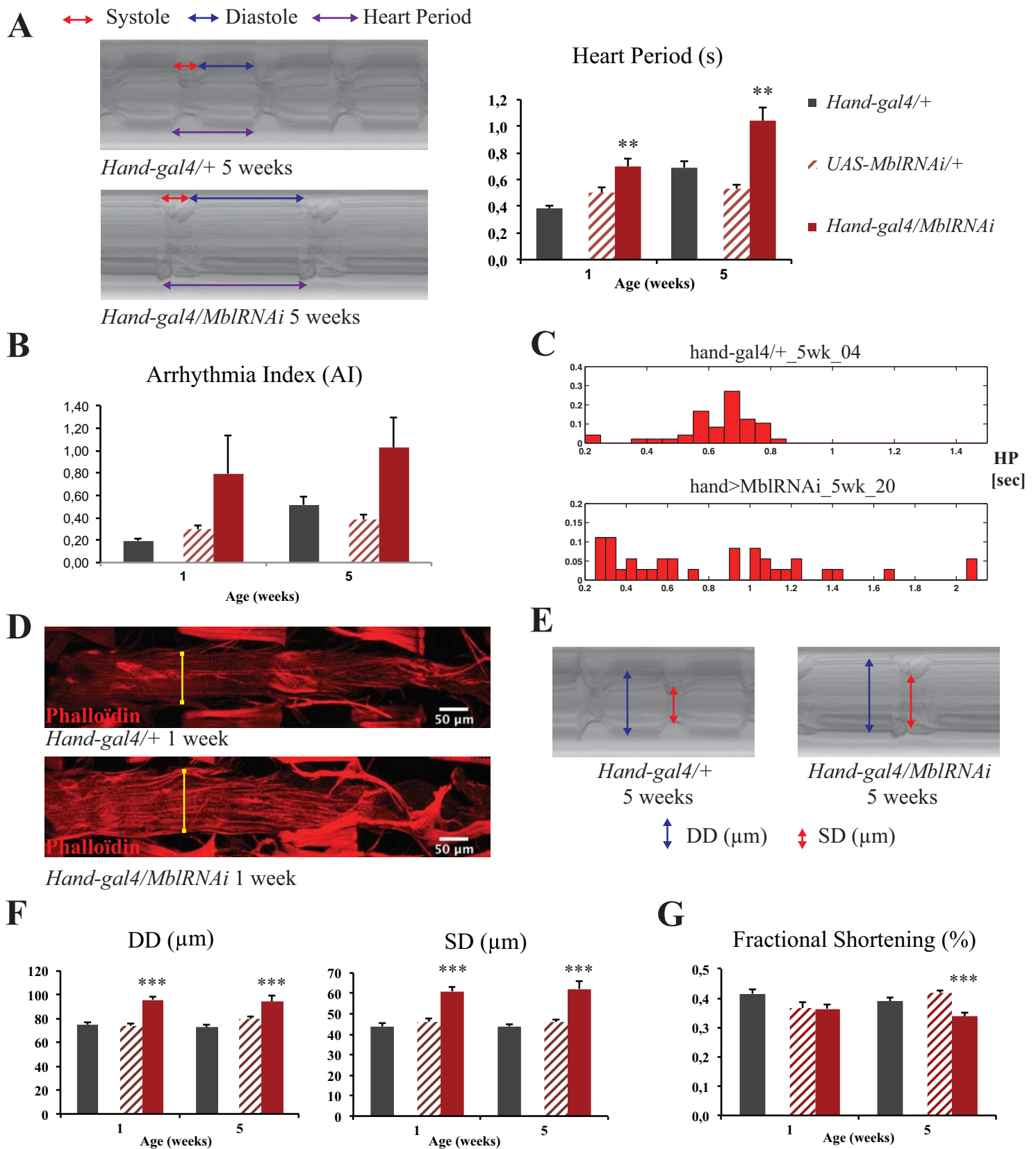
41. Kim, H. J., Myers, R., Sihn, C.-R., Rafizadeh, S. & Zhang, X.-D. Slc26a6 functions as an electrogenic Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger in cardiac myocytes. *Cardiovasc. Res.* 100, 383–391 (2013).
42. Ly, C. V., Yao, C.-K., Verstreken, P., Ohyama, T. & Bellen, H. J. straightjacket is required for the synaptic stabilization of cacophony, a voltage-gated calcium channel alpha1 subunit. *J. Cell Biol.* 181, 157–170 (2008).
43. Weeke, P. *et al.* Whole-exome sequencing in familial atrial fibrillation. *Eur. Heart J.* 35, 2477–2483 (2014).
44. Ueda, K. *et al.* Syntrophin mutation associated with long QT syndrome through activation of the nNOS-SCN5A macromolecular complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 9355–9360 (2008).
45. Shieh, B.-H. & Zhu, M.-Y. Regulation of the TRP Ca<sup>2+</sup> Channel by INAD in Drosophila Photoreceptors. *Neuron* 16, 991–998 (1996).
46. Wang, E. T. *et al.* Antagonistic regulation of mRNA expression and splicing by CELF and MBNL proteins. *Genome Res.* 25, 858–871 (2015).
47. Neely, G. G. *et al.* A global in vivo Drosophila RNAi screen identifies NOT3 as a conserved regulator of heart function. *Cell* 141, 142–53 (2010).
48. Mateos-Aierdi, A. J. *et al.* Muscle wasting in myotonic dystrophies: a model of premature aging. *Front. Aging Neurosci.* 7, (2015).
49. Guertl, B., Noehammer, C. & Hoefler, G. Metabolic cardiomyopathies. *Int. J. Exp. Pathol.* 81, 349–372 (2000).
50. Nichols, C. G., Makhina, E. N., Pearson, W. L., Sha, Q. & Lopatin, A. N. Inward rectification and implications for cardiac excitability. *Circ. Res.* 78, 1–7 (1996).
51. Bienengraeber, M. *et al.* ABCC9 mutations identified in human dilated cardiomyopathy disrupt catalytic KATP channel gating. *Nat. Genet.* 36, 382–387 (2004).
52. Olson, T. M. *et al.* KATP channel mutation confers risk for vein of Marshall adrenergic atrial fibrillation. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 4, 110–116 (2007).
53. Grange, D. K., Lorch, S. M., Cole, P. L. & Singh, G. K. Cantu syndrome in a woman and her two daughters: Further confirmation of autosomal dominant inheritance and review of the cardiac manifestations. *Am. J. Med. Genet. A.* 140, 1673–1680 (2006).
54. Chutkow, W. A., Makielski, J. C., Nelson, D. J., Burant, C. F. & Fan, Z. Alternative Splicing of sur2 Exon 17 Regulates Nucleotide Sensitivity of the ATP-sensitive Potassium Channel. *J. Biol. Chem.* 274, 13656–13665 (1999).
55. Antzelevitch, C. *et al.* Loss-of-function mutations in the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST-segment elevation, short QT intervals, and sudden cardiac death. *Circulation* 115, 442–449 (2007).
56. Boczek, N. J. *et al.* Exome sequencing and systems biology converge to identify novel mutations in the L-type calcium channel, CACNA1C, linked to autosomal dominant long QT syndrome. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 6, 279–289 (2013).
57. Qin, N., Yagel, S., Momplaisir, M.-L., Codd, E. E. & D’Andrea, M. R. Molecular cloning and characterization of the human voltage-gated calcium channel alpha(2)delta-4 subunit. *Mol. Pharmacol.* 62, 485–496 (2002).
58. Splawski, I. *et al.* Severe arrhythmia disorder caused by cardiac L-type calcium channel mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 8089–8096–8088 (2005).



**Figure 1. Validation of the new DM1 *Drosophila* models: *DM1<sub>960</sub>*, *Hand>MblRNAi* and *Hand>Bru3* adult flies.**

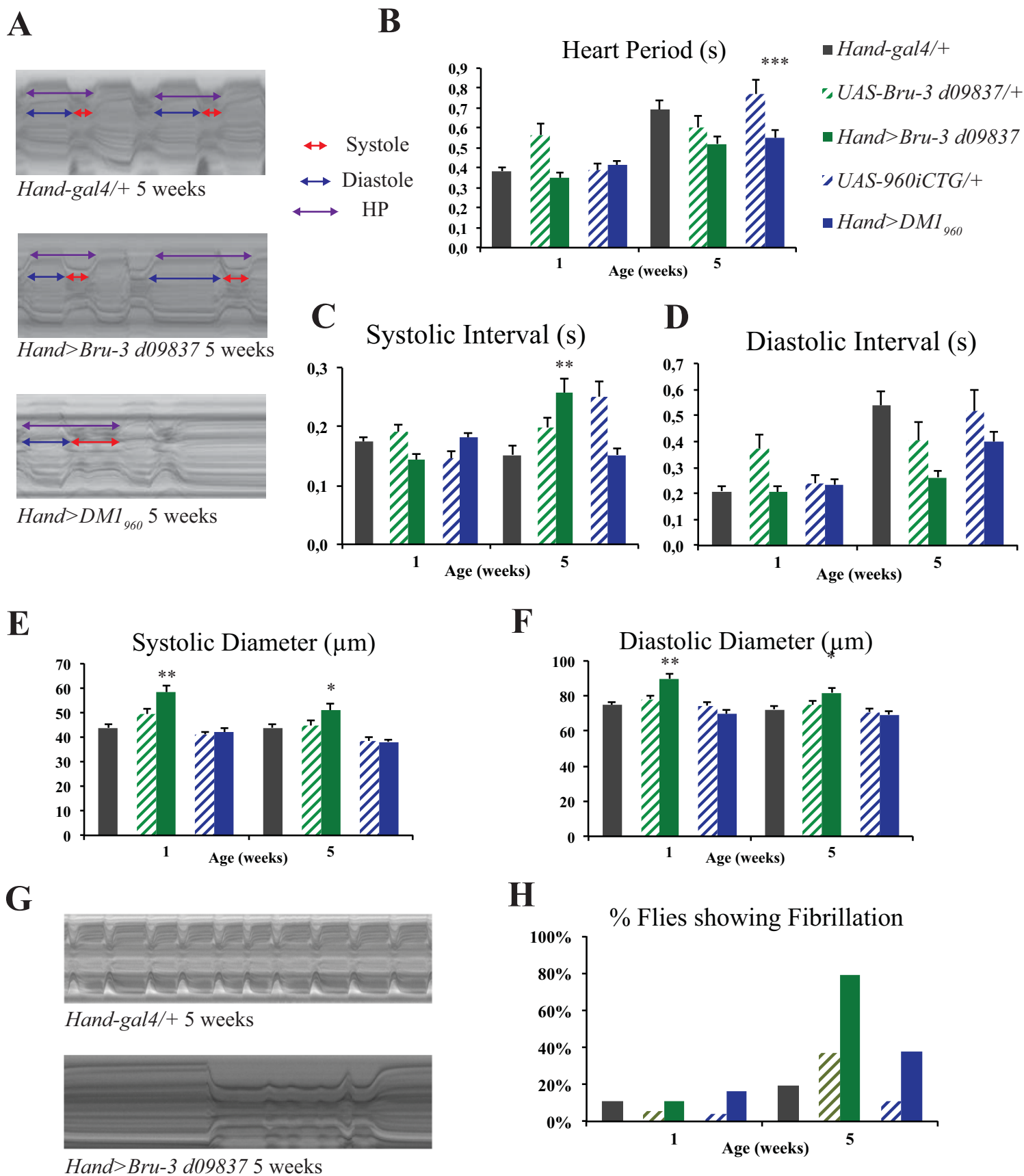
A. Fluorescent confocal images of a 1-week old adult heart expressing 960 CTG in cardiac cells (*DM1<sub>960</sub>*), after FISH with *Cy3-CAG<sub>10</sub>* probe (red), showing nuclear foci formation (DAPI, blue) in cardiomyocytes (CM) (arrow) and pericardial cells (PC) (large arrows). See higher magnification (right panel). B. Immunostaining in *wild-type* (*wt*) context showing Mbl expression in the longitudinal myofibers surrounding the cardiac tube, in CM nuclei (arrows) and in the cytoplasm of PC (large arrows). C. Expression pattern of the Bru-3 protein in *wt* context, showing a strong localization in CM nuclei (arrows) and in PC (large arrows). D. Strong *Mbl* decreased transcript level (60% reduction of *Mbl* transcripts compared to control *Hand-Gal4/+* and *UAS-MblRNAi/+* contexts) in the heart of *Hand>MblRNAi* 1-week old flies, observed by RT-qPCR. E. *Bru-3* transcript overexpression (8 times overexpression compared to control conditions) in the adult heart of *Hand>Bru-3* 1-week old flies, showed by RT-qPCR.





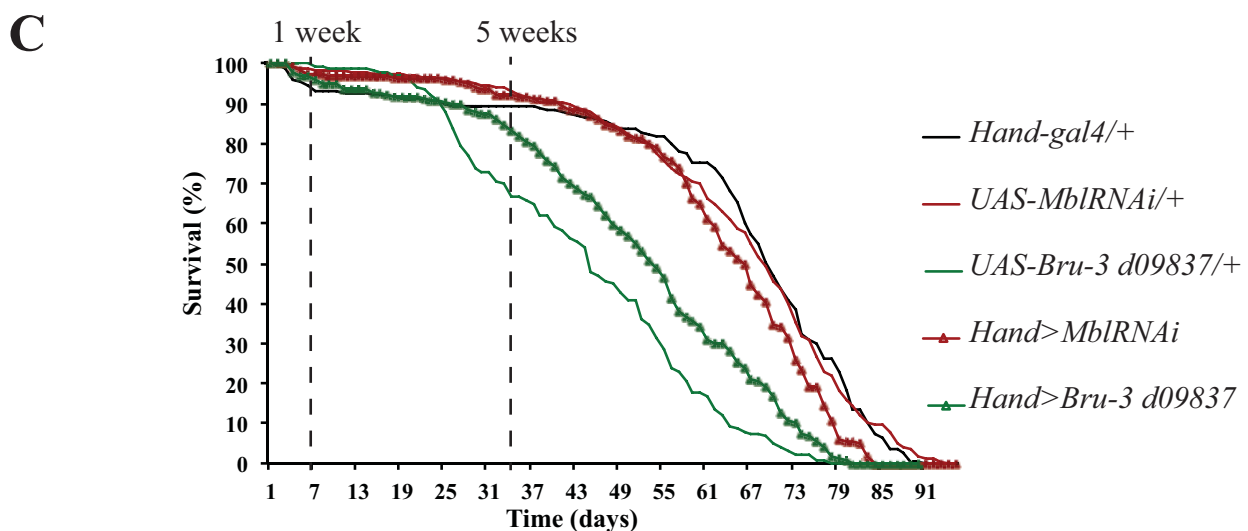
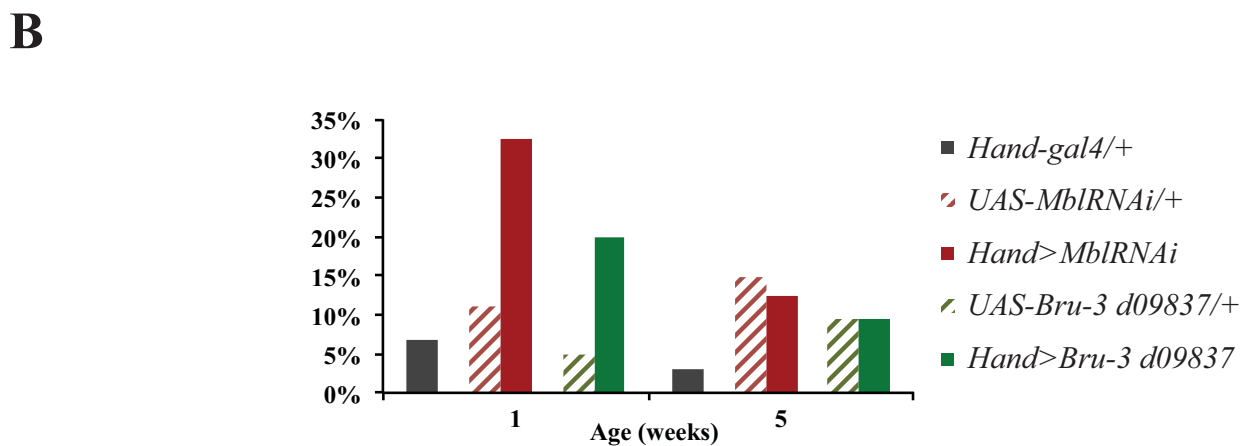
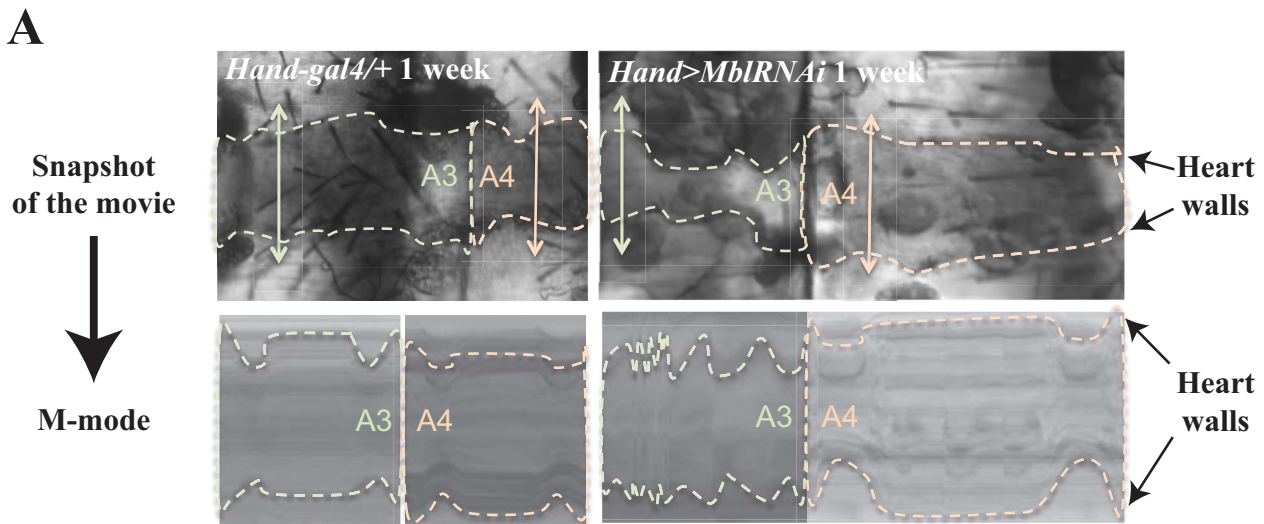
**Figure 2. *Hand>MbIRNAi* adult flies exhibit rhythmic and contractile cardiac phenotypes such as dilated cardiomyopathy and arrhythmia.**

A. *Hand>MbIRNAi* flies exhibit an increased heart period (HP, purple) which corresponds to systolic interval (contraction, red) + diastolic interval (relaxation, blue) at 1-week and 5-weeks of age, as seen on the M-modes and quantified in the histograms. B. *Hand>MbIRNAi* flies are more arrhythmic since the Arrhythmicity Index (AI) is increased in 1-week and 5-weeks old flies. C. Arrhythmicity observed in *Hand>MbIRNAi* adults is also represented by the increased variation for one fly of the HP calculated over a 30-seconds period, compared to control flies (*Hand-Gal4/+*). D. Confocal images of F-Actin (Phalloïdin) stained 1-week adult hearts of control and *Hand>MbIRNAi* flies, showing increased heart diameter. E. M-modes of 1-week old control and *Hand>MbIRNAi* flies showing contractile phenotypes with increased diastolic and systolic diameters (DD and SD). F. Quantification of contractility parameters in control and *Hand>MbIRNAi* adult flies at 1-week and 5-weeks timepoints. G. The increased diameters are correlated with decreased fractional shortening (FS =  $(DD-SD)/DD \times 100$ ), representing reduced heart function in *Hand>MbIRNAi* flies at 5-weeks.



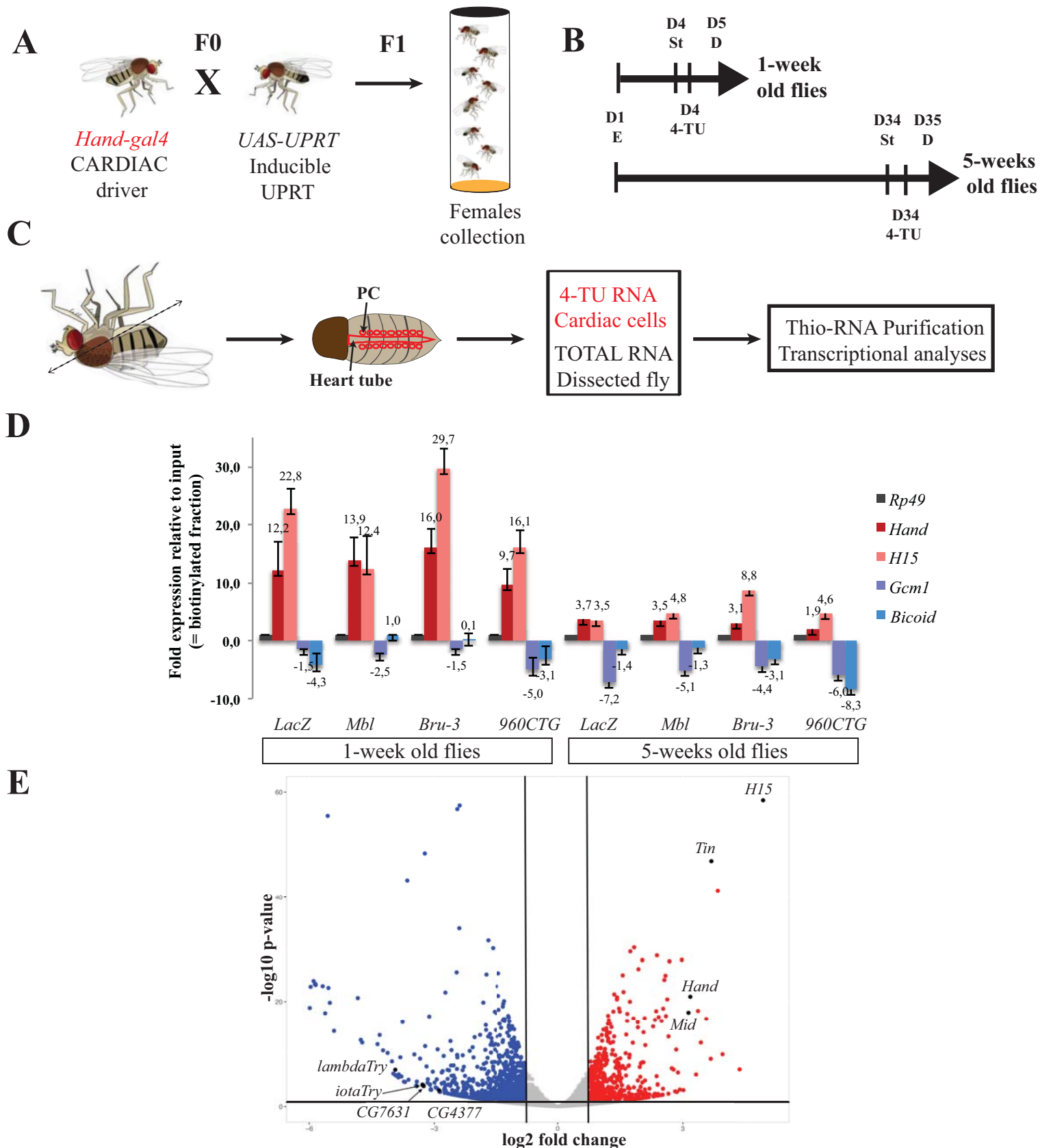
**Figure 3. *Hand>Bru-3* and *Hand>DMI<sub>960</sub>* adult flies are more arrhythmic and display fibrillation phenotypes at 5-weeks.**

A. M-modes of *Hand>Bru-3* and *Hand>DMI<sub>960</sub>* 5-weeks old flies showing variability of the heart period (HP, purple) (= systolic interval (contraction, red) + diastolic interval (relaxation, blue)) compared to controls. HP is slightly decreased at 5-weeks in *Hand>DMI<sub>960</sub>* flies, due to decreased diastolic interval (DI). See quantification in B. C. *Hand>Bru-3* 5-weeks old flies display an increased systolic interval (SI) whereas *Hand>DMI<sub>960</sub>* flies have normal SI. D. Both *Hand>Bru-3* and *Hand>DMI<sub>960</sub>* flies have a decreased DI at 5-weeks. E, F. *Hand>Bru-3* flies exhibit increased diastolic and systolic diameters (DD and SD) at 1-week and 5-weeks. G. Fibrillation (sustained systolic intervals), observed on the M-mode of *Hand>Bru-3* adult flies is occurring more frequently in 5-weeks old *Hand>Bru-3* (80%) and *Hand>DMI<sub>960</sub>* (40%) flies.



**Figure 4. *Hand>MblRNAi* and *Hand>Bru-3* adult flies exhibit conduction disturbance at 1-week but that is no longer present in older flies.**

A. The dissected M-modes, from two different segments of the heart of *Hand>MblRNAi* and control 1-week old flies allow showing conduction defects in *Hand>MblRNAi* flies. In control flies, the heartbeat from A3 and A4 segments is regular whereas in attenuated line for *Mbl*, we observe a complete loss of synchronicity between the two segments. B. Quantification of the conduction defects in 1-week *Hand>MblRNAi* adults (32% of the flies) and *Hand>Bru-3* (20% of the flies) compared to 5% conduction deficiency observed in control flies. The flies no longer show conduction disturbance at 5-weeks C. Survival analyses in control, *Hand>MblRNAi* and *Hand>Bru-3* flies showing a slight decrease of survival rate in *Hand>Bru3* flies but that cannot explain the loss of conduction defects at 5-weeks.



**Figure 5. The TU-Tagging approach allows collecting cardiac-specific RNAs from adult flies.**

A. The cell-specific TU-tagging approach takes advantage of the *Gal4/UAS* system. First, we crossed (F0) *Hand-gal4* flies (for cardiac expression) with *UAS-UPRT* lines (inducible expression of Uracile PhosphoRibozyyl Transferase (UPRT) enzyme). F1 female flies from the F0 cross are fed with modified Uracile (4-TU) to allow 4-TU incorporation in the cardiac neosynthetized RNA. B. On day 1 (D1), F1 female flies emerge (E) and are aged until D4 (1-week) or D34 (5-weeks) and then starved (St) for 6 hours, fed with 4-TU for 12 hours (4-TU) and dissected (D) on D5 (1-week) or D35 (5-weeks). C. The dissection consists in removing the head, legs, wings and the abdomen content with ovaries and gut. Then, thio-RNA, specific from PC and from the cardiac tube (*Hand-gal4*), is purified from total RNA with Biotin/Streptavidin purification steps and can be used for further transcriptional analyses. D. qRT-PCR analyses after TU-tagging approach on 1 and 5-weeks old flies show enrichment of cardiac genes (*Hand* and *H15*) with decreased expression of non-cardiac genes (*Gcm1* and *Bicoid*) in 4-TU RNA fraction compared to the input fraction (consisting of the biotinylated fraction). E. RNA-sequencing data from the 4-TU fraction of *Hand>LacZ*, *HA-UPRT* flies show enrichment of cardiac-specific genes.

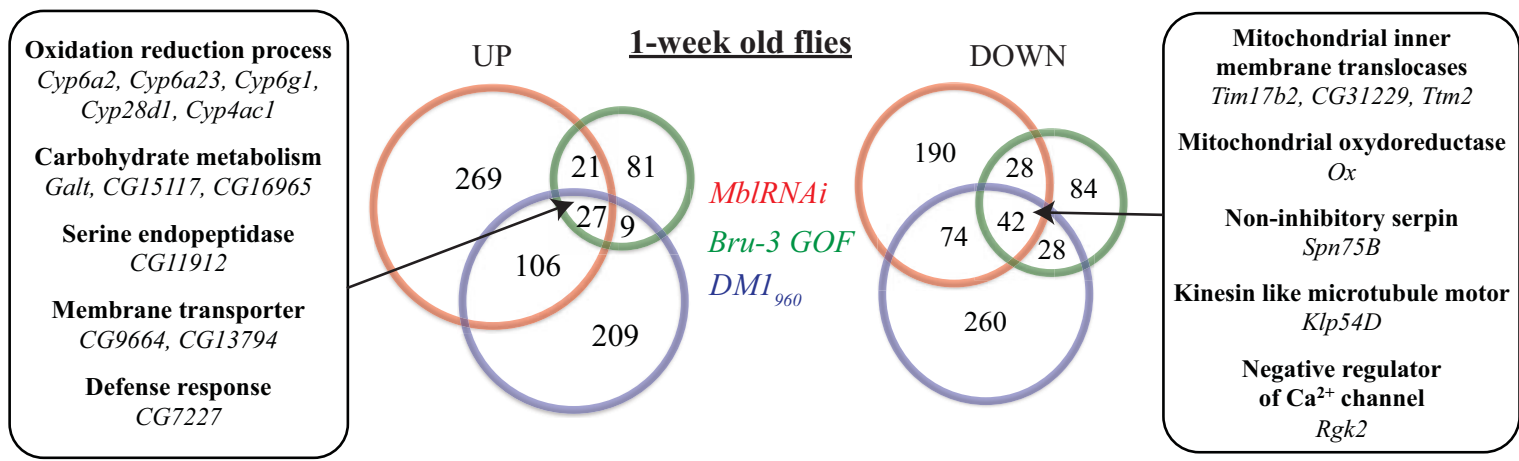


Gene	FC
<i>H15</i>	30,6
<i>tin</i>	12,7
<i>bap</i>	11,8
<i>Hand</i>	9,1
<i>mid</i>	8,8
<i>shakB</i>	5,2
<i>Shaw</i>	4,88
<i>NaPi-III</i>	4,15
<i>nrm</i>	3,17
<i>TpnC73F</i>	3,12
<i>tup</i>	2,87
<i>Tsp42En</i>	2,86
<i>pyr</i>	2,54
<i>htl</i>	2,34
<i>Act57B</i>	2,24

**Table 1. Up-regulated genes found in the cardiac specific fraction from *Hand>LacZ;HA-UPRT* 1-week old flies, in comparison to the Input (biotinylated) fraction.**

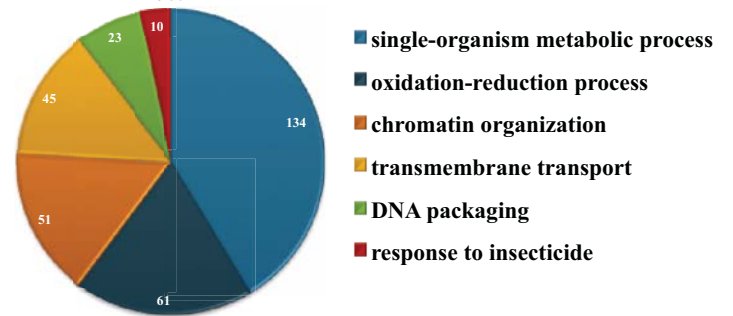
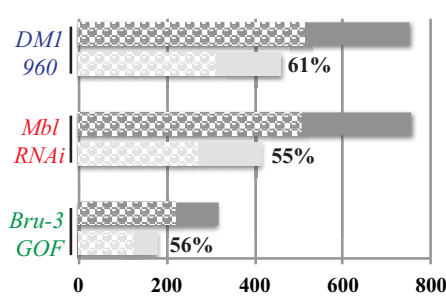
Genes from this table are known to be involved in cardiac development and function and/or expressed in the heart.

**A**

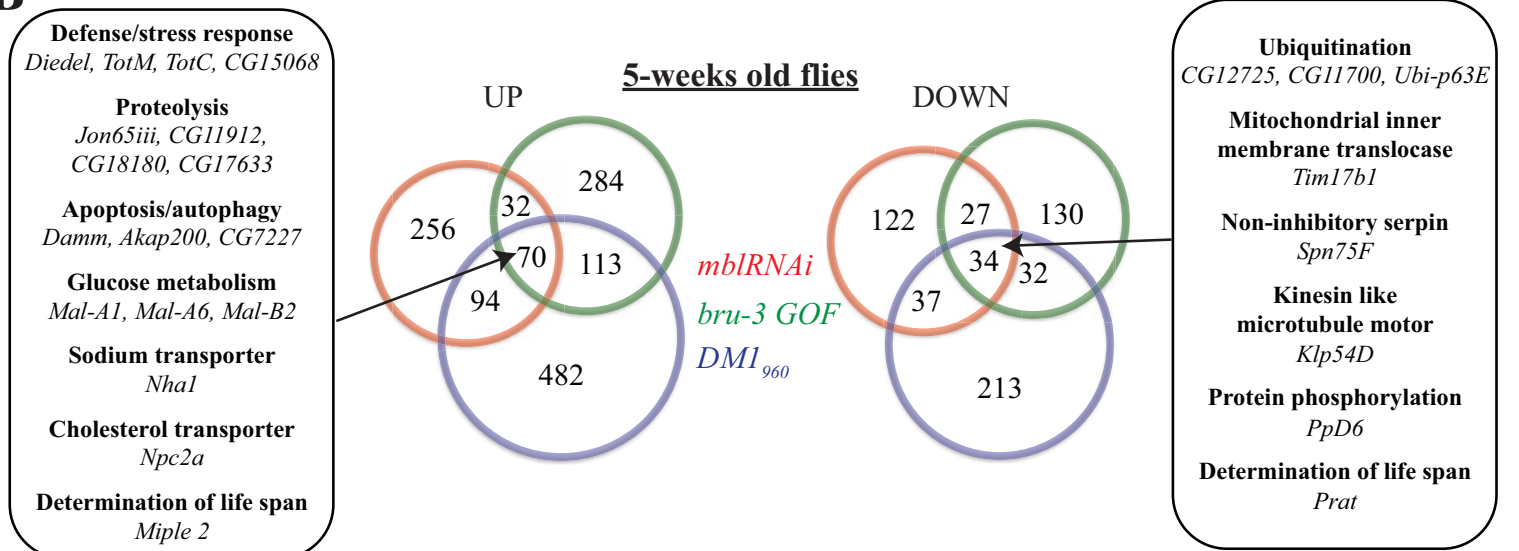


Global gene deregulations in 1-week old flies

Gene Ontology of deregulated genes in *DM1<sub>960</sub>* 1-week old flies

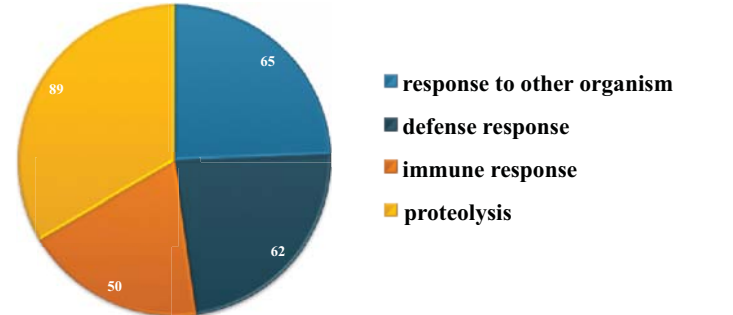
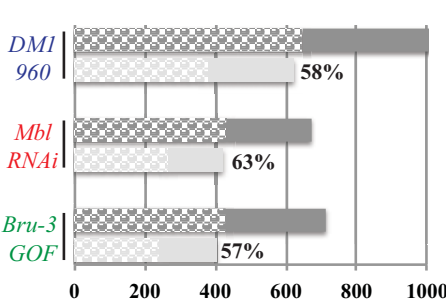


**B**



Global gene deregulations in 5-weeks old flies

Gene Ontology of deregulated genes in *DM1<sub>960</sub>* 5-weeks old flies

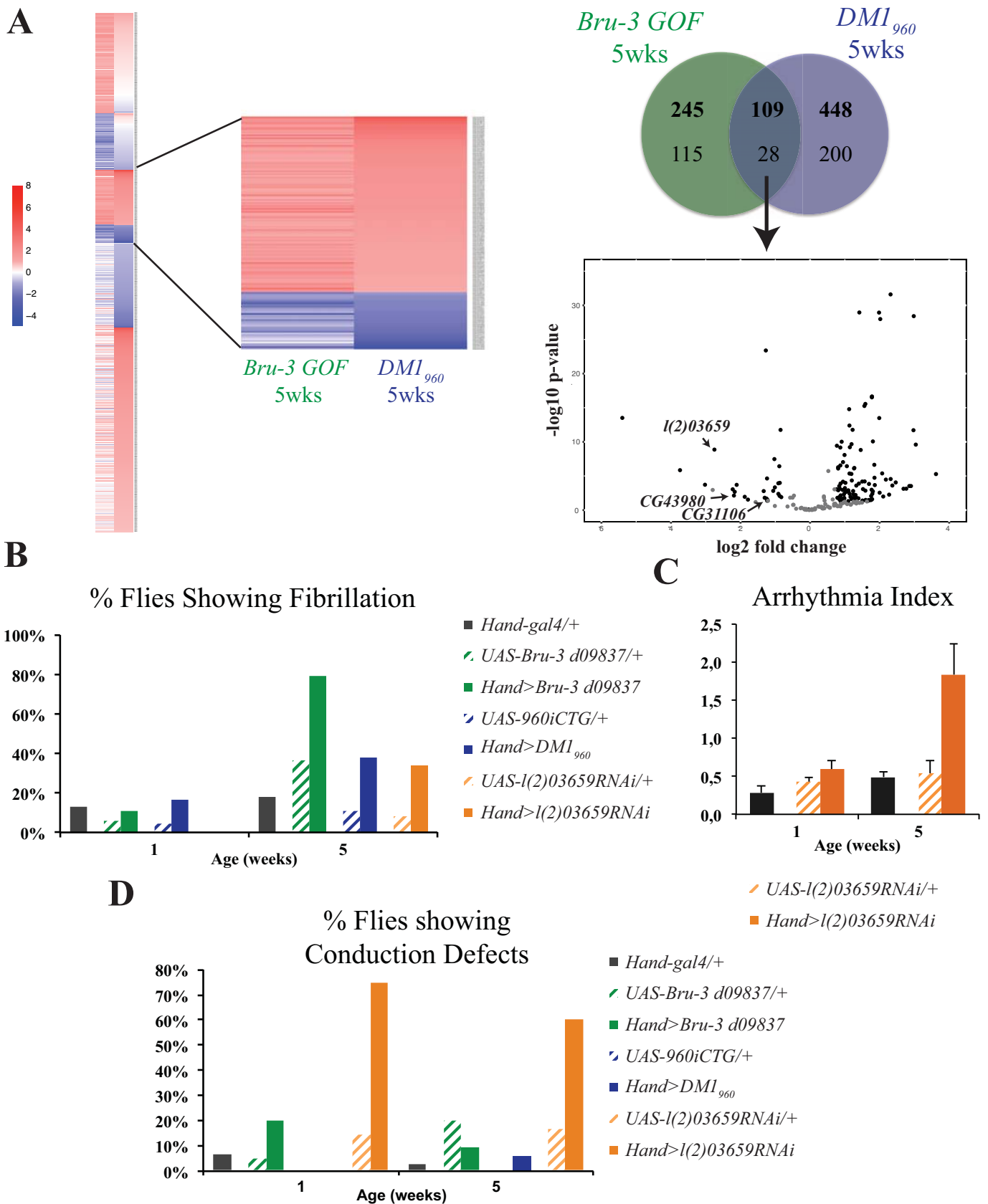


**Figure 6. Gene deregulations underlying cardiac defects observed in *Drosophila* *DM1* models.**  
 A, B. Upper panels : Venn diagrams representing the number of up and down-regulated genes in 1-week (A) and 5-weeks (B) flies from the different contexts analyzed: *Hand>MblRNAi;HA-UPRT*, *Hand>bru3;HA-UPRT* and *Hand>960CTG;HA-UPRT* relative to the control condition (*Hand>LacZ;HA-UPRT*). Represented genes must be deregulated with a threshold of  $FC > 1,7$  for up-regulated genes or  $FC < 0,58$  for down-regulated genes with an adjusted  $p\text{-value} < 0,05$ . Lower panels : percentage of deregulated genes conserved in Human and proportion of single-transcript genes (left part) and Gene Ontology classification of deregulated genes in *DM1<sub>960</sub>* context.

DM1 model condition and associated phenotype	<i>Drosophila</i> gene	Number of isoforms	Fold change		Human Orthologue
			Condition 1	Condition 2	
Common deregulated genes in <i>MblRNAi</i> 1-week and 5-weeks old flies  <b>DILATED CARDIOMYOPATHY</b>	<i>iav</i>	single transcript	Mbl 1w 0,39	Mbl 5w 0,46	<i>TRPV5/6</i>
	<i>bib</i>	2	Mbl 1w 0,26	Mbl 5w 0,49	<i>AQP/MIP</i>
Common deregulated genes in <i>Bru3</i> and <i>DM1<sub>960</sub></i> 5-weeks old flies  <b>FIBRILLATION</b>	<i>l(2)03659</i>	2	Bru3 5w 0,14	960ctg 5w 0,07	<i>ABCC9</i>
	<i>CG31106</i>	single transcript	Bru3 5w 0,41	960ctg 5w 0,54	<i>SLC22A4/5/7/17/23/31</i>
	<i>CG43980</i>	2	Bru3 5w 0,21	960ctg 5w 0,29	<i>ABTB2</i>
Common deregulated genes in <i>MblRNAi</i> and <i>Bru-3</i> 1-week old flies  <b>CONDUCTION DEFECTS</b>	<i>inaD</i>	2	Mbl 1w 0,39	Bru3 1w 0,44	<i>LNX1/2-FRMPD2</i>
	<i>Syn1</i>	4	Mbl 1w 0,53	Bru3 1w 0,57	<i>SNTA1/B1</i>
	<i>Stj</i>	3	Mbl 1w 2,34	Bru3 1w 3,54	<i>CACNA2D4</i>
Commonly deregulated in the 3 conditions	<i>Tim17b1</i>	single transcript	Mbl/Bru3/960 1w 0,16/0,28/0,19	Mbl/Bru3/960 5w 0,28/0,20/0,18	<i>TIMM17A/B</i>

**Table 2. Candidates genes selected from the RNA-sequencing analysis on DM1 heart models for their potential involvement in dilated cardiomyopathy, fibrillation and conduction defects.**

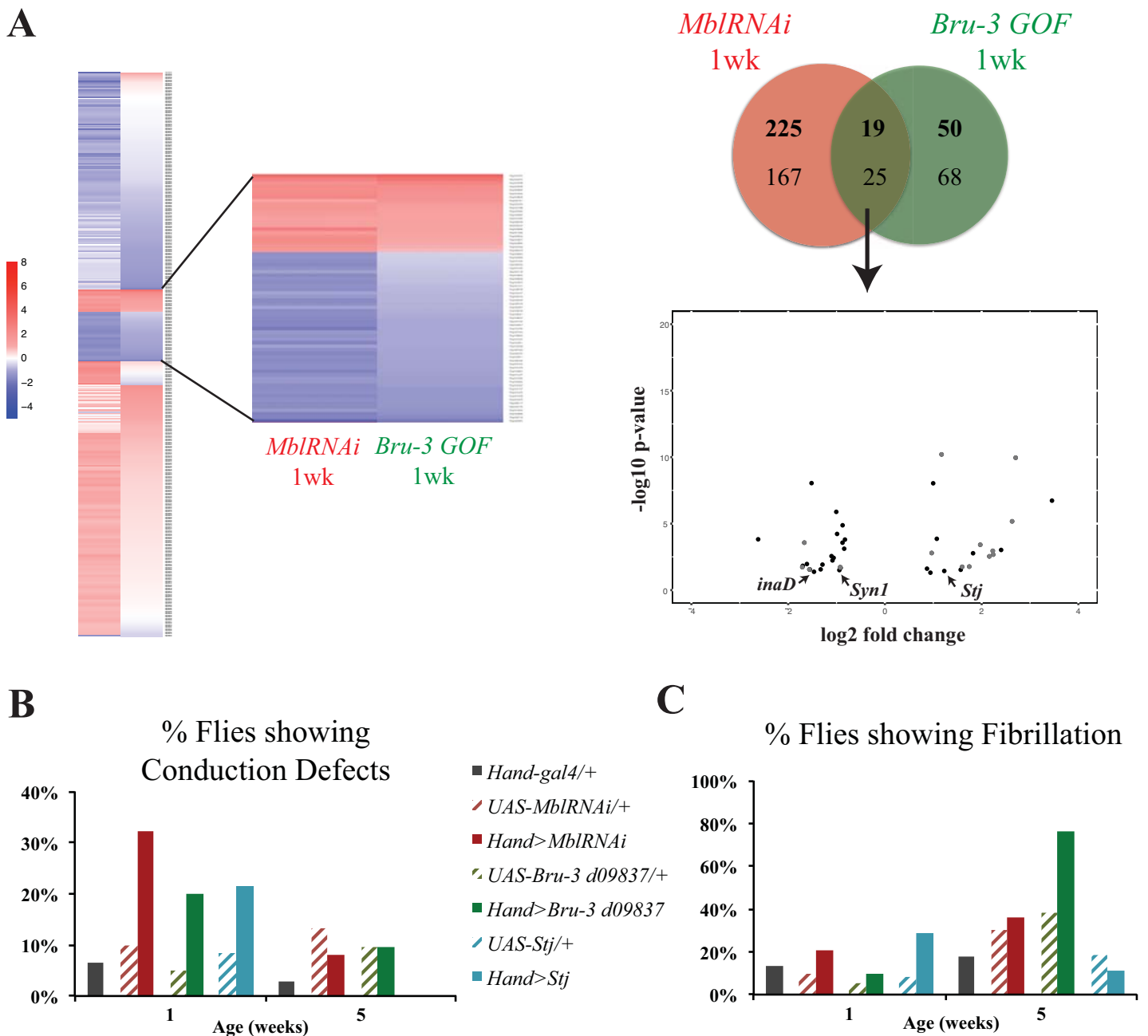
The selected genes are listed with their deregulation levels in the two or three conditions (condition 1 and condition 2 or common) they were found deregulated and associated to the phenotype observed.



**Figure 7. The attenuation of *ABCC9* *Drosophila* orthologue *l(2)03659* leads to cardiac conduction and arrhythmicity defects similar to the ones observed in DM1 fly models.**

A. Selection strategy for candidate genes involved in fibrillation. Left panel: heatmaps showing the distribution of deregulated genes in *Hand>Bru3* and *Hand>DMI*<sub>960</sub> 5-weeks old flies with the same pattern (red, up and blue, down-regulated). Right panel: Venn diagrams representing the number of common deregulated genes in both conditions and Volcano plot depicting their deregulation level (in black, genes with Human orthologues). Note that *l(2)03659* gene, analyzed in this study is highlighted.

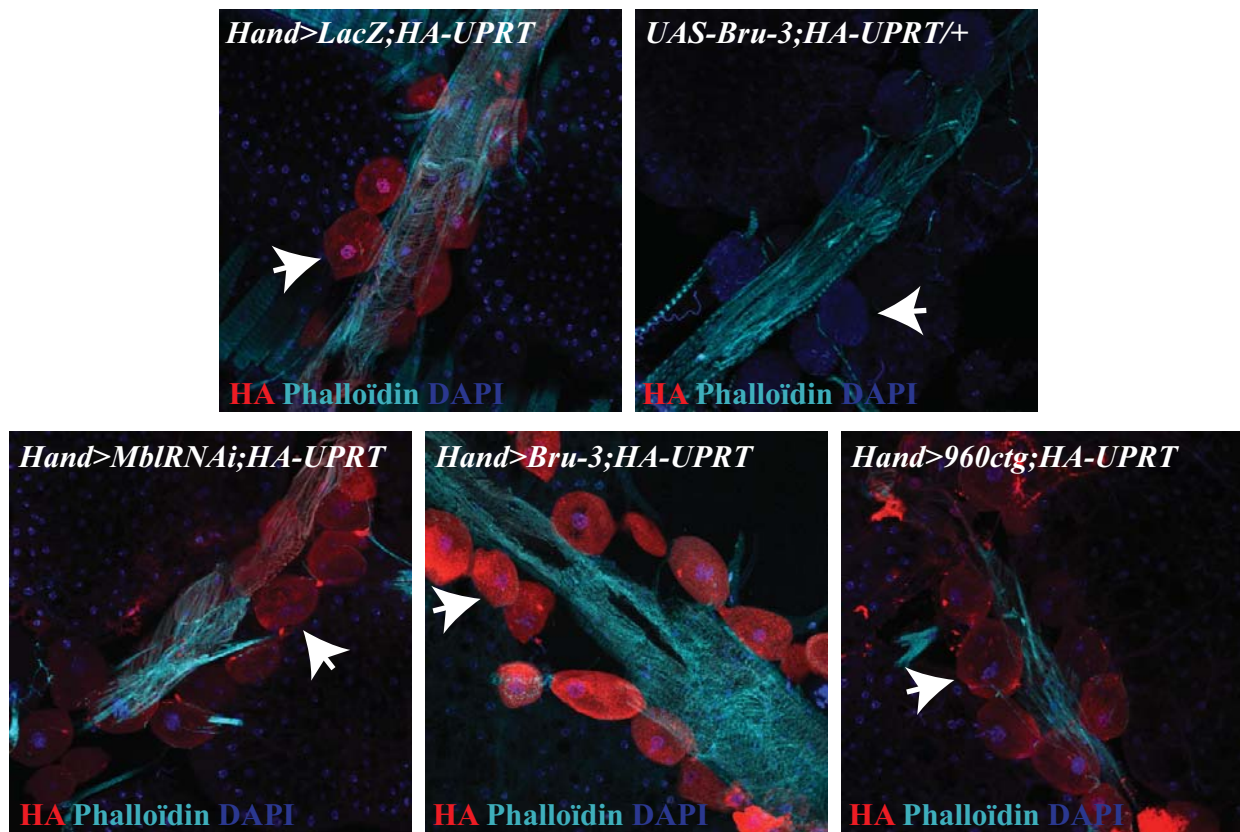
B, C, D. Functional analyses of *ABCC9* *Drosophila* orthologue *l(2)03659* show increased fibrillation in *Hand>l(2)03659RNAi* 5-weeks old flies as observed in *Hand>Bru3* and *Hand>DMI*<sub>960</sub> flies (B). C, D. Overexpression of *Stj* in adult flies leads to arrhythmia at 5-weeks (C) and conduction defects at 1-week



**Figure 8. Overexpressing the Calcium voltage-gated channel auxiliary subunit *alpha2delta* (*CACNA2D4*) *Drosophila* orthologue *Straightjacket* (*Stj*) mimics the conduction defects observed in DM1 models.**

A. Selection strategy for candidates genes involved in conduction defects. Left panel : heatmaps showing the distribution of deregulated genes in *Hand>MblRNAi* and *Hand>Bru3* 1-week old flies with the same pattern (red, up and blue, down-regulated). Right panel : Venn diagrams representing the number of common deregulated genes in both conditions and Volcano plot depicting their deregulation level (in black, genes with Human orthologues). Note that *Stj* gene, analyzed in this study is highlighted. B, C. Functional analyses of *CACNA2D4* *Drosophila* orthologue *Stj* show increased conduction defects in *Hand>Stj* 1-week old flies as observed in *Hand>MblRNAi* and *Hand>Bru3* 1-week old flies (B). C. *Hand>Stj* flies exhibit fibrillation at 1-week but no longer at 5-weeks.



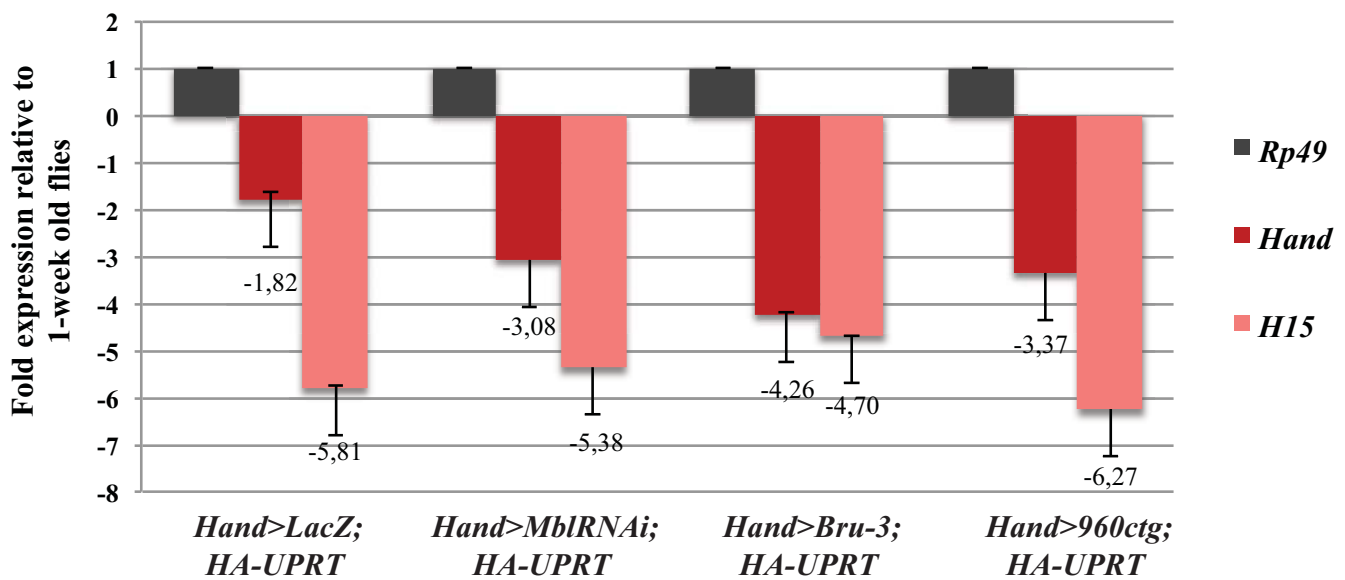


**Figure S1. Validation of the double transgenic lines combining UPRT and DM1 transgenes, driven by the *Hand-Gal4* line.**

Immunostaining with anti-HA antibody performed on «double» transgenic flies expressing HA-UPRT tagged protein and DM1 transgenes (*UAS-960-iCTG*, *UAS-MblRNAi* or *UAS-Bru-3*) or control *UASLacZ* transgene, expressed specifically in the heart by using *Hand-Gal4* driver line. Note the HA staining (in red) in pericardial cells mainly (white arrows) of the 4 models *Hand>LacZ;HA-UPRT*, *Hand>MblRNAi; HA-UPRT*; *Hand>Bru3;HA-UPRT* and *Hand>960-iCTG;HA-UPRT* but not in the uninduced contrl *UAS-bru3;HA-UPRT/+*.

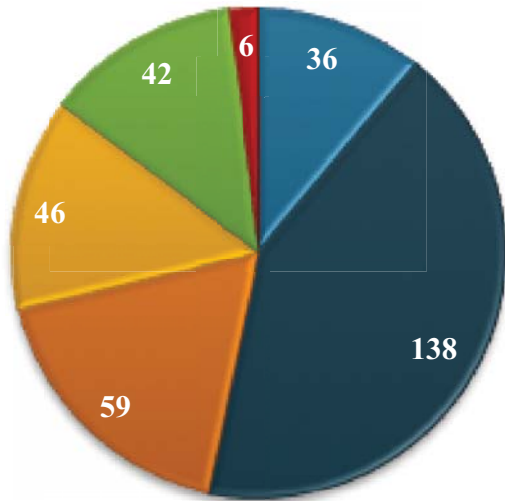


## Decreased expression of cardiac genes in 5-weeks old flies

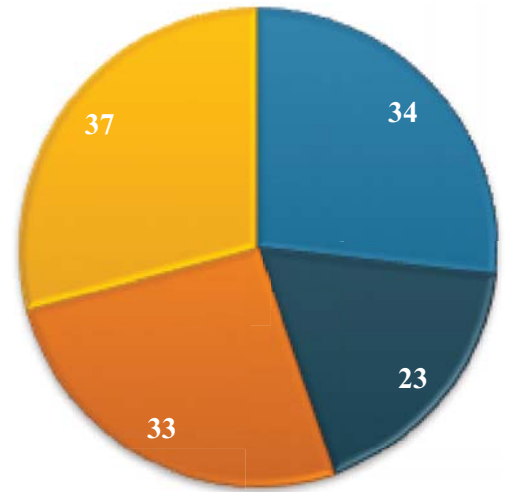


**Figure S2. RT-qPCR results showing decreased expression of cardiac genes in 5-weeks old flies compared to 1-week old flies.**

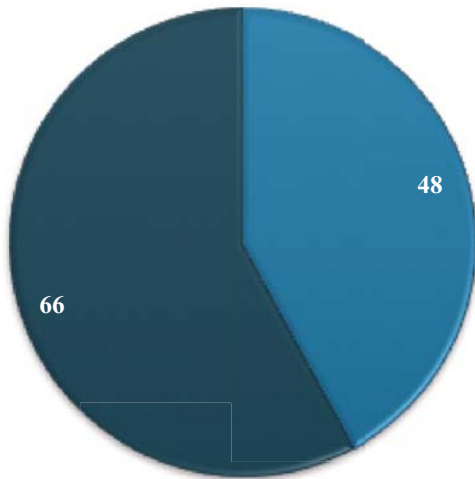
RT-qPCR comparing the expression of cardiac genes (*Hand* and *H15*) in the 4TU (cardiac specific) fraction of *Hand>LacZ;HA-UPRT*, *Hand>MblRNAi; HA-UPRT*; *Hand>Bru3;HA-UPRT* and *Hand>960-*i*CTG;HA-UPRT* conditions in young (1-week) and old (5-weeks) flies. Results show that *Hand* and *H15* expressions are decreased in older flies of all the genotypic contexts.

**A**Gene Ontology of deregulated genes in *Hand>MblRNAi* 1-week old flies

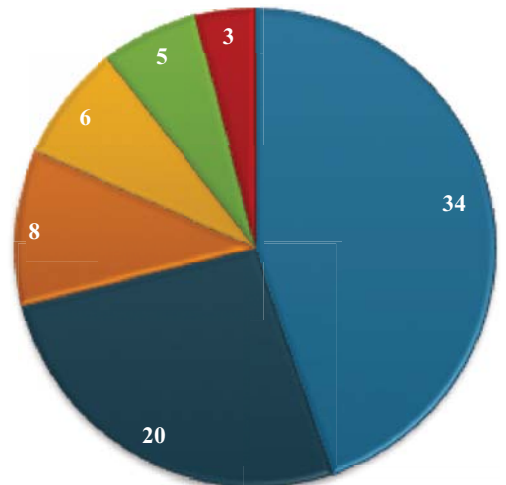
- response to bacterium
- single-organism metabolic process
- oxidation-reduction process
- defense response
- response to external biotic stimulus
- polytene chromosome puffing

Gene Ontology of deregulated genes in *Hand>MblRNAi* 5-weeks old flies

- response to bacterium
- antimicrobial humoral response
- immune response
- defense response

**B**Gene Ontology of deregulated genes in *Hand>Bru-3* 1-week old flies

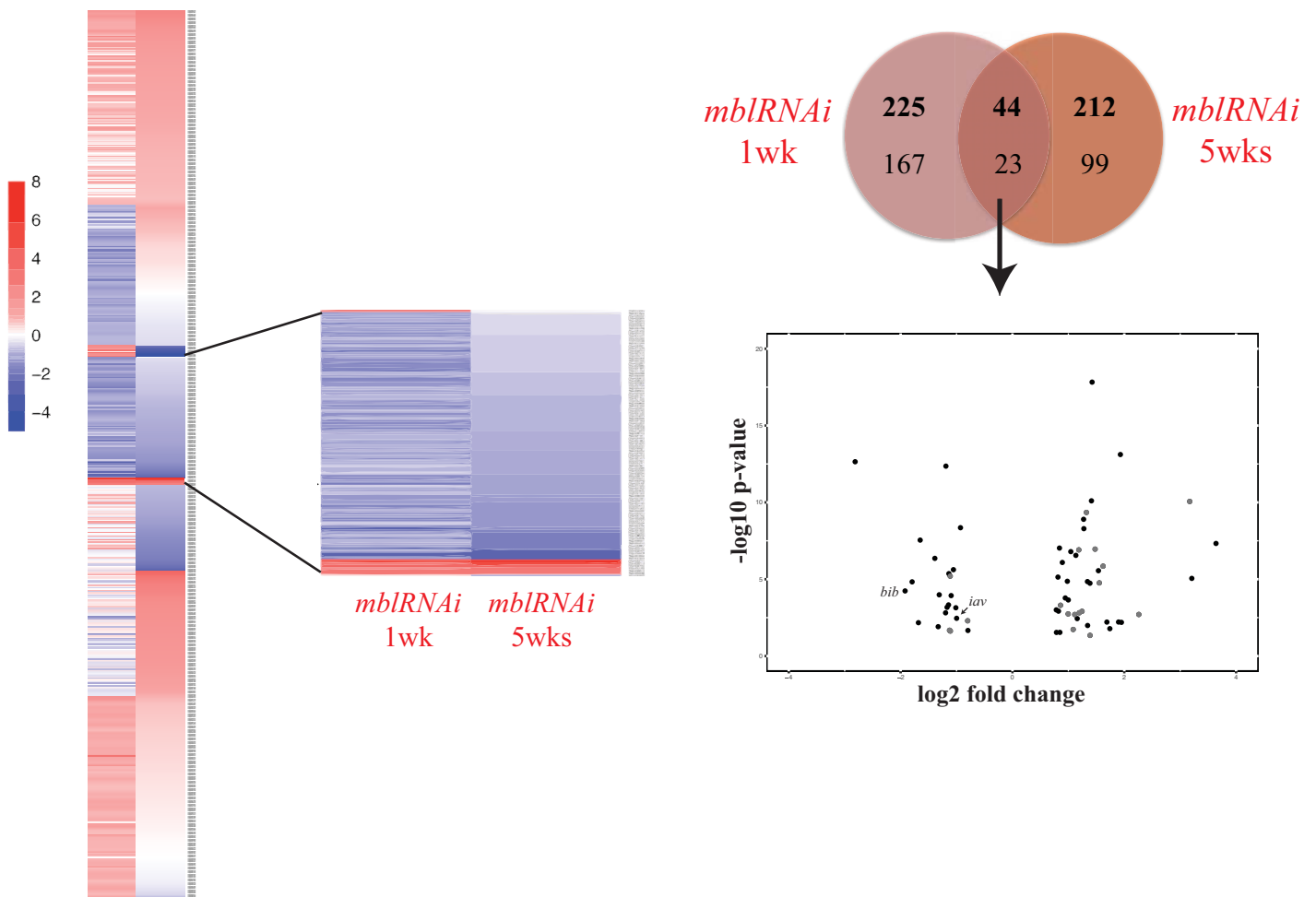
- translation
- organonitrogen compound metabolic process

Gene Ontology of deregulated genes in *Hand>Bru-3* 5-weeks old flies

- transmembrane transport
- response to bacterium
- defense response to Gram-positive bacterium
- xenobiotic metabolic process
- amine metabolic process
- glutamine family amino acid catabolic process

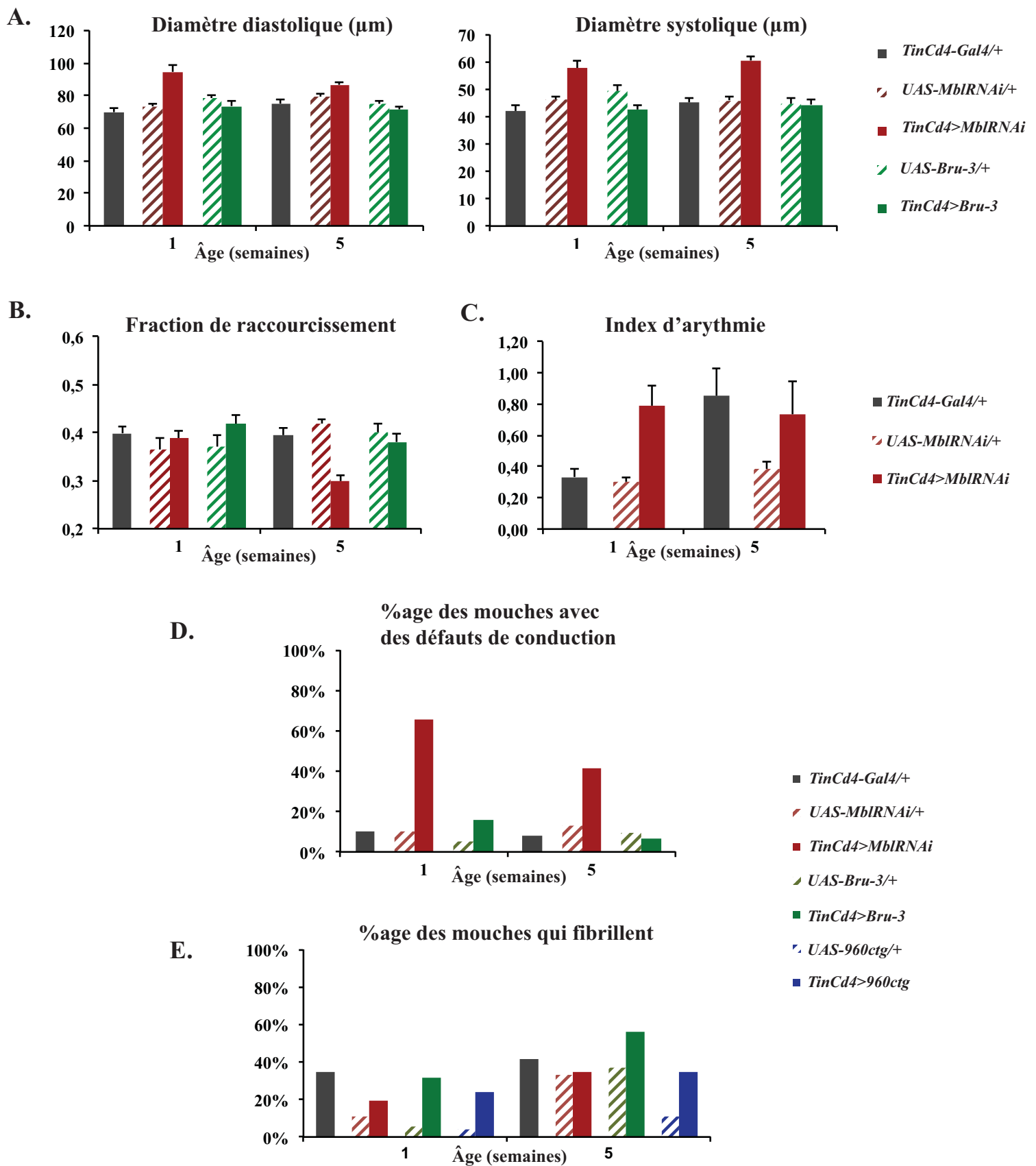
**Figure S3. Gene ontology classification of deregulated genes in *Hand>MblRNAi*; *HA-UPRT* and *Hand>Bru3*; *HA-UPRT* 1-week and 5-weeks old flies.**

A. Gene ontology classification of global (up and down) deregulated genes in *Hand>MblRNAi*; *HA-UPRT* 1-week old (left panel) and 5-weeks old (right panel) flies. B. Gene ontology classification of global (up and down) deregulated genes in *Hand>Bru-3*; *HA-UPRT* 1-week old (left panel) and 5-weeks old (right panel) flies.



**Figure S4. Strategy for the selection of deregulated genes in *Hand>mbIRNAi* flies at 1 and 5-weeks old responsible for dilated cardiomyopathy.**

Selection strategy for candidates genes involved in dilated cardiomyopathy phenotype. Left panel : heat-maps showing the distribution of deregulated genes in *Hand>MblRNAi* 1-week and 5-weeks old flies with the same pattern (red, up and blue, down-regulated). Right panel : Venn diagrams representing the number of common deregulated genes in both conditions and Volcano plot depicting their deregulation level (in black, genes with Human orthologues). Note that *iav*, *bib* and *argk* genes, good candidates for this phenotype are highlighted.



**Figure 43. Analyse physiologique cardiaque des modèles DM1 avec la lignée pilote *TinCd4-Gal4*.**

A. Diamètres diastoliques et systoliques dans les modèles *TinCd4>MbIRNAi* et *TinCd4>Bru-3* par rapport à la lignée contrôle *TinCd4-Gal4/+*. B. Fraction de raccourcissement (FR = (DD-DS/DD) x100) des modèles *TinCd4>MbIRNAi* et *TinCd4>Bru-3*. C. Index d'arythmie des mouches *TinCd4>MbIRNAi* et des contrôles. D. Pourcentage des mouches présentant des défauts de conduction dans les modèles *TinCd4>MbIRNAi* et *TinCd4>Bru-3*. E. Analyse des défauts de fibrillation dans les modèles DM1 exprimés avec la lignée pilote

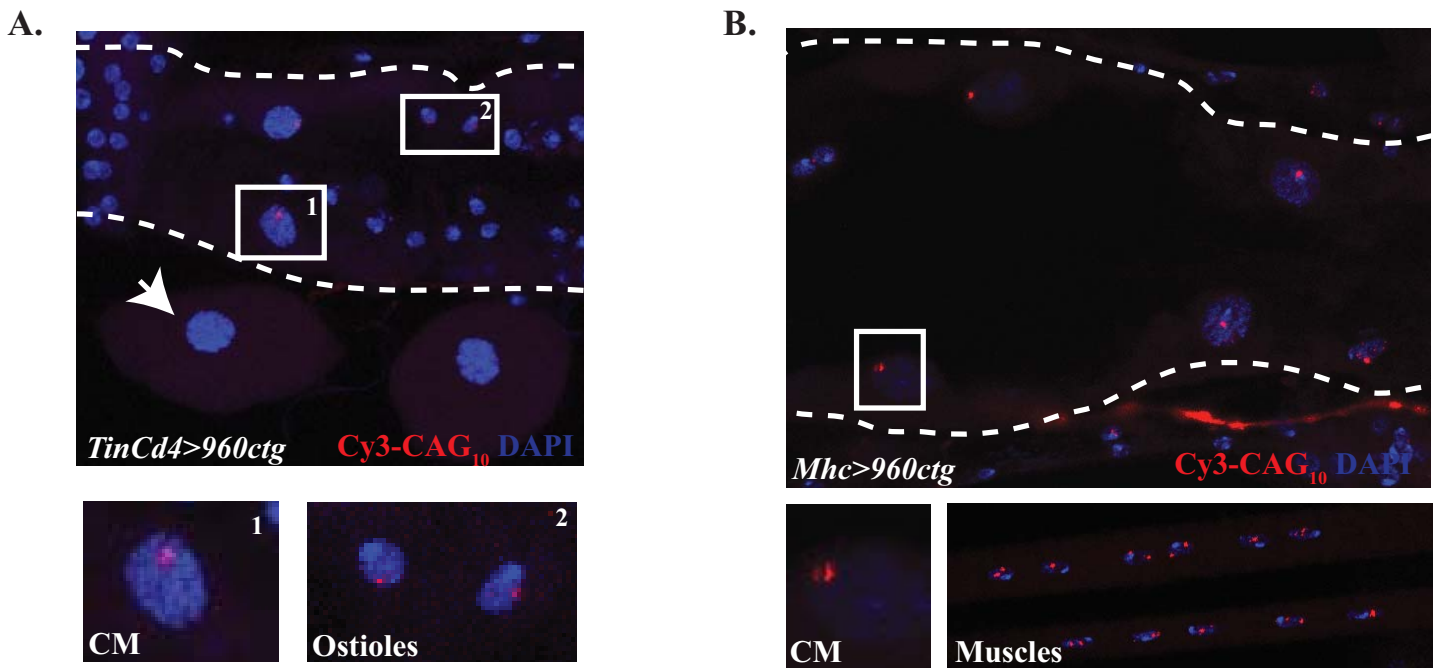
## 2. Résultats complémentaires non publiés

### a. Analyse physiologique cardiaque des modèles DM1 avec la lignée pilote *TinCd4-Gal4*

Les résultats obtenus dans l'article décrit ci-dessus avec la lignée *Hand-Gal4* ont été ensuite comparés à ceux obtenus avec une lignée pilote *TinCd4-Gal4*, spécifique des cardiomyocytes (CMs). Cette analyse physiologique a permis de reproduire les défauts cardiaques observés dans la lignée atténuée pour *Mbl* : les mouches *TinCd4>MblRNAi* présentent des diamètres de contraction et de relaxation augmentés à 1 et 5 semaines (**Figure 43 A**), associés à une diminution de la fraction de raccourcissement à 5 semaines (**Figure 43 B**). De plus, ce modèle présente un index d'arythmie augmenté (**Figure 43 C**) et des défauts de conduction à 1 semaine tout comme les mouches *Hand>MblRNAi* mais contrairement à ces dernières, lorsque *Mbl* est atténuée spécifiquement dans les CMs, ces défauts persistent à 5 semaines (**Figure 43 D**). Concernant la fibrillation observée précédemment dans les modèles *Hand>Bru-3* et *Hand>DMI<sub>960</sub>*, l'expression des transgènes spécifiquement dans les CMs ne cause de la fibrillation qu'en contexte *TinCd4>Bru-3* à 5 semaines (**Figure 43 E**). De plus, les défauts de conduction observés à 1 semaine chez les mouches *Hand>Bru-3* sont atténués en contexte *TinCd4>Bru-3* (**Figure 43 D**). L'absence de fibrillation dans le modèle *TinCd4>DMI<sub>960</sub>* pourrait s'expliquer par une augmentation des taux de fibrillation dans la lignée contrôle *TinCd4-Gal4/+* par rapport à la lignée contrôle *Hand-Gal4/+*.

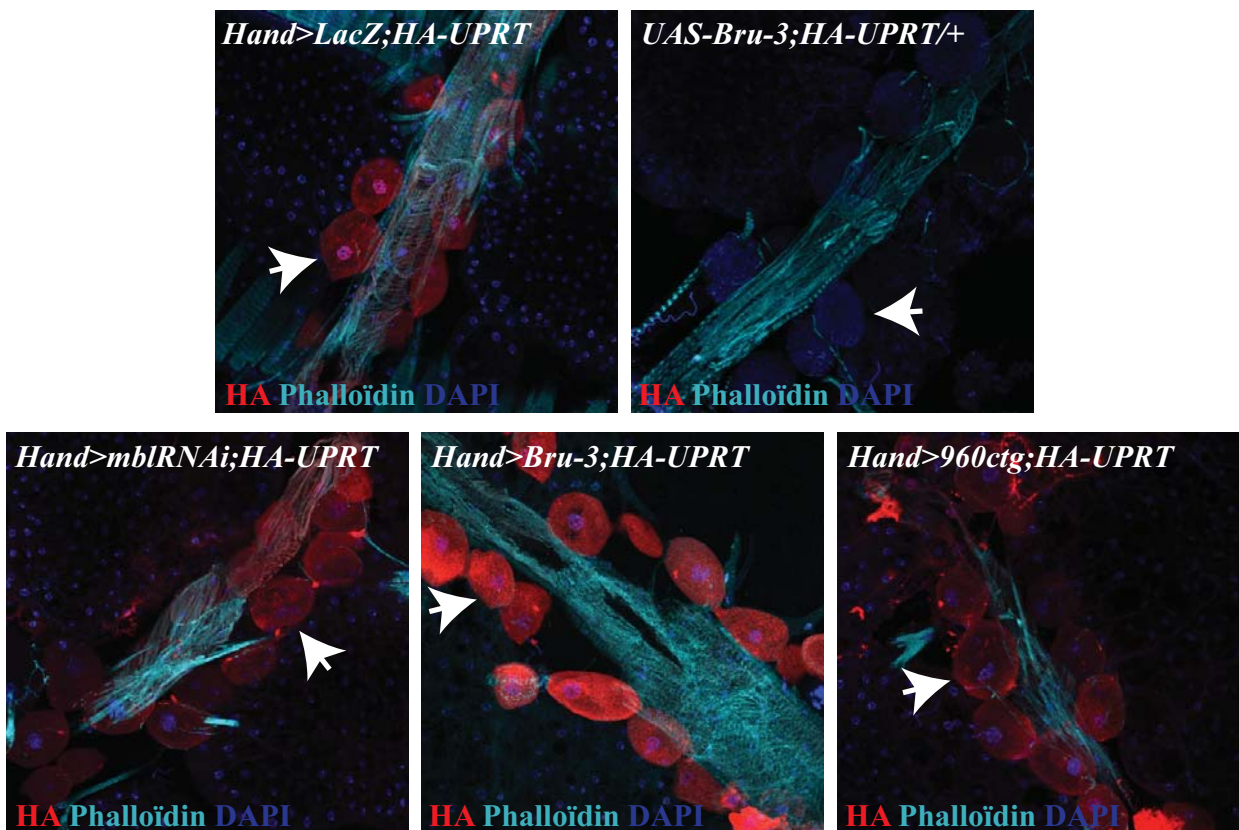
### b. Résultats complémentaires sur l'observation des foci dans le cœur du modèle DM1

Afin de valider notre modèle cardiaque adulte de la DM1, nous avons dû confirmer la présence de foci dans les noyaux des cellules cardiaques exprimant les répétitions chez la mouche adulte. Pour cela, nous avons exprimé les répétitions dans le cœur dès l'embryogénèse à l'aide de différentes lignées pilotes : *Hand-Gal4*, exprimée dans les CMs et les CPs, *TinCd4-Gal4* spécifique des CMs et des ostioles et *Mhc-Gal4* exprimée dans les muscles en général et en particulier dans les CMs et les muscles adultes en périphérie du cœur (muscle abdominaux). Par hybridation *in situ* et à l'aide d'une sonde fluorescente *Cy3-(CAG)<sub>10</sub>* (protocole décrit dans le matériel et méthodes de l'article), nous avons pu observer une accumulation de la sonde sous forme de foci dans le noyau des cellules exprimant les répétitions CTG, confirmant la formation de foci dans le cœur adulte de notre modèle DM1. Notamment, les foci dans les CMs et CPs sont représentés dans la publication et ceux observés pour les deux autres lignées pilotes dans la **Figure 44**.



**Figure 44. Observation des foci dans le modèle cardiaque adulte  $DM1_{960}$ .**

A. Hybridation *in situ* (HIS) montrant la présence de foci dans les cardiomyocytes (CMs, encadré 1) et les ostioles (encadré 2) de femelles drosophiles adultes exprimant  $960CTG$  à l'aide de la lignée pilote  $TinCd4-Gal4$ . Les parois du coeur sont représentées en pointillés blancs. B. HIS montrant la présence de foci dans les noyaux des CMs et des muscles situés dans l'abdomen d'une femelle adulte  $Mhc>960CTG$ .



**Figure 45. Vérification des lignées doubles DM1/UPRT par immunomarquage.**

Immunomarquage avec un anticorps anti-HA sur les lignées doubles exprimant la protéine HA-UPRT couplée aux lignées DM1 ( $960CTG$  ou  $MblRNAi$  ou  $Bru-3$ ) ou à la lignée contrôle LacZ. On observe le signal HA (en rouge) dans les 4 lignées testées exprimant le transgène grâce à la lignée  $Hand-Gal4$ , principalement dans les cellules péricardiaques (flèches blanches) sauf pour le contrôle négatif ( $UAS-bru3;HA-UPRT/+$ ) pour lequel le transgène n'est pas exprimé.



### c. Adaptation de la technique de TU-tagging pour l'isolation des ARNs du cœur adulte de drosophile

Afin de réaliser l'analyse transcriptomique des cœurs DM1, nous avons dû sélectionner une méthode de collecte spécifique des ARNs cardiaques. Pour cela, nous aurions pu disséquer le cœur adulte comme ce qui est largement pratiqué. Cependant, ce protocole n'est pas parfait puisqu'on récupère en général des cellules graisseuses attachées au tube cardiaque, ce qui peut légèrement contaminer les échantillons cardiaques. Publiée en 2009 et prometteuse, la technique du TU-tagging permet d'isoler l'ARN néo-synthétisé, spécifique de n'importe quel tissu grâce au système Gal4/UAS. Brièvement, cette méthode permet le marquage (« tagging ») d'un ARN d'intérêt au moyen d'une base Uracile modifiée (thiolée, TU) incorporée dans l'ARN néo-synthétisé à l'aide d'une enzyme Uracile PhosphoRibosyl Transférase (UPRT) exprimée dans le tissu choisi.

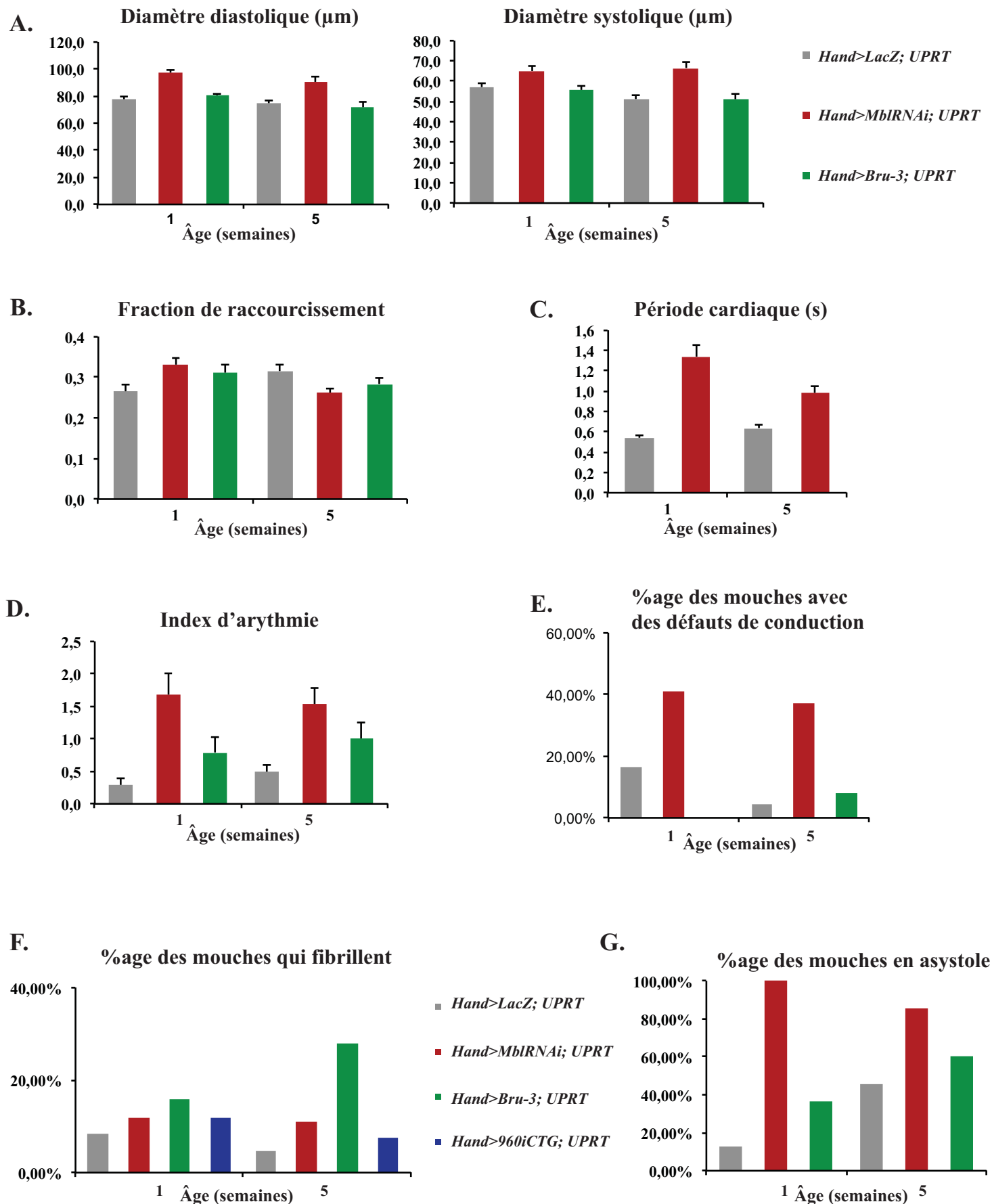
- Construction et validation des lignées « doubles »

Pour utiliser cette technique dans le contexte DM1, nous avons généré des lignées de drosophile combinant un transgène UAS-UPRT avec les modèles décrits précédemment et une lignée contrôle. L'expression de l'enzyme UPRT a été vérifiée par immunomarquage, à l'aide d'un anticorps anti-HA (Hemagglutinine) dans les 4 lignées « doubles » : les 3 lignées DM1 (*UAS-MblRNAi;UAS-HA-UPRT*, *UAS-Bru3;UAS-HA-UPRT* et *UAS-960iCTG;UAS-HA-UPRT*) et la lignée contrôle *UAS-LacZ;UAS-HA-UPRT* exprimées dans le cœur à l'aide de la lignée pilote *Hand-Gal4* ou pour le contrôle négatif, en absence d'induction du transgène (**Figure 45**).

- Analyses physiologiques cardiaques des lignées « doubles »

Les 4 lignées *UAS-LacZ;UAS-HA-UPRT*, *UAS-MblRNAi;UAS-HA-UPRT*, *UAS-Bru3;UAS-HA-UPRT* et *UAS-960iCTG;UAS-HA-UPRT* possèdent deux séquences UAS, ce qui peut avoir pour conséquence de diminuer la force d'expression des transgènes DM1 (MblRNAi, Bru-3 ou 960 CTG) puisque la protéine Gal4 se fixe sur les deux UAS. Pour cela, j'ai réalisé les analyses physiologiques sur le cœur de ces modèles dans les conditions du TU-tagging : après une période de 8h de jeûne, les mouches sont transférées sur du milieu classique à 29°C pour permettre une expression plus importante de la protéine Gal4, sensible à la température pendant 12 heures. Après cette période, les mouches sont disséquées et filmées.





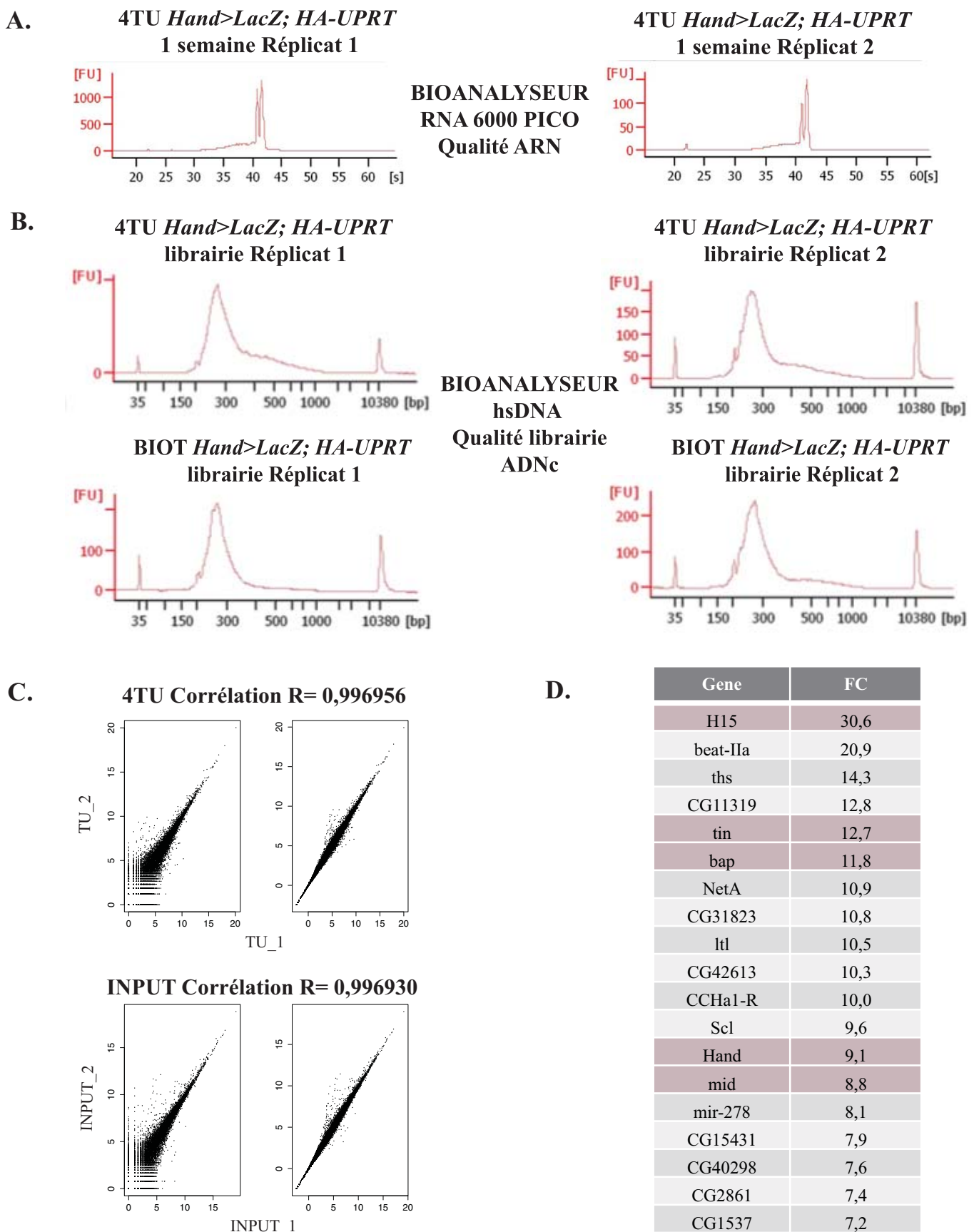
**Figure 46. Analyses physiologiques cardiaques des lignées « doubles » générées pour le TU-tagging.**

Paramètres rythmiques (A, période cardiaque et B, index d'arythmie) et contractiles (C, diamètres diastolique (gauche) et systolique (droite), D, fraction de raccourcissement ( $FR = ((DD-DS)/DD) \times 100$ )) des mouches générées pour le TU-tagging de génotype *Hand>LacZ, HA-UPRT*, *Hand>MblRNAi, HA-UPRT*, *Hand>Bru-3, HA-UPRT* et *Hand>960iCTG, HA-UPRT*. E, F, G. Analyse des défauts de conduction (E), de fibrillation (F) et d'asystole (G) dans ces modèles à 29°C.

Cette étude a permis de confirmer la présence de défauts contractiles dans le modèle *Hand>MblRNAi;HA-UPRT* qui présente une augmentation des diamètres diastolique et systolique à 1 et 5 semaines (**Figure 46 A**), associée à la diminution de la fraction de raccourcissement à 5 semaines (**Figure 46 B**). De plus, une atteinte rythmique est observée, caractérisée par une période cardiaque plus longue (**Figure 46 C**), et plus sévèrement à 1 semaine, causée par l'augmentation des intervalles diastolique et systolique (données non montrées). Concernant les mouches *Hand>Bru3;HA-UPRT*, les défauts contractiles ne sont pas observés dans ce contexte avec deux UAS (**Figure 46 A**) mais l'index d'arythmie est augmenté à 1 et 5 semaines, tout comme dans le modèle *Hand>MblRNAi;HA-UPRT*, plus arythmique (**Figure 46 D**). Des défauts de conduction sont observés dans la lignée double *Hand>MblRNAi;HA-UPRT* à 1 semaine et persistent à 5 semaines mais les mouches *Hand>Bru3;HA-UPRT* ne montrent pas de défaut de conduction dans le contexte UPRT (**Figure 46 E**). Cependant, on retrouve une fibrillation dans le modèle *Hand>Bru3;HA-UPRT* à 5 semaines confirmant ce qui a déjà été observé en contexte avec un seul UAS exprimé avec *Hand-Gal4* ou *TinCd4-Gal4* mais pas pour les mouches *Hand>960iCTG;HA-UPRT* à 5 semaines (**Figure 46 F**). Enfin, dans le contexte des lignées « doubles » *Hand>MblRNAi;HA-UPRT* et *Hand>Bru3;HA-UPRT*, on observe une augmentation de la proportion de mouches avec des longues périodes d'arrêt cardiaque ou asystole (**Figure 46 G**).

- **Adaptation du protocole pour l'isolation des ARNs cardiaques**

Suite au croisement des lignées « doubles » induites avec le pilote *Hand-Gal4* (F0), les adultes descendant (lignées F1) ont été élevés jusqu'à une ou cinq semaines. Ensuite, après une étape de jeûne, les drosophiles femelles ont été nourries avec du 4-TU (4-ThioUracile) pendant 12 heures à 29°C puis disséquées. Les grandes étapes de ce protocole sont décrites dans la figure 5 de l'article et consistent en i) une dissection rapide de la drosophile (élimination de la tête, le thorax, les ailes, les pattes et les ovaires), ii) une extraction de l'ARN total, iii) le marquage de l'ARN thiolé grâce à une étape de biotinylation, vérifiée par dot-blot puis iv) la récolte de l'ARN thiolé par purification Streptavidine. La qualité de l'ARN a été vérifiée après les étapes 2 et 4. L'étape de pré-dissection de la mouche adulte a été nécessaire pour enrichir le matériel de départ en ARN cardiaque. En effet, cette méthode a été mise en place pour isoler l'ARN des cellules gliales chez la drosophile mais les cellules cardiaques (une centaine de cellules environ) sont en nombre plus faible que les cellules nerveuses isolées dans le protocole initial (établi sur 2000 neurones et sur une sous-population d'environ 250 cellules), nécessitant l'adaptation du protocole.



**Figure 47. Validation de la technique du TU-tagging.**

A. Profils de bioanalyseur analysant la qualité des ARNs 4TU de la condition *Hand>LacZ; HA-UPRT* après la méthode du TU-tagging. On observe un profil avec deux pics caractéristiques d'un ARN de bonne qualité. B. Profils de bioanalyseur analysant la qualité de la bibliothèque ADNc générée à partir des ARN 4TU et BIOT (Input) de la condition *Hand>LacZ; HA-UPRT* à l'aide du kit OVATION (NuGEN). C. Schémas représentant la corrélation des réplicats après le séquençage ARN des échantillons 4TU et INPUT *Hand>LacZ; HA-UPRT*. D. Tableau représentant les 20 gènes les plus enrichis dans la fraction 4TU *Hand>LacZ; HA-UPRT* à une semaine.

- Préparation des bibliothèques pour le séquençage ARN

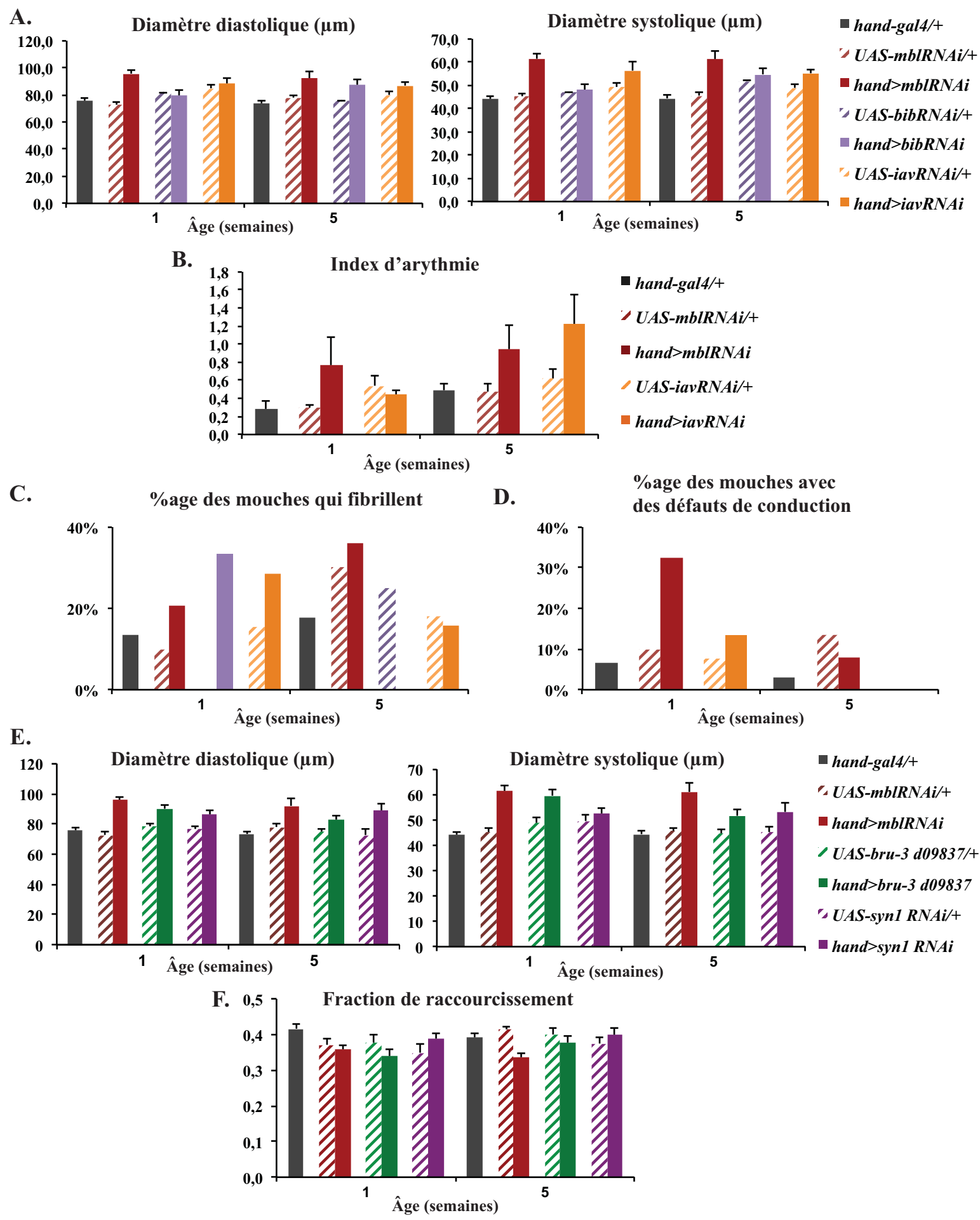
A la suite de la récolte de l'ARN spécifique, j'ai préparé les bibliothèques ADNc pour le séquençage. Pour cela, nous avons sélectionné le kit de préparation OVATION (NuGene), spécifique de la drosophile et permettant une élimination efficace des ARN ribosomiaux. A partir d'environ 45-50 ng d'ARN spécifique et de bonne qualité (**Figure 47 A**), j'ai pu générer des bibliothèques d'une taille moyenne d'environ 300 paires de bases avec une quantité suffisante de matériel pour réaliser un séquençage en duplicat, de 100 paires de bases appariées (**Figure 47 B**). Le séquençage des échantillons thiolés (4TU) spécifiques du cœur et biotinylés (contrôle, INPUT) provenant de la condition *Hand>LacZ;UAS-HA-UPRT*, a montré une forte corrélation des duplicats (**Figure 47 C**) et a permis de mettre en évidence l'enrichissement de transcrits cardiaques (**Figure 47 D**).

En résumé, plusieurs modifications ont été apportées au protocole original pour obtenir la purification d'une quantité suffisante d'ARN spécifique du cœur, qui a ensuite été analysée par séquençage en masse.

#### **d. Analyses complémentaires de gènes candidats sélectionnés pour expliquer les symptômes cardiaques**

Dans l'article décrit ci-dessus, j'ai décrit l'analyse physiologique cardiaque de deux candidats, *l(2)03659* et *Sij*, dont les variations d'expression provoquent des défauts cardiaques, principalement de la conduction et une augmentation du taux de fibrillation. En parallèle, nous avons analysé les conséquences de la dérégulation d'autres candidats dont l'expression varie dans nos modèles DM1, candidats présentés dans le tableau 2 de l'article.

Concernant les défauts associés à l'atténuation de *Mbl* à 1 et 5 semaines, les analyses physiologiques cardiaques préliminaires réalisées sur les candidats *big brain (bib)*, orthologue de l'Aquaporine (*AQP*), une protéine transmembranaire et *inactive (iav)*, orthologue des canaux calciques TRPV, n'ont pas permis de retrouver les défauts cardiaques observés dans le contexte *Hand>MblRNAi*. Cependant, il semblerait que l'atténuation de *bib* cause une légère augmentation du diamètre diastolique à 5 semaines, comme en contexte atténué pour *Mbl* mais aucune perturbation du diamètre systolique n'est observée. A l'inverse, en contexte *Hand>iavRNAi*, on observe une augmentation du diamètre systolique à 1 et 5 semaines mais pas d'altération du diamètre diastolique (**Figure 48 A**). Dans les contextes ARNi pour *bib* et *iav*, aucune altération de la fraction de raccourcissement n'est observée, confirmant l'absence de cardiomyopathie dilatée pour ces candidats (données non présentées). De plus, les



**Figure 48. Analyses physiologiques des candidats potentiellement impliqués dans la cardiomyopathie dilatée (*bib* et *iav*) et dans les défauts de conduction (*SynI*).**

A, E. Diamètres diastoliques (panel de gauche) et systoliques (panel de droite) du modèle *Hand>MblRNAi* et des candidats atténués *bib* et *iav* (A) et du candidat *Hand>syn1RNAi* (F). B. Index d'arythmie pour les modèles *Hand>MblRNAi* et *Hand>iavRNAi*. C, D. Pourcentage de mouches présentant des défauts de fibrillation (C) et de conduction (D). F. Fraction de raccourcissement (FR = (DD-DS)/DD x100).

mouches *Hand>iavRNAi* sont aussi plus arythmiques à 5 semaines (index d'arythmie multiplié par 2) (**Figure 48 B**) et fibrillent plus à 1 semaine, tout comme les mouches *Hand>bibRNAi* (**Figure 48 C**). Enfin, une légère augmentation des défauts de conduction est observée dans la lignée atténuée pour *iav* à 1 semaine, mais plus faiblement que ce que l'on observe en contexte *Hand>MblRNAi* (**Figure 48 D**).

En parallèle, l'analyse des candidats *CG43980* et *CG31106* pour leur implication dans la fibrillation, en plus de *l(2)03659* (décrit dans l'article), a permis d'exclure leur rôle dans l'apparition des défauts de fibrillation dans les modèles *Hand>Bru-3* et *Hand>DM1<sub>960</sub>* puisque les mouches *Hand>CG43980RNAi* et *Hand>CG31106RNAi* analysées à 1 et 5 semaines, ne présentent aucun défaut ni contractile, ni rythmique. De même, ces mouches ne fibrillent pas plus que les mouches contrôle et n'ont aucun défaut de conduction.

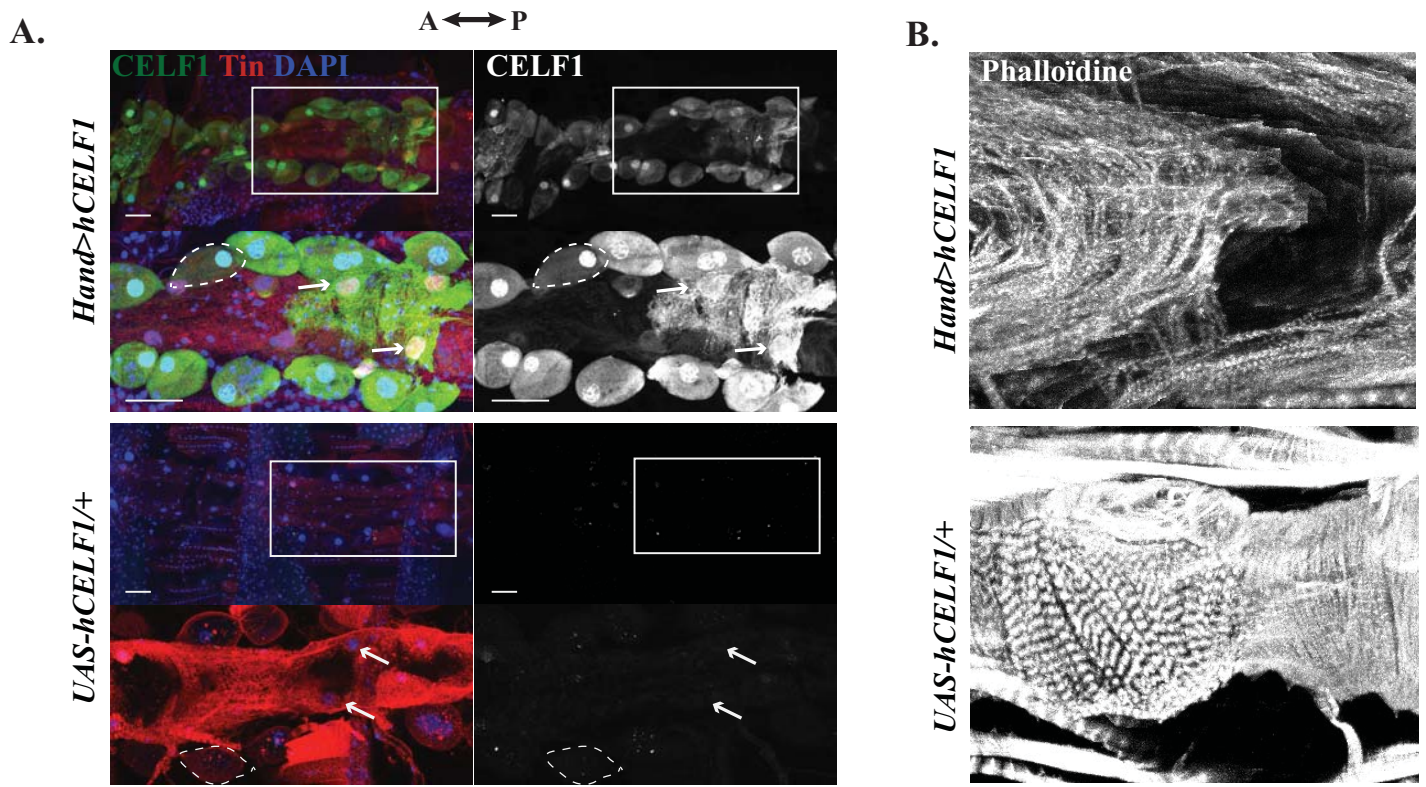
De même, les analyses cardiaques sur les candidats potentiellement impliqués dans les défauts de conduction, n'ont pas permis de confirmer l'implication de *Syn1*, l'orthologue des Syntrophines (*SNTA1* et *SNTB1*) puisque les mouches atténuées pour *Syn1* ne présentent aucun défaut de conduction, ni de fibrillation à 1 et 5 semaines. Cependant, nous avons pu observer une légère augmentation des diamètres de contraction (à 5 semaines) et de relaxation (à 1 et 5 semaines) qui ressemblent à ce qui est retrouvé en contexte *Hand>MblRNAi* et *Hand>Bru-3* (**Figure 48 E**). Par contre, la fraction de raccourcissement n'est pas affectée (**Figure 48 F**). Enfin, l'analyse du candidat *inaD* dont l'orthologue FRMPD2 code pour une protéine de structure, n'a pas pu être menée puisque l'ARNi contre *inaD* entraîne une forte létalité des mouches durant le stade pupal. L'analyse d'un mutant pour *inaD* est en cours.

Enfin, nous avons sélectionné un gène candidat dérégulé dans les trois contextes DM1 à 1 et 5 semaines, *Tim17b1* qui code pour une protéine de la membrane mitochondriale et conservé chez l'Homme. L'analyse physiologique cardiaque des mouches dont l'expression de *Tim17b1* est atténuée dans le cœur spécifiquement, n'a pas montré de défaut particulier contractile ou rythmique.

#### **e. Analyse des conséquences d'une surexpression de la protéine CELF1 humaine sur la physiologie cardiaque chez la drosophile**

En parallèle de l'analyse du rôle de *Mbl* et *Bru-3* dans l'apparition des symptômes cardiaques, nous avons voulu étudier le rôle de la protéine humaine CELF1 grâce à l'utilisation d'une lignée de drosophile transgénique hétérologue *UAS-hCELF1*. Cette lignée a déjà permis de montrer chez la drosophile que la surexpression de la protéine CELF1 humaine





**Figure 49. Caractérisation phénotypique de la lignée cardiaque *Hand>hCELF1*.**

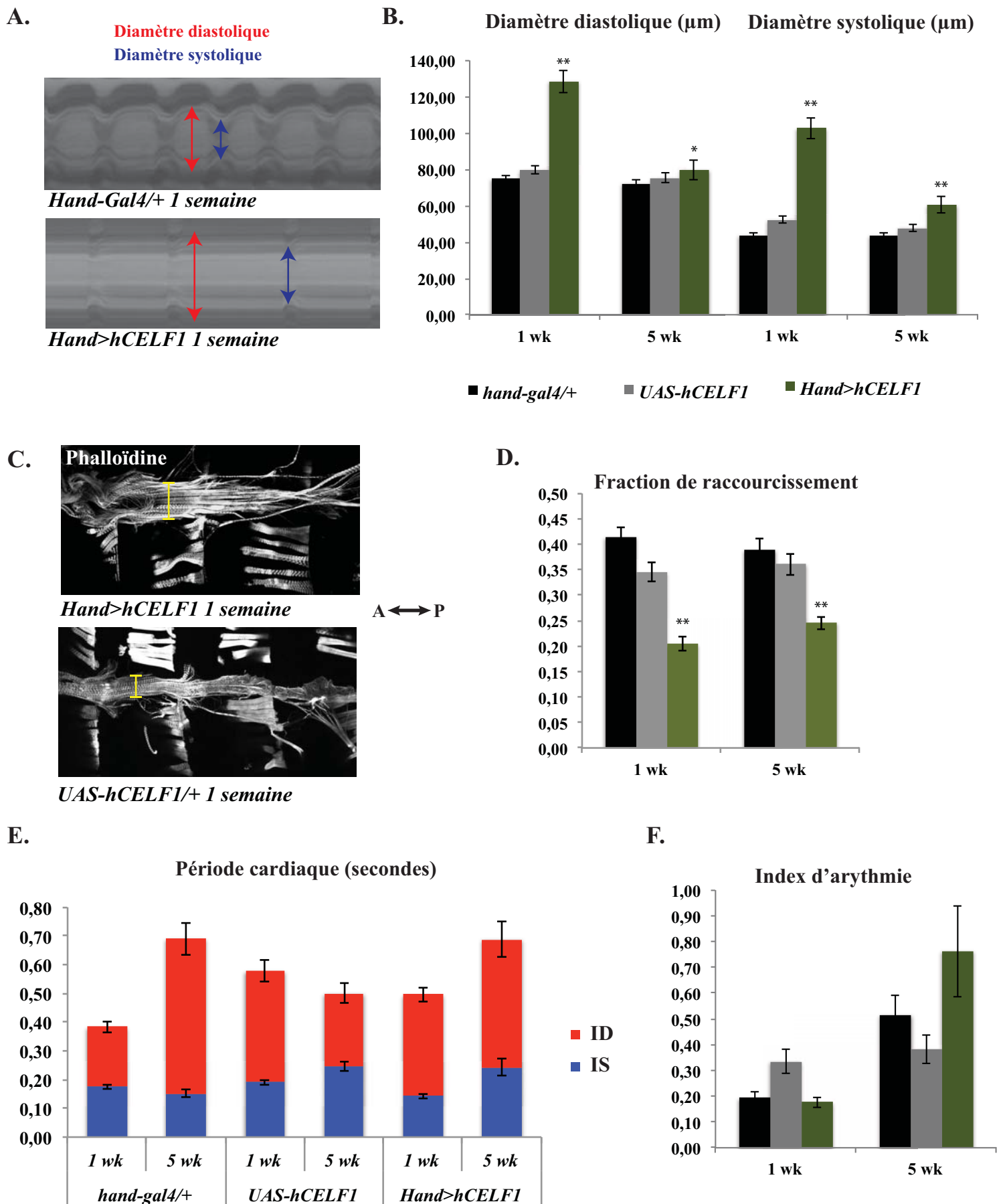
A. Les mouches adultes *Hand>hCELF1* surexpriment bien la protéine CELF1 humaine (en vert) dans les cellules péricardiaques (entourées en pointillés) et dans les cardiomyocytes (flèches). A l'inverse, aucune expression de CELF1 n'est détectée dans le coeur des mouches *UAS-hCELF1/+*. B. Le coeur de la lignée *Hand>hCELF1* (panel du haut) présente une désorganisation sarcomérique des fibres circulaires, contrairement aux mouches contrôles (panel du bas).



en contexte DM1 (480 iCTG) aggrave les phénotypes musculaires (de Haro *et al.*, 2006). Cette étude visait en partie à comparer les phénotypes observés soit en contexte surexprimant l'orthologue de CELF1, Bru-3 ou bien la protéine humaine.

Dans un premier temps, nous avons dû confirmer que la protéine CELF1 humaine (hCELF1) s'accumule dans les cellules cardiaques surexprimant le transgène *UAS-hCELF1*. Pour cela, j'ai réalisé un immunomarquage sur le cœur des mouches *Hand>hCELF1* (panel du haut), avec l'anticorps CELF1 humain, et j'ai pu observer un marquage intense de la protéine dans les cellules péricardiaques (entourées en pointillés) et dans les cardiomyocytes (flèches). Inversement, aucun signal n'est observé dans la lignée non induite (panel du bas) (**Figure 49 A**). De plus, le marquage des fibres d'Actine (révélées par la Phalloïdine) a permis d'observer une désorganisation des sarcomères des fibres longitudinales qui entourent le cœur des femelles *Hand>hCELF1* (**Figure 49 B**). Enfin, une analyse de la survie des mouches *Hand>hCELF1* a montré une diminution de l'espérance de vie dans ce modèle : presque 20% des mouches *Hand>hCELF1* meurent dans la première semaine de vie et présentent aussi une survie affectée à 5 semaines (**Figure 49 C**).

Comme pour les analyses physiologiques sur les modèles DM1 décrits précédemment, nous avons caractérisé les défauts cardiaques des mouches *Hand>hCELF1* à 1 et 5 semaines. L'observation de M-modes dans le contexte CELF1 induit a permis de montrer une altération des diamètres du cœur par rapport au contrôle (*Hand-gal4/+*) (**Figure 50 A**). Ces diamètres diastolique (DD, en rouge) et systolique (DS, bleu) sont augmentés significativement à 1 et 5 semaines mais de manière plus sévère à 1 semaine (**Figure 50 B**). Cette dilatation, aussi observée en visualisant les parois du cœur à l'aide de la Phalloïdine (**Figure 50 C**), est associée à la diminution de la fraction de raccourcissement, reflet de l'efficacité de contraction du cœur et donc du débit cardiaque (**Figure 50 D**). Concernant les paramètres rythmiques de ce modèle, il semblerait que la période cardiaque (somme de l'intervalle diastolique, ID en rouge et de l'intervalle systolique, IS en bleu) ne soit pas affectée puisqu'elle augmente avec le vieillissement, comme cela est déjà décrit dans la littérature, aussi bien dans la lignée contrôle (*Hand-gal4/+*) que dans la lignée induite *Hand>hCELF1* (**Figure 50 E**). Cependant, les mouches *Hand>hCELF1* développent une arythmie à 5 semaines, traduite par l'augmentation de l'index d'arythmie, calculé par rapport à la variabilité des périodes cardiaques pour une même mouche (**Figure 50 F**). Toutefois, contrairement à ce qui était observé pour la lignée *Hand>Bru-3*, cette arythmie n'est pas associée à l'augmentation des défauts de fibrillation (données non montrées) mais serait plutôt



**Figure 50. Le modèle cardiaque *Hand>hCELF1* développe une cardiomyopathie dilatée.**

A. M-modes de mouches adultes *Hand-gal4/+* (contrôle) et *Hand>hCELF1* montrant l'augmentation des diamètres systolique (DS, bleu) et diastolique (DD, rouge) à 1 semaine. B. Quantification des DS et DD. C. Marquage de l'Actine F, montrant un coeur dilaté dans la condition *Hand>hCELF1* à 1 semaine. D. La fraction de raccourcissement des mouches *Hand>hCELF1* est réduite, confirmant une dysfonction de type cardiomyopathie dilatée. E, F. La période cardiaque des mouches *Hand>hCELF1* n'est pas affectée (E) mais ce modèle est plus arythmique à 5 semaines (F).

le reflet de la perturbation globale du rythme cardiaque. Enfin, les défauts cardiaques observés dans ce modèle d'induction de la protéine CELF1 humaine ressemblent à ceux décrits pour les contextes *Hand>mb1RNAi* et *Hand>bru-3*, notamment par l'altération des diamètres de contraction et la diminution de la fraction de raccourcissement qui traduisent d'une cardiomyopathie dilatée.

### **3. Matériel et méthodes**

#### **a. Lignées de drosophile**

Pour toutes les expériences citées ci-dessus, les drosophiles ont été élevées sur un milieu standard à 25°C (hormis pour le TU-tagging, dont le protocole est détaillé dans le matériel et méthodes de l'article). Les lignées de drosophile utilisées sont : *Hand-Gal4* (généreusement envoyée par L. Perrin, TAGC, Marseille), *TinCd4-Gal4* (généreusement envoyée par R. Bodmer, San Diego, USA) et *UAS-hCELF1* (de Haro *et al.*, 2006). Pour les gènes candidats, les lignées utilisées sont : *UAS-bib RNAi* (BL#27691), *UAS-iav RNAi* (BL#25865), *UAS-CG31106 RNAi* (BL#29582), *UAS-CG43980 RNAi* (BL#57167), *UAS-syn1 RNAi* (VDRC, 104992), *UAS-inaD RNAi* (BL#52313) et *UAS-Tim17b1 RNAi* (VDRC, 103529). Les lignées non répertoriées ici sont citées dans l'article.

#### **b. Analyses physiologiques et de survie**

Les analyses physiologiques du cœur et de survie ont été réalisées selon les méthodes décrites dans l'article.

### **4. Discussion**

Les symptômes cardiaques sont bien décrits chez les patients DM1 grâce aux analyses cliniques et représentent la deuxième cause de mortalité, après les symptômes respiratoires. Cette atteinte cardiaque est principalement caractérisée par des défauts de conduction mais aussi de l'arythmie. Cependant, les causes de ces symptômes sont très mal caractérisées et peu d'études ont tenté de comprendre les dérégulations responsables de ces défauts. A ce jour, seuls quelques modèles murins et un modèle de drosophile se sont intéressés à l'atteinte cardiaque (Wang *et al.*, 2007 ; Chakraborty *et al.*, 2015). Ils ont permis notamment de reproduire les symptômes majeurs observés chez les patients mais aussi de mettre en évidence la dérégulation des miARNs spécifiquement dans le cœur (Kalsotra *et al.*, 2014). Cependant, aucune étude ne s'est intéressée indépendamment au rôle de MBNL1 ou de CELF1 dans l'apparition des symptômes cardiaques et aucune analyse transcriptomique à grande échelle n'a été menée sur le cœur dans un modèle animal DM1.



Le nouveau modèle DM1 cardiaque de drosophile que nous avons généré au laboratoire avait donc pour but de décrire les phénotypes cardiaques induits par la diminution de MBNL1 ou la stabilisation de CELF1 dans le cœur et d'identifier de nouveaux gènes dérégulés spécifiquement dans le cœur et qui pourraient expliquer ces symptômes cardiaques.

Pour cela, nous avons dans un premier temps caractérisé la présence de foci dans le noyaux des cellules cardiaques du modèle de drosophile exprimant 960 répétitions CTG. J'ai pu observer des foci dans les cardiomyocytes et les cellules péricardiaques en utilisant la lignée pilote *Hand-Gal4* pour exprimer les répétitions mais à ce jour, des problèmes techniques ne nous ont pas permis de montrer la colocalisation de la protéine Mbl avec les foci formés par l'expansion CUG. Plusieurs explications sont possibles : il semblerait que la protéine Mbl soit moins fortement exprimée dans le cœur adulte que dans le muscle larvaire (Picchio *et al.*, 2013 ; Plantié *et al.*, à soumettre). De plus, on pourrait envisager que la fonction de Mbl soit différente dans le cœur et que les phénotypes observés ne soient pas directement liés à sa séquestration par les répétitions CUG, ce qui expliquerait la différence des phénotypes cardiaques observés entre la lignée atténuée pour *Mbl* et la lignée *DM1<sub>960</sub>*. Cependant, le modèle récent de drosophile qui a caractérisé les défauts cardiaques d'une lignée pure 250 CTG a démontré la séquestration de Mbl par les foci (Chakraborty *et al.*, 2015), suggérant fortement qu'un problème technique nous empêche d'observer la séquestration de Mbl par les répétitions.

Nous avons ensuite réalisé des analyses physiologiques du cœur des trois modèles DM1 : un modèle *Hand>DM1<sub>960</sub>* exprimant 960 répétitions CTG interrompues spécifiquement dans le cœur, une lignée atténuée pour *Mbl* (*Hand>MblRNAi*) qui permet de reproduire une diminution de la protéine MBNL1 due à sa séquestration par les répétitions et une lignée surexprimant *Bru-3* (*Hand>Bru-3*) qui mime la stabilisation de CELF1 chez les patients, due à sa phosphorylation via la PKC. L'étude des paramètres cardiaques de ces trois modèles a permis d'identifier des phénotypes communs à plusieurs conditions comme une cardiomyopathie dilatée chez les mouches *Hand>MblRNAi* qui persiste dans le temps, une augmentation de l'arythmie et principalement des défauts de fibrillation dans les modèles *Hand>Bru-3* et *Hand>DM1<sub>960</sub>* à 5 semaines et enfin des défauts de conduction observés à 1 semaine dans les conditions *Hand>MblRNAi* et *Hand>Bru-3*.

Ces analyses physiologiques ont été répétées en utilisant une lignée pilote spécifique des cellules contractiles du cœur, les cardiomyocytes (CM). Pour cela, la lignée *TinCd4-Gal4* a été utilisée. Cette étude a permis de valider la présence de certains phénotypes comme une



cardiomyopathie dilatée dans le modèle *TinCd4>MblRNAi* mais certains phénotypes ne sont pas reproduits, notamment la fibrillation observée dans le modèle *Hand>DM1<sub>960</sub>*. Ces différences peuvent s'expliquer pour plusieurs raisons : la lignée *TinCd4-Gal4* s'exprime dans un nombre restreint de cellules (uniquement les CM pour *TinCd4* contre CM et CP pour *Hand*) et la force d'expression de la lignée CM-spécifique est aussi réduite par rapport à la lignée *Hand-Gal4* (observations personnelles). De plus, si on compare les paramètres cardiaques dans les deux lignées étudiées, les mouches *TinCd4-Gal4* sont plus arythmiques à la base, ce qui pourrait empêcher d'observer ces phénomènes d'arythmie dans les modèles DM1 analysés. Enfin, on ne peut exclure un rôle des cellules péricardiaques dans l'apparition des phénotypes cardiaques. Pour cela, il faudrait envisager l'analyse de l'effet des répétitions CTG, de l'atténuation de *Mbl* ou de la surexpression de *Bru-3* uniquement dans les CPs en utilisant une lignée pilote spécifique des CPs, comme *Dot-Gal4* (Lim *et al.*, 2014).

Les phénotypes observés chez les mouches DM1 varient selon les contextes analysés, ce qui nous a encouragé à réaliser des analyses transcriptomiques de ces modèles. Afin d'isoler les ARNs cardiaques de manière la plus spécifique possible, nous avons adapté au cœur, la méthode du TU-tagging, décrite pour l'isolation d'une sous-population de cellules nerveuses chez la drosophile (Miller *et al.*, 2009). Cette technique permet de collecter les ARNs codants et non-codants néo-synthétisés d'un tissu d'intérêt, le cœur dans ce cas, à l'aide d'un marquage de l'ARN par l'incorporation d'une base modifiée, le 4-thio Uracile (4TU) grâce à une enzyme UPRT (Uracile PhosphoRibosyle Transférase) exprimée uniquement dans le cœur de la drosophile. Les ARNs thiolés sont ensuite collectés à l'aide du système Biotine-Streptavidine. Un des avantages majeurs du TU-tagging est qu'il permet l'isolation de l'ensemble des ARNs (non-codants inclus), contrairement à d'autres techniques cellule-spécifique, comme le TRAP (Translating Ribosome Affinity Purification) par exemple qui permet l'isolation des ARNs en cours de traduction. De plus, les ARNs marqués par le 4-TU étant nouvellement synthétisés, on peut envisager réaliser des cinétiques d'incorporation en variant le temps d'incorporation du 4TU afin d'étudier la demi-vie des ARNs par exemple (Miller *et al.*, 2009 ; Tallafuss *et al.*, 2014). Cependant, la principale limitation de la technique, aussi identifiée chez la souris (Gay *et al.*, 2014), est son efficacité d'isolation réduite pour les populations rares de cellules (moins de 1%), qui nous a contraint à ajouter une étape de dissection des mouches adultes afin d'enrichir la fraction cardiaque à isoler. Toutefois, cette technique reste plus spécifique que la dissection du cœur qui généralement conduit à récupérer des cellules du corps gras en plus du cœur. Enfin, puisque





cette technique permet d'isoler toutes les populations ARNs, nous avons dû réaliser une étape de déplétion des ARNr pour pouvoir séquencer le matériel isolé. Etant donné que nous nous intéressions dans un premier temps aux dérégulations transcriptionnelles susceptibles d'expliquer les défauts cardiaques observés, nous avons utilisé un kit spécifique à la drosophile (OVATION, NuGEN) qui nous a permis de générer des bibliothèques d'environ 300 pb en moyenne (150-500 pb) à partir d'environ 45 ng d'ARN spécifique. Dans ces conditions, seuls les ARNs non codants longs sont susceptibles d'être analysés par la suite et il faudrait envisager d'utiliser une bibliothèque spécifique aux petits ARNs pour analyser les miARNs.

En parallèle de l'adaptation de la technique du TU-tagging, nous avons dû confirmer que la mise en place de lignées « double » combinant le transgène UPRT (pour l'incorporation du 4TU) et les transgènes DM1 (*960 CTG* ou *MblRNAi* ou *Bru-3*) permettrait d'observer les phénotypes précédemment identifiés dans des lignées avec un seul transgène UAS. En effet, la protéine Gal4 produite par la lignée inductrice se fixe sur ses séquences UAS. La présence de deux séquences UAS peut donc diminuer la force d'expression des transgènes UAS-DM1. Ceci est le cas pour la fibrillation chez les mouches exprimant les répétitions CTG, qui est plus faible à 5 semaines. Par contre, étonnement les défauts de conduction observés uniquement à 1 semaine chez les mouches *Hand>MblRNAi* et *Hand>Bru-3* semblent renforcés et persistent à 5 semaines en contexte atténué pour *Mbl* dans la lignée double. Globalement, les phénotypes de cardiomyopathie dilatée, de fibrillation et les défauts de conduction bien qu'un peu différents, sont retrouvés dans ces lignées « double », nous permettant de réaliser des analyses transcriptomiques pour identifier des acteurs moléculaires responsables de ces défauts cardiaques.

Ces analyses transcriptomiques par séquençage Illumina ont permis d'identifier des gènes dérégulés dans les différents contextes DM1 analysés, à 1 et 5 semaines. Parmi les gènes dérégulés, une forte proportion (55 à 63% des gènes) code pour des transcrits uniques, ce qui suggère une dérégulation transcriptionnelle indépendante de l'épissage alternatif, comme nous l'avons déjà observée dans le modèle DM1 caractérisé dans le muscle larvaire (Picchio *et al.*, 2013). En effet, la plupart des analyses transcriptomiques faites dans les modèles animaux et chez les patients, s'intéressent aux défauts d'épissage puisque MBNL1 et CELF1 sont des facteurs d'épissage alternatif. Cependant, leurs rôles indépendants de l'épissage comme la régulation de la stabilité des transcrits, pourraient expliquer les dérégulations observées dans nos modèles *Hand>MblRNAi* ou *Hand>Bru3* ainsi que dans le modèle DM1 *Hand>DM1<sub>960</sub>*. Par exemple, la région 3'NT du gène *Stj*, surexprimé en



contexte *Hand>MblRNAi* et *Hand>Bru3*, possède des séquences GU-riches, qui sont des cibles de CELF1/Bru-3, ce qui indiquerait donc une régulation de la stabilité des transcrits par Bru-3 .

Cette étude à grande échelle semble mettre en évidence une accélération du vieillissement dans nos modèles DM1 puisque plusieurs familles de gènes déjà identifiées comme participant au vieillissement (Landis *et al.*, 2004; Girardot *et al.*, 2006; Monnier *et al.*, 2012) sont retrouvées dérégulées par rapport à la lignée contrôle. Par exemple, des gènes dérégulés de manière commune aux trois contextes DM1 à 5 semaines et impliqués dans la réponse de défense ou réponse au stress (« defense/stress response ») sont surexprimés comme *Diedel*, *TotM*, *TotC* ou *CG15068*. De même, les voies de l'autophagie et de la protéolyse sont activées alors que les gènes codant pour des protéines mitochondriales comme des gènes de la famille *Tim17* sont dérégulés négativement à 1 et 5 semaines.

Par la suite, nous avons réalisé des analyses comparatives entre les modèles DM1 afin d'identifier des gènes candidats dérégulés spécifiquement dans une ou deux conditions et qui pourraient être responsables, de la cardiomyopathie dilatée, de la fibrillation ou des défauts de conduction. Pour cela, nous avons comparé deux à deux, différents jeux de données : les listes *Hand>MblRNAi* à 1 et 5 semaines pour la cardiomyopathie dilatée, *Hand>Bru3* et *Hand>DM1<sub>960</sub>* à 5 semaines pour la fibrillation ainsi que *Hand>MblRNAi* et *Hand>Bru3* à 1 semaine pour les défauts de conduction. Parmi les candidats les plus dérégulés et conservés chez l'Homme, nous avons ensuite analysé 2 à 3 candidats par liste en étudiant la physiologie cardiaque de ces candidats en contexte dérégulé similaire à celui observé dans les modèles DM1. Par exemple, le gène candidat *l(2)03659* présente une diminution d'expression en contexte *Hand>Bru3* et *Hand>DM1<sub>960</sub>* à 5 semaines, nous avons donc utilisé une lignée inductible ARNi pour diminuer son expression. L'étude de ces candidats a permis de valider l'implication de *l(2)03659* dans le maintien d'un rythme cardiaque normal puisque les mouches *Hand>l(2)03659 RNAi* développent une arythmie et de la fibrillation, comme attendu mais aussi d'identifier son rôle dans l'apparition des défauts de conduction. De même, lorsque *Stj* est dérégulé positivement (*Hand>Stj*), comme en contexte *Hand>MblRNAi* et *Hand>Bru3*, on observe une augmentation des défauts de conduction et une légère augmentation du nombre de mouches qui fibrillent à 1 semaine. Le rôle de ces gènes dans l'atteinte cardiaque des modèles DM1 devra être confirmé par la suite par des analyses de sauvetage (« Rescue ») qui consistent à restaurer un niveau normal du gène candidat en contexte pathologique afin de démontrer le rôle de ce gène dans le symptôme identifié. Pour



cela, des lignées « double » combinant le transgène DM1 et le transgène pour le sauvetage sont en cours de génération au laboratoire. Des analyses physiologiques seront répétées sur ces lignées. Pour les deux candidats validés *l(2)03659* et *Stj*, la stratégie est différente : *l(2)03659* sera surexprimé en contexte *Hand>Bru3* et *Hand>DM1<sub>960</sub>* alors que pour *Stj*, nous allons utiliser une lignée ARNi pour diminuer son expression en contexte *Hand>MblRNAi* et *Hand>Bru3*. En parallèle, nous allons poursuivre les analyses physiologiques pour certains gènes candidats pour lesquels nous avons travaillé sur un faible échantillon de mouches comme pour *iav* (cardiomyopathie dilatée) ou *syn1* (défauts de conduction). De même, la létalité de l'ARNi pour *inaD* (défauts de conduction) n'a pas permis d'identifier des défauts cardiaques. Cependant, les analyses préliminaires sur le mutant *inaD* semblent montrer une forte dégénérescence du cœur chez l'adulte dès 1 semaine et une désorganisation de sa structure. L'interaction d'*inaD* avec un gène codant pour un canal TRP, associé au transport du calcium, pourrait expliquer les défauts de conduction observés lorsque *inaD* est inhibé en contexte DM1. Cependant, son expression et sa fonction chez la drosophile ont été caractérisées dans l'œil et devront donc être confirmées dans le cœur.

Enfin, pour tous les candidats validés chez la drosophile, il faut envisager démontrer leur implication dans un autre modèle DM1 comme chez la souris par exemple ou sur des échantillons cellulaires de patients. Une analyse translationnelle pourrait permettre de décortiquer le lien entre la dérégulation d'un gène et l'apparition des symptômes cardiaques chez les patients.

Ces analyses transcriptomiques ont donc permis de mettre en évidence dans nos modèles DM1, une régulation transcriptionnelle dépendante de Mbl et Bru-3, les orthologues de MBNL1 et CELF1, respectivement. La présence d'une forte proportion de gènes codant pour des transcrits uniques parmi les candidats dérégulés démontre une régulation indépendante de l'épissage de ces deux facteurs. Cette observation déjà décrite dans notre modèle DM1 larvaire (Picchio *et al.*, 2013) est aussi supportée par une étude récente qui a montré une préférence de fixation de MBNL1 et CELF1 dans les région 3' NT de leurs cibles, permettant la régulation de la stabilité des transcrits (Wang *et al.*, 2015). Ce modèle décrit un effet stabilisateur de la fixation de MBNL1 sur ces cibles, permettant leur traduction alors que la fixation de CELF1 conduirait à une déstabilisation des transcrits par la déadénylation. Cependant, des observations récentes dans notre équipe semblent indiquer que Bru-3, l'orthologue de CELF1 aurait un rôle dans le transport et l'entrée en traduction de certaines de





ses cibles et notamment de transcrits codant pour des protéines sarcomériques (L. Picchio, K. Jagla).

A ce jour, les données de séquençage sur ces modèles n'ont été exploitées que pour le côté transcriptionnel des ARNs codants. Cependant, l'intérêt du séquençage est de pouvoir s'intéresser aux données d'épissage alternatif et aux ARNs non codants. Les analyses sont donc en cours au laboratoire pour tenter d'identifier notamment de nouveaux défauts d'épissage qui pourraient être responsables des symptômes cardiaques. De plus, l'accès aux données de séquençage des patients DM1 (E. Wang) pourrait nous permettre d'identifier des défauts d'épissage communs à l'Homme et à nos modèles DM1 et d'envisager relier ces défauts à un symptôme cardiaque précis. Récemment, l'épissage aberrant dans le cœur des patients DM1 du canal sodique SCN5A a montré son implication dans les défauts de conduction et d'arythmie, épissage régulé par MBNL1 (Freyermuth *et al.*, 2016). Il serait donc intéressant d'identifier de nouveaux défauts d'épissage qui pourraient participer aux défauts de structure du cœur par exemple, peu étudiés.

Enfin, l'étude d'une lignée surexprimant la protéine humaine CELF1 a permis de mettre en évidence son rôle dans les phénotypes contractiles et en particulier dans l'apparition de la cardiomyopathie dilatée, symptôme retrouvé chez les patients DM1 (Gunkel *et al.*, 2000; Schara et Schoser, 2006). Les phénotypes cardiaques des mouches *Hand>hCELF1*, principalement l'augmentation des diamètres de contraction et de relaxation, associée à une diminution de la fraction de raccourcissement sont aussi retrouvés dans les modèles *Hand>MblRNAi* et *Hand>Bru3*. De plus, ces phénotypes sont semblables à ceux observés dans un modèle murin de surexpression de CELF1 chez la souris, qui cause notamment une diminution de l'espérance de vie et une cardiomyopathie dilatée (Koshelev *et al.*, 2010). Ce modèle pourrait donc nous permettre d'étudier les conséquences d'une surexpression de la protéine humaine CELF1 sur les défauts d'épissage et/ou sur la régulation de la stabilité des transcrits et il serait intéressant d'analyser la concordance de ces défauts entre la surexpression de la protéine humaine et de son orthologue Bru-3.



# **Conclusion**



Ces travaux de thèse réalisés sur un modèle de drosophile de la DM1 ont permis d'étudier les bases moléculaires des phénotypes musculaires et cardiaques, les symptômes les plus invalidants de la pathologie.

Pour cela, j'ai utilisé le modèle DM1 développé par L. Picchio dans notre équipe (Picchio *et al.*, 2013) qui reproduit les principales caractéristiques de la maladie : la formation de foci dans les noyaux des muscles, une hypercontractilité similaire à la myotonie observée chez les patients mais aussi des dérégulations transcriptionnelles indépendantes de l'épissage. De plus, il a permis d'observer un effet sur la dérégulation transcriptionnelle, dépendant du nombre de répétitions CTG, ce qui confirme une corrélation entre le nombre de répétitions CTG et la sévérité des phénotypes musculaires observés. L'analyse translationnelle de gènes candidats identifiés dans notre modèle, sur des cellules issus de patients DM1 suggère une conservation de la dérégulation de *Gbe1*, codant pour une enzyme de branchement du glycogène, qui pourrait participer aux phénotypes musculaires. Une analyse fonctionnelle sur des larves atténuées pour ce gène pourrait permettre de valider son rôle dans les défauts musculaire, observés dans notre modèle.

En parallèle, je me suis intéressée aux défauts cardiaques dans ce modèle DM1. Ils représentent la seconde cause de mortalité chez les patients mais au début de ce projet, peu de modèles ou d'études à grande échelle existaient. Nous avons donc exprimé les 960 répétitions CTG dans le cœur (*Hand>DMI<sub>960</sub>*) et avons analysé en parallèle les effets de l'atténuation de *Mbl* (*Hand>MblRNAi*) et de la surexpression de Bru-3 (*Hand>Bru-3*), les orthologues de MBNL1 et CELF1, respectivement. Ces trois modèles reproduisent les symptômes majeurs identifiés chez les patients, tels qu'une arythmie (fibrillation), des défauts de conduction ou encore des défauts de structure (cardiomyopathie dilatée). Des analyses transcriptomiques sur ces modèles nous ont permis de mettre en évidence le rôle de *l(2)03659* et de *Stj*, orthologues respectifs de *ABCC9* (sous-unité régulatrice du canal potassique KATP) et de *CACNA2D4* (composant du canal calcique voltage-dépendant), dans l'apparition de la fibrillation et des défauts de conduction. Les perspectives à court terme de ce travail sont de valider l'implication de ces composants en réalisant des expériences de sauvetage pour restaurer un niveau normal de ces transcrits dans le cœur des modèles DM1 et atténuer les phénotypes observés. Il faudra aussi valider l'implication de ces candidats dans un modèle DM1 vertébré et chez les patients.



# Références bibliographiques





- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., *et al.* (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*, *Science (New York, N.Y.)*, 287 (5461), pp. 2185–2195.
- Alex, A., Li, A., Tanzi, R. E. and Zhou, C. (2015) Optogenetic pacing in *Drosophila melanogaster*, *Science Advances*, 1 (9), pp. e1500639. DOI:10.1126/sciadv.1500639.
- Alwazzan, M., Newman, E., Hamshere, M. G. and Brook, J. D. (1999) Myotonic Dystrophy Is Associated with a Reduced Level of RNA from the DMWD Allele Adjacent to the Expanded Repeat, *Human Molecular Genetics*, 8 (8), pp. 1491–1497. DOI:10.1093/hmg/8.8.1491.
- Amack, J. D., Reagan, S. R. and Mahadevan, M. S. (2002) Mutant DMPK 3'-UTR transcripts disrupt C2C12 myogenic differentiation by compromising MyoD, *The Journal of Cell Biology*, 159 (3), pp. 419–429. DOI:10.1083/jcb.200206020.
- Amaral, P. P., Dinger, M. E. and Mattick, J. S. (2013) Non-coding RNAs in homeostasis, disease and stress responses: an evolutionary perspective, *Briefings in Functional Genomics*, 12 (3), pp. 254–278. DOI:10.1093/bfpg/elt016.
- Amiel, J., Raclin, V., Jouannic, J.-M., Morichon, N., Hoffman-Radvanyi, H., Dommergues, M., *et al.* (2001) Trinucleotide repeat contraction: a pitfall in prenatal diagnosis of myotonic dystrophy, *Journal of Medical Genetics*, 38 (12), pp. 850–852. DOI:10.1136/jmg.38.12.850.
- Amin Ghabrial, Stefan Luschnig, \*, Mark M. Metzstein, \* and Krasnow, and M. A. (2003) Branching Morphogenesis of the *Drosophila* Tracheal System, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 19 (1), pp. 623–647. DOI:10.1146/annurev.cellbio.19.031403.160043.
- Andersen, G., Ørngreen, M. C., Preisler, N., Colding-Jørgensen, E., Clausen, T., Duno, M., *et al.* (2013) Muscle phenotype in patients with myotonic dystrophy type 1: Muscle Phenotype in DM1, *Muscle & Nerve*, 47 (3), pp. 409–415. DOI:10.1002/mus.23535.
- Anvret, M., Ahlberg, G., Grandell, U., Hedberg, B., Johnson, K. and Edström, L. (1993) Larger expansions of the CTG repeat in muscle compared to lymphocytes from patients with myotonic dystrophy, *Human Molecular Genetics*, 2 (9), pp. 1397–1400. DOI:10.1093/hmg/2.9.1397.
- Aring, E., Ekström, A.-B., Tulinius, M. and Sjöström, A. (2012) Ocular motor function in relation to gross motor function in congenital and childhood myotonic dystrophy type 1, *Acta Ophthalmologica*, 90 (4), pp. 369–374. DOI:10.1111/j.1755-3768.2010.01956.x.
- Artero, R., Prokop, A., Paricio, N., Begemann, G., Pueyo, I., Mlodzik, M., *et al.* (1998) The muscleblind gene participates in the organization of Z-bands and epidermal attachments of *Drosophila* muscles and is regulated by Dmef2, *Developmental Biology*, 195 (2), pp. 131–143. DOI:10.1006/dbio.1997.8833.
- Ashizawa, T., Anvret, M., Baiget, M., Barcelo, J. M., Brunner, H., Cobo, A. M., *et al.* (1994) Characteristics of intergenerational contractions of the CTG repeat in myotonic dystrophy, *American Journal of Human Genetics*, 54 (3), pp. 414.
- Aslanidis (1992) Cloning of the essential myotonic dystrophy region and mapping of the putative defect. <http://www.nature.com/gate1.inist.fr/nature/journal/v355/n6360/abs/355548a0.html>.
- Azpiazu, N. and Frasch, M. (1993) tinman and bagpipe: two homeo box genes that determine cell fates in the dorsal mesoderm of *Drosophila*, *Genes Dev*, 7 (7B), pp. 1325–40.
- Azpiazu, N., Lawrence, P. A., Vincent, J. P. and Frasch, M. (1996) Segmentation and specification of the *Drosophila* mesoderm., *Genes & Development*, 10 (24), pp. 3183–3194.

- Bachinski, L. L., Udd, B., Meola, G., Sansone, V., Bassez, G., Eymard, B., *et al.* (2003) Confirmation of the type 2 myotonic dystrophy (CCTG)<sub>n</sub> expansion mutation in patients with proximal myotonic myopathy/proximal myotonic dystrophy of different European origins: a single shared haplotype indicates an ancestral founder effect, *American Journal of Human Genetics*, 73 (4), pp. 835–848. DOI:10.1086/378566.
- Bargiela, A., Cerro-Herreros, E., Fernandez-Costa, J. M., Vilchez, J. J., Llamusi, B. and Artero, R. (2015) Increased autophagy and apoptosis contribute to muscle atrophy in a myotonic dystrophy type 1 Drosophila model, *Disease Models & Mechanisms*, 8 (7), pp. 679–690. DOI:10.1242/dmm.018127.
- Barreau, C., Paillard, L., Méreau, A. and Osborne, H. B. (2006) Mammalian CELF/Bruno-like RNA-binding proteins: molecular characteristics and biological functions, *Biochimie*, 88 (5), pp. 515–525. DOI:10.1016/j.biochi.2005.10.011.
- Bataillé, L., Delon, I., Da Ponte, J. P., Brown, N. H. and Jagla, K. (2010) Downstream of Identity Genes: Muscle-Type-Specific Regulation of the Fusion Process, *Developmental Cell*, 19 (2), pp. 317–328. DOI:10.1016/j.devcel.2010.07.008.
- Bate, M. (1990) The embryonic development of larval muscles in Drosophila, *Development (Cambridge, England)*, 110 (3), pp. 791–804.
- Bate, M. and Rushton, E. (1993) Myogenesis and muscle patterning in Drosophila, *Comptes Rendus de l'Académie Des Sciences. Série III, Sciences de La Vie*, 316 (9), pp. 1047–1061.
- Batra, R., Charizanis, K., Manchanda, M., Mohan, A., Li, M., Finn, D. J., *et al.* (2014) Loss of MBNL Leads to Disruption of Developmentally Regulated Alternative Polyadenylation in RNA-Mediated Disease, *Molecular Cell*, 56 (2), pp. 311–322. DOI:10.1016/j.molcel.2014.08.027.
- Batra, R., Manchanda, M. and Swanson, M. S. (2015) Global insights into alternative polyadenylation regulation, *RNA Biology*, 12 (6), pp. 597–602. DOI:10.1080/15476286.2015.1040974.
- Baylies, M. K. and Bate, M. (1996) twist: a myogenic switch in Drosophila, *Science (New York, N.Y.)*, 272 (5267), pp. 1481–1484.
- Baylies, M. K., Bate, M. and Gomez, M. R. (1998) Myogenesis: a view from Drosophila, *Cell*, 93 (6), pp. 921–927.
- Beffy, P., Del Carratore, R., Masini, M., Furling, D., Puymirat, J., Masiello, P., *et al.* (2010) Altered signal transduction pathways and induction of autophagy in human myotonic dystrophy type 1 myoblasts, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42 (12), pp. 1973–1983. DOI:10.1016/j.biocel.2010.08.010.
- Begemann, G., Paricio, N., Artero, R., Kiss, I., Pérez-Alonso, M. and Mlodzik, M. (1997) muscleblind, a gene required for photoreceptor differentiation in Drosophila, encodes novel nuclear Cys3His-type zinc-finger-containing proteins, *Development*, 124 (21), pp. 4321–4331.
- Beisang, D., R., P. and Vlasova-St. Louis, I. A. (2012) CELF1, a Multifunctional Regulator of Posttranscriptional Networks, in: Abdelmohsen, K. (ed.) *Binding Protein*. InTech,
- Belfiore, A., Frasca, F., Pandini, G., Sciacca, L. and Vigneri, R. (2009) Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease, *Endocrine Reviews*, 30 (6), pp. 586–623. DOI:10.1210/er.2008-0047.
- Bellosta, P. and Gallant, P. (2010) Myc Function in Drosophila, *Genes & Cancer*, 1 (6), pp. 542–546. DOI:10.1177/1947601910377490.
- Benson, D. W. (2004) Genetics of atrioventricular conduction disease in humans, *The Anatomical*

- Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 280A (2), pp. 934–939. DOI:10.1002/ar.a.20099.
- Bentzinger, C. F., Wang, Y. X. and Rudnicki, M. A. (2012) Building Muscle: Molecular Regulation of Myogenesis, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4 (2), pp. a008342. DOI:10.1101/cshperspect.a008342.
- Berul, C. I., Maguire, C. T., Aronovitz, M. J., Greenwood, J., Miller, C., Gehrman, J., *et al.* (1999) DMPK dosage alterations result in atrioventricular conduction abnormalities in a mouse myotonic dystrophy model, *Journal of Clinical Investigation*, 103 (4), pp. R1–R7.
- Berul, C. I., Maguire, C. T., Gehrman, J. and Reddy, S. (2000) Progressive atrioventricular conduction block in a mouse myotonic dystrophy model, *Journal of Interventional Cardiac Electrophysiology: An International Journal of Arrhythmias and Pacing*, 4 (2), pp. 351–358.
- Bhakta, D., Lowe, M. R. and Groh, W. J. (2004) Prevalence of structural cardiac abnormalities in patients with myotonic dystrophy type I, *American Heart Journal*, 147 (2), pp. 224–227. DOI:10.1016/j.ahj.2003.08.008.
- Bhakta, D., Shen, C., Kron, J., Epstein, A. E., Pascuzzi, R. M. and Groh, W. J. (2011) Pacemaker and implantable cardioverter-defibrillator use in a US myotonic dystrophy type 1 population, *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 22 (12), pp. 1369–1375. DOI:10.1111/j.1540-8167.2011.02200.x.
- Bier, E. and Bodmer, R. (2004) *Drosophila*, an emerging model for cardiac disease, *Gene*, 342 (1), pp. 1–11. DOI:10.1016/j.gene.2004.07.018.
- Birse, R. T., Choi, J., Reardon, K., Rodriguez, J., Graham, S., Diop, S., *et al.* (2010) High-fat-diet-induced obesity and heart dysfunction are regulated by the TOR pathway in *Drosophila*, *Cell Metabolism*, 12 (5), pp. 533–544. DOI:10.1016/j.cmet.2010.09.014.
- Bodmer, R., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1990) A new homeobox-containing gene, *msh-2*, is transiently expressed early during mesoderm formation of *Drosophila*, *Development*, 110 (3), pp. 661–669.
- Bodmer, R. (1993) The gene *tinman* is required for specification of the heart and visceral muscles in *Drosophila*, *Development (Cambridge, England)*, 118 (3), pp. 719–729.
- Bodmer, R. (1995) Heart development in *Drosophila* and its relationship to vertebrates, *Trends in Cardiovascular Medicine*, 5 (1), pp. 21–28. DOI:10.1016/1050-1738(94)00032-Q.
- Bodmer, R. and Venkatesh, T. V. (1998) Heart development in *Drosophila* and vertebrates: conservation of molecular mechanisms, *Developmental Genetics*, 22 (3), pp. 181–186. DOI:10.1002/(SICI)1520-6408(1998)22:3<181::AID-DVG1>3.0.CO;2-2.
- Bondy-Chorney, E., Crawford Parks, T. E., Ravel-Chapuis, A., Klinck, R., Rocheleau, L., Pelchat, M., *et al.* (2016) *Staufen1* Regulates Multiple Alternative Splicing Events either Positively or Negatively in DM1 Indicating Its Role as a Disease Modifier, *PLoS Genetics*, 12 (1), pp. e1005827. DOI:10.1371/journal.pgen.1005827.
- Bosma, J. F. and Brodie, D. R. (1969) Cineradiographic demonstration of pharyngeal area myotonia in myotonic dystrophy patients, *Radiology*, 92 (1), pp. 104–109 passim. DOI:10.1148/92.1.104.
- Boucher, C. A., King, S. K., Carey, N., Krahe, R., Winchester, C. L., Rahman, S., *et al.* (1995) A novel homeodomain-encoding gene is associated with a large CpG island interrupted by the myotonic dystrophy unstable (CTG)<sub>n</sub> repeat, *Human Molecular Genetics*, 4 (10), pp. 1919–1925. DOI:10.1093/hmg/4.10.1919.
- Bour, B. A., O'Brien, M. A., Lockwood, W. L., Goldstein, E. S., Bodmer, R., Taghert, P. H., *et al.*

- (1995) Drosophila MEF2, a transcription factor that is essential for myogenesis., *Genes & Development*, 9 (6), pp. 730–741. DOI:10.1101/gad.9.6.730.
- Bowater, R. P., Jaworski, A., Larson, J. E., Parniewski, P. and Wells, R. D. (1997) Transcription increases the deletion frequency of long CTG.CAG triplet repeats from plasmids in Escherichia coli., *Nucleic Acids Research*, 25 (14), pp. 2861–2868.
- Braida, C., Stefanatos, R. K. A., Adam, B., Mahajan, N., Smeets, H. J. M., Niel, F., *et al.* (2010) Variant CCG and GGC repeats within the CTG expansion dramatically modify mutational dynamics and likely contribute toward unusual symptoms in some myotonic dystrophy type 1 patients, *Human Molecular Genetics*, 19 (8), pp. 1399–1412. DOI:10.1093/hmg/ddq015.
- Brand, A. H. and Perrimon, N. (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes, *Development (Cambridge, England)*, 118 (2), pp. 401–415.
- Braun, T., Bober, E., Buschhausen-Denker, G., Kohtz, S., Grzeschik, K. H., Arnold, H. H., *et al.* (1989) Differential expression of myogenic determination genes in muscle cells: possible autoactivation by the Myf gene products, *The EMBO Journal*, 8 (12), pp. 3617–3625.
- Breton, R. and Mathieu, J. (2009) Usefulness of clinical and electrocardiographic data for predicting adverse cardiac events in patients with myotonic dystrophy, *The Canadian Journal of Cardiology*, 25 (2), pp. e23–e27.
- Broek, W. J. A. A. van den, Nelen, M. R., Wansink, D. G., Coerwinkel, M. M., Riele, H. te, Groenen, P. J. T. A., *et al.* (2002) Somatic expansion behaviour of the (CTG)<sub>n</sub> repeat in myotonic dystrophy knock-in mice is differentially affected by Msh3 and Msh6 mismatch–repair proteins, *Human Molecular Genetics*, 11 (2), pp. 191–198. DOI:10.1093/hmg/11.2.191.
- Brohmann, H., Jagla, K. and Birchmeier, C. (2000) The role of Lbx1 in migration of muscle precursor cells, *Development (Cambridge, England)*, 127 (2), pp. 437–445.
- Brook, J. D., McCurrach, M. E., Harley, H. G., Buckler, A. J., Church, D., Aburatani, H., *et al.* (1992) Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member, *Cell*, 69 (2), pp. 385.
- Brouwer, J. R., Huguet, A., Nicole, A., Munnich, A. and Gourdon, G. (2013) Transcriptionally Repressive Chromatin Remodelling and CpG Methylation in the Presence of Expanded CTG-Repeats at the DM1 Locus, *Journal of Nucleic Acids*, 2013, pp. 1–16. DOI:10.1155/2013/567435.
- Brunner, H. G., Brüggewirth, H. T., Nillesen, W., Jansen, G., Hamel, B. C. J., Hoppe, R. L. E., *et al.* (1993) Influence of sex of the transmitting parent as well as of parental allele site on the CTG expansion in myotonic dystrophy (DM), *American Journal of Human Genetics*, 53 (5), pp. 1016–1023.
- Bryantsev, A. L. and Cripps, R. M. (2009) Cardiac gene regulatory networks in Drosophila, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1789 (4), pp. 343–353. DOI:10.1016/j.bbagr.2008.09.002.
- Bullock, R. T., Davis, J. L. and Hara, M. (1967) Dystrophia myotonica with heart block. A light and electron microscopic study, *Archives of Pathology*, 84 (2), pp. 130–140.
- Buxton, J., Shelbourne, P., Davies, J., Jones, C., Tongeren, T. V., Aslanidis, C., *et al.* (1992) Detection of an unstable fragment of DNA specific to individuals with myotonic dystrophy, *Nature*, 355 (6360), pp. 547–548. DOI:10.1038/355547a0.
- Cass, D., Hotchko, R., Barber, P., Jones, K., Gates, D. P. and Berglund, J. A. (2011) The four Zn fingers of MBNL1 provide a flexible platform for recognition of its RNA binding elements, *BMC*

*Molecular Biology*, 12, pp. 20. DOI:10.1186/1471-2199-12-20.

Castel, A. L., Cleary, J. D. and Pearson, C. E. (2010a) Repeat instability as the basis for human diseases and as a potential target for therapy, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11 (3), pp. 165–170. DOI:10.1038/nrm2854.

Castel, A. L., Nakamori, M., Tomé, S., Chitayat, D., Gourdon, G., Thornton, C. A., *et al.* (2010b) Expanded CTG repeat demarcates a boundary for abnormal CpG methylation in myotonic dystrophy patient tissues, *Human Molecular Genetics*, pp. ddq427. DOI:10.1093/hmg/ddq427.

Chakraborty, M., Selma-Soriano, E., Magny, E., Couso, J. P., Pérez-Alonso, M., Charlet-Berguerand, N., *et al.* (2015) Pentamidine rescues contractility and rhythmicity in a Drosophila model of myotonic dystrophy heart dysfunction, *Disease Models and Mechanisms*, pp. dmm.021428. DOI:10.1242/dmm.021428.

Charizanis, K., Lee, K.-Y., Batra, R., Goodwin, M., Zhang, C., Yuan, Y., *et al.* (2012) Muscleblind-Like 2 Mediated Alternative Splicing in the Developing Brain and Dysregulation in Myotonic Dystrophy, *Neuron*, 75 (3), pp. 437–450. DOI:10.1016/j.neuron.2012.05.029.

Charlet-B, N., Savkur, R. S., Singh, G., Philips, A. V., Grice, E. A. and Cooper, T. A. (2002) Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing, *Molecular Cell*, 10 (1), pp. 45–53.

Chen, K.-Y., Pan, H., Lin, M.-J., Li, Y.-Y., Wang, L.-C., Wu, Y.-C., *et al.* (2007) Length-dependent toxicity of untranslated CUG repeats on *Caenorhabditis elegans*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 352 (3), pp. 774–779. DOI:10.1016/j.bbrc.2006.11.102.

Chen, C.-Y. A. and Shyu, A.-B. (2011) Mechanisms of deadenylation-dependent decay, *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 2 (2), pp. 167–183. DOI:10.1002/wrna.40.

Chen, L., Liu, Z., Zhou, B., Wei, C., Zhou, Y., Rosenfeld, M. G., *et al.* (2016) CELF RNA binding proteins promote axon regeneration in *C. elegans* and mammals through alternative splicing of Syntaxins, *eLife*, 5, pp. e16072.

Chi, L. M. and Lam, S. L. (2005) Structural roles of CTG repeats in slippage expansion during DNA replication, *Nucleic Acids Research*, 33 (5), pp. 1604–1617. DOI:10.1093/nar/gki307.

Chinwalla, A. T., Cook, L. L., Delehaunty, K. D., Fewell, G. A., Fulton, L. A., Fulton, R. S., *et al.* (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome, *Nature*, 420 (6915), pp. 520–562. DOI:10.1038/nature01262.

Cho, D. H., Thienes, C. P., Mahoney, S. E., Analau, E., Filippova, G. N. and Tapscott, S. J. (2005a) Antisense Transcription and Heterochromatin at the DM1 CTG Repeats Are Constrained by CTCF, *Molecular Cell*, 20 (3), pp. 483–489. DOI:10.1016/j.molcel.2005.09.002.

Christoffels, V. M. and Moorman, A. F. M. (2009) Development of the Cardiac Conduction System Why Are Some Regions of the Heart More Arrhythmogenic Than Others?, *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, 2 (2), pp. 195–207. DOI:10.1161/CIRCEP.108.829341.

Cleary, J. D. and Ranum, L. P. W. (2014) Repeat associated non-ATG (RAN) translation: new starts in microsatellite expansion disorders, *Current Opinion in Genetics & Development*, 0, pp. 6–15. DOI:10.1016/j.gde.2014.03.002.

Cooper, T. A. and Ordahl, C. P. (1984) A single troponin T gene regulated by different programs in cardiac and skeletal muscle development, *Science (New York, N.Y.)*, 226 (4677), pp. 979–982.

Cooper, J. K. (1986) Electrocardiography 100 years ago. Origins, pioneers, and contributors, *The New*



- England Journal of Medicine*, 315 (7), pp. 461–464. DOI:10.1056/NEJM198608143150721.
- Cripps, R. M. and Olson, E. N. (2002) Control of cardiac development by an evolutionarily conserved transcriptional network, *Developmental Biology*, 246 (1), pp. 14–28. DOI:10.1006/dbio.2002.0666.
- Crowther, D. C., Kinghorn, K. J., Page, R. and Lomas, D. A. (2004) Therapeutic targets from a *Drosophila* model of Alzheimer’s disease, *Current Opinion in Pharmacology*, 4 (5), pp. 513–516. DOI:10.1016/j.coph.2004.07.001.
- Cudia, P., Bernasconi, P., Chiodelli, R., Mangiola, F., Bellocchi, F., Dello Russo, A., *et al.* (2009) Risk of arrhythmia in type I myotonic dystrophy: the role of clinical and genetic variables, *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 80 (7), pp. 790–793. DOI:10.1136/jnnp.2008.162594.
- Cummings, C. J. and Zoghbi, H. Y. (2000) Fourteen and counting: unraveling trinucleotide repeat diseases, *Human Molecular Genetics*, 9 (6), pp. 909–916. DOI:10.1093/hmg/9.6.909.
- Curtis, N. J., Ringo, J. M. and Dowse, H. B. (1999) Morphology of the pupal heart, adult heart, and associated tissues in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*, *Journal of Morphology*, 240 (3), pp. 225–235. DOI:10.1002/(SICI)1097-4687(199906)240:3<225::AID-JMOR2>3.0.CO;2-V.
- Dansithong, W., Paul, S., Comai, L. and Reddy, S. (2005) MBNL1 Is the Primary Determinant of Focus Formation and Aberrant Insulin Receptor Splicing in DM1, *Journal of Biological Chemistry*, 280 (7), pp. 5773–5780. DOI:10.1074/jbc.M410781200.
- Dansithong, W., Jog, S. P., Paul, S., Mohammadzadeh, R., Tring, S., Kwok, Y., *et al.* (2011) RNA steady-state defects in myotonic dystrophy are linked to nuclear exclusion of SHARP, *EMBO Reports*, 12 (7), pp. 735–742. DOI:10.1038/embor.2011.86.
- Davis, B. M., McCurrach, M. E., Taneja, K. L., Singer, R. H. and Housman, D. E. (1997) Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3’ untranslated region of myotonic dystrophy protein kinase transcripts results in nuclear retention of transcripts, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 (14), pp. 7388–7393.
- Day, J. W., Roelofs, R., Leroy, B., Pech, I., Benzow, K. and Ranum, L. P. (1999) Clinical and genetic characteristics of a five-generation family with a novel form of myotonic dystrophy (DM2), *Neuromuscular Disorders: NMD*, 9 (1), pp. 19–27.
- Day, J. W., Ricker, K., Jacobsen, J. F., Rasmussen, L. J., Dick, K. A., Kress, W., *et al.* (2003) Myotonic dystrophy type 2: molecular, diagnostic and clinical spectrum, *Neurology*, 60 (4), pp. 657–664.
- Day, J. W. and Ranum, L. P. W. (2005) Genetics and molecular pathogenesis of the myotonic dystrophies, *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 5 (1), pp. 55–59.
- de Die-Smulders, C. E., Höweler, C. J., Thijs, C., Mirandolle, J. F., Anten, H. B., Smeets, H. J., *et al.* (1998) Age and causes of death in adult-onset myotonic dystrophy., *Brain*, 121 (8), pp. 1557–1563.
- de Haro, M., Al-Ramahi, I., De Gouyon, B., Ukani, L., Rosa, A., Faustino, N. A., *et al.* (2006) MBNL1 and CUGBP1 modify expanded CUG-induced toxicity in a *Drosophila* model of myotonic dystrophy type 1, *Human Molecular Genetics*, 15 (13), pp. 2138–2145. DOI:10.1093/hmg/ddl137.
- Delaunay, J. (2004) The *Drosophila* Bruno paralogue Bru-3 specifically binds the EDEN translational repression element, *Nucleic Acids Research*, 32 (10), pp. 3070–3082. DOI:10.1093/nar/gkh627.
- deLorimier, E., Coonrod, L. A., Copperman, J., Taber, A., Reister, E. E., Sharma, K., *et al.* (2014) Modifications to toxic CUG RNAs induce structural stability, rescue mis-splicing in a myotonic dystrophy cell model and reduce toxicity in a myotonic dystrophy zebrafish model, *Nucleic Acids*

- Research*, 42 (20), pp. 12768–12778. DOI:10.1093/nar/gku941.
- Dietrich, S., Schubert, F. R., Healy, C., Sharpe, P. T. and Lumsden, A. (1998) Specification of the hypaxial musculature, *Development*, 125 (12), pp. 2235–2249.
- Dion, V. and Wilson, J. H. (2009) Instability and Chromatin Structure of Expanded Trinucleotide Repeats, *Trends in Genetics : TIG*, 25 (7), pp. 288–297. DOI:10.1016/j.tig.2009.04.007.
- Dixon, D. M., Choi, J., El-Ghazali, A., Park, S. Y., Roos, K. P., Jordan, M. C., *et al.* (2015) Loss of muscleblind-like 1 results in cardiac pathology and persistence of embryonic splice isoforms, *Scientific Reports*, 5, pp. 9042. DOI:10.1038/srep09042.
- Duffy, J. B. (2002) GAL4 system in *Drosophila*: A fly geneticist's swiss army knife, *Genesis*, 34 (1–2), pp. 1–15. DOI:10.1002/gene.10150.
- Dulcis, D. and Levine, R. B. (2003) Innervation of the heart of the adult fruit fly, *Drosophila melanogaster*, *The Journal of Comparative Neurology*, 465 (4), pp. 560–578. DOI:10.1002/cne.10869.
- Dulcis, D., Levine, R. B. and Ewer, J. (2005) Role of the neuropeptide CCAP in *Drosophila* cardiac function, *Journal of Neurobiology*, 64 (3), pp. 259–274. DOI:10.1002/neu.20136.
- Dunne, P. W., Ma, L., Casey, D. L. and Epstein, H. F. (1996) Myotonic protein kinase expression in human and bovine lenses, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 225 (1), pp. 281–288. DOI:10.1006/bbrc.1996.1167.
- Dyken, P. R. and Harper, P. S. (1973) Congenital dystrophia myotonica, *Neurology*, 23 (5), pp. 465–473.
- Ebralidze, A. (2004) RNA Leaching of Transcription Factors Disrupts Transcription in Myotonic Dystrophy, *Science*, 303 (5656), pp. 383–387. DOI:10.1126/science.1088679.
- Ekström, A.-B., Hakenäs-Plate, L., Tulinius, M. and Wentz, E. (2009) Cognition and adaptive skills in myotonic dystrophy type 1: a study of 55 individuals with congenital and childhood forms, *Developmental Medicine and Child Neurology*, 51 (12), pp. 982–990. DOI:10.1111/j.1469-8749.2009.03300.x.
- Eriksson, M., Hedberg, B., Carey, N. and Ansved, T. (2001) Decreased DMPK Transcript Levels in Myotonic Dystrophy 1 Type IIA Muscle Fibers, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 286 (5), pp. 1177–1182. DOI:10.1006/bbrc.2001.5516.
- Erriquez, D., Perini, G. and Ferlini, A. (2013) Non-Coding RNAs in Muscle Dystrophies, *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (10), pp. 19681–19704. DOI:10.3390/ijms141019681.
- Ezkurdia, I., Juan, D., Rodriguez, J. M., Frankish, A., Diekhans, M., Harrow, J., *et al.* (2014) Multiple evidence strands suggest that there may be as few as 19 000 human protein-coding genes, *Human Molecular Genetics*, pp. ddu309. DOI:10.1093/hmg/ddu309.
- Fan, H.-C., Ho, L.-I., Chi, C.-S., Chen, S.-J., Peng, G.-S., Chan, T.-M., *et al.* (2014) Polyglutamine (PolyQ) Diseases: Genetics to Treatments, *Cell Transplantation*, 23 (4), pp. 441–458. DOI:10.3727/096368914X678454.
- Fardaei, M., Larkin, K., Brook, J. D. and Hamshere, M. G. (2001) In vivo co-localisation of MBNL protein with DMPK expanded-repeat transcripts, *Nucleic Acids Research*, 29 (13), pp. 2766–2771. DOI:10.1093/nar/29.13.2766.
- Fardaei, M., Rogers, M. T., Thorpe, H. M., Larkin, K., Hamshere, M. G., Harper, P. S., *et al.* (2002)



- Three proteins, MBNL, MBLL and MBXL, co-localize in vivo with nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells, *Human Molecular Genetics*, 11 (7), pp. 805–814. DOI:10.1093/hmg/11.7.805.
- Fernandez-Costa, J. M., Llamusi, M. B., Garcia-Lopez, A. and Artero, R. (2011) Alternative splicing regulation by Muscleblind proteins: from development to disease, *Biological Reviews*, 86 (4), pp. 947–958. DOI:10.1111/j.1469-185X.2011.00180.
- Fernandez-Costa, J. M., Garcia-Lopez, A., Zuniga, S., Fernandez-Pedrosa, V., Felipe-Benavent, A., Mata, M., *et al.* (2013) Expanded CTG repeats trigger miRNA alterations in *Drosophila* that are conserved in myotonic dystrophy type 1 patients, *Human Molecular Genetics*, 22 (4), pp. 704–716. DOI:10.1093/hmg/dds478.
- Figeac, N., Daczewska, M., Marcelle, C. and Jagla, K. (2007) Muscle stem cells and model systems for their investigation, *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 236 (12), pp. 3332–3342. DOI:10.1002/dvdy.21345.
- Fink, M., Callol-Massot, C., Chu, A., Ruiz-Lozano, P., Belmonte, J., Giles, W., *et al.* (2009) A new method for detection and quantification of heartbeat parameters in *Drosophila*, zebrafish, and embryonic mouse hearts, *BioTechniques*, 46 (2), pp. 101–113. DOI:10.2144/000113078.
- Foiry, L., Dong, L., Savouret, C., Hubert, L., Riele, H. te, Junien, C., *et al.* (2006) Msh3 is a limiting factor in the formation of intergenerational CTG expansions in DM1 transgenic mice, *Human Genetics*, 119 (5), pp. 520–526. DOI:10.1007/s00439-006-0164-7.
- Franzini-Armstrong, C. (1999) The sarcoplasmic reticulum and the control of muscle contraction, *The FASEB Journal*, 13 (9002), pp. s266-S270.
- Freyermuth, F., Rau, F., Kokunai, Y., Linke, T., Sellier, C., Nakamori, M., *et al.* (2016) Splicing misregulation of SCN5A contributes to cardiac-conduction delay and heart arrhythmia in myotonic dystrophy, *Nature Communications*, 7, pp. 11067. DOI:10.1038/ncomms11067.
- Friedman, R. and Hughes, A. L. (2001) Pattern and Timing of Gene Duplication in Animal Genomes, *Genome Research*, 11 (11), pp. 1842–1847. DOI:10.1101/gr.200601.
- Fu, Y. H., Friedman, D. L., Richards, S., Pearlman, J. A., Gibbs, R. A., Pizzuti, A., *et al.* (1993) Decreased expression of myotonin-protein kinase messenger RNA and protein in adult form of myotonic dystrophy, *Science*, 260 (5105), pp. 235–238. DOI:10.1126/science.8469976.
- Fugier, C., Klein, A. F., Hammer, C., Vassilopoulos, S., Ivarsson, Y., Toussaint, A., *et al.* (2011) Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy, *Nature Medicine*, 17 (6), pp. 720–725. DOI:10.1038/nm.2374.
- Furling, D., Lemieux, D., Taneja, K. and Puymirat, J. (2001a) Decreased levels of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) and delayed differentiation in human myotonic dystrophy myoblasts, *Neuromuscular Disorders*, 11 (8), pp. 728–735. DOI:10.1016/S0960-8966(01)00226-7.
- Furling, D., Coiffier, L., Mouly, V., Barbet, J. P., Guily, J. L. S., Taneja, K., *et al.* (2001b) Defective satellite cells in congenital myotonic dystrophy, *Human Molecular Genetics*, 10 (19), pp. 2079–2087. DOI:10.1093/hmg/10.19.2079.
- Furling, D. (2012) Misregulation of alternative splicing and microRNA processing in DM1 pathogenesis, *Rinshō Shinkeigaku = Clinical Neurology*, 52 (11), pp. 1018–1022.
- Fürst, D. O. and Gautel, M. (1995) The anatomy of a molecular giant: how the sarcomere cytoskeleton is assembled from immunoglobulin superfamily molecules, *Journal of Molecular and Cellular*

*Cardiology*, 27 (4), pp. 951–959.

Gacy, A. M., Goellner, G., Juranić, N., Macura, S. and McMurray, C. T. (1995) Trinucleotide repeats that expand in human disease form hairpin structures in vitro, *Cell*, 81 (4), pp. 533–540.

Gaj, T., Gersbach, C. A. and Barbas, C. F. (2013) ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering, *Trends in Biotechnology*, 31 (7), pp. 397–405.

Gambardella, S., Rinaldi, F., Lepore, S. M., Viola, A., Loro, E., Angelini, C., *et al.* (2010) Overexpression of microRNA-206 in the skeletal muscle from myotonic dystrophy type 1 patients, *Journal of Translational Medicine*, 8, pp. 48. DOI:10.1186/1479-5876-8-48.

Garcia, S. M. D. A., Tabach, Y., Lourenço, G. F., Armakola, M. and Ruvkun, G. (2014) Identification of genes in trinucleotide repeat RNA toxicity pathways in *C. elegans*, *Nature Structural & Molecular Biology*, 21 (8), pp. 712–720. DOI:10.1038/nsmb.2858.

Garcia-Lopez, A., Monferrer, L., Garcia-Alcover, I., Vicente-Crespo, M., Alvarez-Abril, M. C. and Artero, R. D. (2008) Genetic and Chemical Modifiers of a CUG Toxicity Model in *Drosophila*, *PLoS ONE*, 3 (2), pp. e1595. DOI:10.1371/journal.pone.0001595.

García-López, A., Llamusi, B., Orzáez, M., Pérez-Payá, E. and Artero, R. D. (2011) In vivo discovery of a peptide that prevents CUG–RNA hairpin formation and reverses RNA toxicity in myotonic dystrophy models, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (29), pp. 11866–11871. DOI:10.1073/pnas.1018213108.

Gautel, M. and Djinović-Carugo, K. (2016) The sarcomeric cytoskeleton: from molecules to motion, *Journal of Experimental Biology*, 219 (2), pp. 135–145. DOI:10.1242/jeb.124941.

Gauthier, M., Marteyn, A., Denis, J. A., Cailleret, M., Giraud-Triboult, K., Aubert, S., *et al.* (2013) A defective Krab-domain zinc-finger transcription factor contributes to altered myogenesis in myotonic dystrophy type 1, *Human Molecular Genetics*, 22 (25), pp. 5188–5198. DOI:10.1093/hmg/ddt373.

Gay, L., Karfilis, K. V., Miller, M. R., Doe, C. Q. and Stankunas, K. (2014) Applying thiouracil tagging to mouse transcriptome analysis, *Nature Protocols*, 9 (2), pp. 410–420.

Girardot, F., Lasbleiz, C., Monnier, V. and Tricoire, H. (2006) Specific age related signatures in *Drosophila* body parts transcriptome, *BMC Genomics*, 7, pp. 69. DOI:10.1186/1471-2164-7-69.

Gomes-Pereira, M., Foiry, L., Nicole, A., Huguet, A., Junien, C., Munnich, A., *et al.* (2007) CTG Trinucleotide Repeat ‘Big Jumps’: Large Expansions, Small Mice, *PLoS Genetics*, 3 (4). DOI:10.1371/journal.pgen.0030052.

Good, P. J., Chen, Q., Warner, S. J. and Herring, D. C. (2000) A Family of Human RNA-binding Proteins Related to the *Drosophila* Bruno Translational Regulator, *Journal of Biological Chemistry*, 275 (37), pp. 28583–28592. DOI:10.1074/jbc.M003083200.

Grewal, S. S. (2009) Insulin/TOR signaling in growth and homeostasis: a view from the fly world, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41 (5), pp. 1006–1010. DOI:10.1016/j.biocel.2008.10.010.

Grewal, S. S. (2012) Controlling animal growth and body size – does fruit fly physiology point the way?, *F1000 Biology Reports*, 4. DOI:10.3410/B4-12.

Groh, W. J., Groh, M. R., Saha, C., Kincaid, J. C., Simmons, Z., Ciafaloni, E., *et al.* (2008) Electrocardiographic abnormalities and sudden death in myotonic dystrophy type 1, *New England Journal of Medicine*, 358 (25), pp. 2688–2697.

- Groh, W. J., Groh, M. R., Saha, C., Kincaid, J. C., Simmons, Z., Ciafaloni, E., Pourmand, R., Otten, R. F., Bhakta, D., Nair, G. V., Marashdeh, M. M., *et al.* (2008) Electrocardiographic Abnormalities and Sudden Death in Myotonic Dystrophy Type 1, *New England Journal of Medicine*, 358 (25), pp. 2688–2697. DOI:10.1056/NEJMoa062800.
- Gu, G.-G. and Singh, S. (1995) Pharmacological analysis of heartbeat in *Drosophila*, *Journal of Neurobiology*, 28 (3), pp. 269–280. DOI:10.1002/neu.480280302.
- Gunkel, O., Reichenbach, H., Thamm, B., Wetzel, U., Bratanow, S., Kirchhof, M., *et al.* (2000) [Late diagnosis of Curschmann-Steinert myotonic dystrophy in a female patient with dilated cardiomyopathy and in her son], *Zeitschrift Für Kardiologie*, 89 (7), pp. 599–605.
- Guo, P. and Lam, S. L. (2015) New insights into the genetic instability in CCTG repeats, *FEBS Letters*, 589 (20 Pt B), pp. 3058–3063. DOI:10.1016/j.febslet.2015.09.007.
- Hadian, D., Lowe, M. R., Scott, L. R. and Groh, W. J. (2002) Use of an insertable loop recorder in a myotonic dystrophy patient, *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 13 (1), pp. 72–73.
- Hamshere, M., Harley, H., Harper, P., Brook, J. and Brookfield, J. (1999) Myotonic dystrophy: the correlation of (CTG) repeat length in leucocytes with age at onset is significant only for patients with small expansions, *Journal of Medical Genetics*, 36 (1), pp. 59–61.
- Hao, M., Akrami, K., Wei, K., De Diego, C., Che, N., Ku, J.-H., *et al.* (2008) Muscleblind-like 2 (Mbnl2) -deficient mice as a model for myotonic dystrophy, *Developmental Dynamics*, 237 (2), pp. 403–410. DOI:10.1002/dvdy.21428.
- Harley, H. G., Rundle, S. A., MacMillan, J. C., Myring, J., Brook, J. D., Crow, S., *et al.* (1993) Size of the unstable CTG repeat sequence in relation to phenotype and parental transmission in myotonic dystrophy., *American Journal of Human Genetics*, 52 (6), pp. 1164.
- Harmon, E. B., Harmon, M. L., Larsen, T. D., Paulson, A. F. and Perryman, M. B. (2008) Myotonic dystrophy protein kinase is expressed in embryonic myocytes and is required for myotube formation, *Developmental Dynamics*, 237 (9), pp. 2353–2366. DOI:10.1002/dvdy.21653.
- Harmon, E. B., Harmon, M. L., Larsen, T. D., Yang, J., Glasford, J. W. and Perryman, M. B. (2011) Myotonic Dystrophy Protein Kinase Is Critical for Nuclear Envelope Integrity, *The Journal of Biological Chemistry*, 286 (46), pp. 40296–40306. DOI:10.1074/jbc.M111.241455.
- Harper, P. S. (1975) Congenital myotonic dystrophy in Britain. II. Genetic basis., *Archives of Disease in Childhood*, 50 (7), pp. 514–521.
- Harper, P. S., Harley, H. G., Reardon, W. and Shaw, D. J. (1992) Anticipation in myotonic dystrophy: new light on an old problem., *American Journal of Human Genetics*, 51 (1), pp. 10–16.
- Hartenstine, M. J., Goodman, M. F. and Petruska, J. (2000) Base Stacking and Even/Odd Behavior of Hairpin Loops in DNA Triplet Repeat Slippage and Expansion with DNA Polymerase, *Journal of Biological Chemistry*, 275 (24), pp. 18382–18390. DOI:10.1074/jbc.M910272199.
- He, Y. and Jasper, H. (2014) Studying aging in *Drosophila*, *Methods*, 68 (1), pp. 129–133. DOI:10.1016/j.ymeth.2014.04.008.
- Heatwole, C., Johnson, N., Bode, R., Dekdebrun, J., Dilek, N., Hilbert, J. E., *et al.* (2015) Patient-Reported Impact of Symptoms in Myotonic Dystrophy Type 2 (PRISM-2), *Neurology*, 85 (24), pp. 2136–2146. DOI:10.1212/WNL.0000000000002225.
- Hérault, Y., Hraba-Renevey, S., van der Hoeven, F. and Duboule, D. (1996) Function of the *Evx-2* gene in the morphogenesis of vertebrate limbs., *The EMBO Journal*, 15 (23), pp. 6727–6738.

- Hermans, M. C. E., Faber, C. G., Bekkers, S. C. A. M., de Die-Smulders, C. E. M., Gerrits, M. M., Merkies, I. S. J., *et al.* (2012) Structural and functional cardiac changes in myotonic dystrophy type 1: a cardiovascular magnetic resonance study, *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance: Official Journal of the Society for Cardiovascular Magnetic Resonance*, 14, pp. 48. DOI:10.1186/1532-429X-14-48.
- Ho, T. H., Charlet-B, N., Poulos, M. G., Singh, G., Swanson, M. S. and Cooper, T. A. (2004) Muscleblind proteins regulate alternative splicing, *The EMBO Journal*, 23 (15), pp. 3103–3112.
- Ho, T. H., Bundman, D., Armstrong, D. L. and Cooper, T. A. (2005a) Transgenic mice expressing CUG-BP1 reproduce splicing mis-regulation observed in myotonic dystrophy, *Human Molecular Genetics*, 14 (11), pp. 1539–1547. DOI:10.1093/hmg/ddi162.
- Ho, T. H., Savkur, R. S., Poulos, M. G., Mancini, M. A., Swanson, M. S. and Cooper, T. A. (2005b) Colocalization of muscleblind with RNA foci is separable from mis-regulation of alternative splicing in myotonic dystrophy, *Journal of Cell Science*, 118 (13), pp. 2923–2933. DOI:10.1242/jcs.02404.
- Ho, G., Cardamone, M. and Farrar, M. (2015) Congenital and childhood myotonic dystrophy: Current aspects of disease and future directions, *World Journal of Clinical Pediatrics*, 4 (4), pp. 66–80. DOI:10.5409/wjcp.v4.i4.66.
- Hofmann-Radvanyi, H., Lavedan, C., Rabès, J.-P., Savoy, D., Duros, C., Johnson, K., *et al.* (1993) Myotonic dystrophy: absence of CTG enlarged transcript in congenital forms, and low expression of the normal allele, *Human Molecular Genetics*, 2 (8), pp. 1263–1266. DOI:10.1093/hmg/2.8.1263.
- Houseley, J. M. (2005) Myotonic dystrophy associated expanded CUG repeat muscleblind positive ribonuclear foci are not toxic to Drosophila, *Human Molecular Genetics*, 14 (6), pp. 873–883. DOI:10.1093/hmg/ddi080.
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., *et al.* (2013) The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome., *Nature*, 496 (7446), pp. 498–503. DOI:10.1038/nature12111.
- Huguet, A., Medja, F., Nicole, A., Vignaud, A., Guiraud-Dogan, C., Ferry, A., *et al.* (2012) Molecular, Physiological, and Motor Performance Defects in DMSXL Mice Carrying >1,000 CTG Repeats from the Human DM1 Locus, *PLoS Genetics*, 8 (11), pp. e1003043. DOI:10.1371/journal.pgen.1003043.
- Ip, Y. T., Park, R. E., Kosman, D., Yazdanbakhsh, K. and Levine, M. (1992) dorsal-twist interactions establish snail expression in the presumptive mesoderm of the Drosophila embryo, *Genes & Development*, 6 (8), pp. 1518–1530.
- Iyer, R. R., Pluciennik, A., Napierala, M. and Wells, R. D. (2015) DNA triplet repeat expansion and mismatch repair, *Annual Review of Biochemistry*, 84, pp. 199–226. DOI:10.1146/annurev-biochem-060614-034010.
- Jackson, G. R., Salecker, I., Dong, X., Yao, X., Arnheim, N., Faber, P. W., *et al.* (1998) Polyglutamine-Expanded Human Huntingtin Transgenes Induce Degeneration of Drosophila Photoreceptor Neurons, *Neuron*, 21 (3), pp. 633–642.
- Jagla, K., Dollé, P., Mattei, M. G., Jagla, T., Schuhbaur, B., Dretzen, G., *et al.* (1995) Mouse Lbx1 and human LBX1 define a novel mammalian homeobox gene family related to the Drosophila ladybird genes, *Mechanisms of Development*, 53 (3), pp. 345–356.
- Jagla, K., Jagla, T., Heitzler, P., Dretzen, G., Bellard, F. and Bellard, M. (1997) ladybird, a tandem of

homeobox genes that maintain late wingless expression in terminal and dorsal epidermis of the *Drosophila* embryo, *Development*, 124 (1), pp. 91–100.

Jagla, T., Bellard, F., Lutz, Y., Dretzen, G., Bellard, M. and Jagla, K. (1998) ladybird determines cell fate decisions during diversification of *Drosophila* somatic muscles, *Development*, 125 (18), pp. 3699–3708.

Jakupciak, J. P. and Wells, R. D. (2000) Gene Conversion (Recombination) Mediates Expansions of CTG·CAG Repeats, *Journal of Biological Chemistry*, 275 (51), pp. 40003–40013. DOI:10.1074/jbc.M007153200.

Jansen, G., Willems, P., Coerwinkel, M., Nillesen, W., Smeets, H., Vits, L., *et al.* (1994) Gonosomal mosaicism in myotonic dystrophy patients: involvement of mitotic events in (CTG)<sub>n</sub> repeat variation and selection against extreme expansion in sperm., *American Journal of Human Genetics*, 54 (4), pp. 575–585.

Jansen, G., Groenen, P. J., Bächner, D., Jap, P. H., Coerwinkel, M., Oerlemans, F., *et al.* (1996) Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice, *Nature Genetics*, 13 (3), pp. 316–324. DOI:10.1038/ng0796-316.

Jaworski, A., Rosche, W. A., Gellibolian, R., Kang, S., Shimizu, M., Bowater, R. P., *et al.* (1995) Mismatch repair in *Escherichia coli* enhances instability of (CTG)<sub>n</sub> triplet repeats from human hereditary diseases., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92 (24), pp. 11019–11023.

Jennings, B. H. (2011) *Drosophila* – a versatile model in biology & medicine, *Materials Today*, 14 (5), pp. 190–195. DOI:10.1016/S1369-7021(11)70113-4.

Jentsch, T. J. (2000) Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease, *Nature Reviews. Neuroscience*, 1 (1), pp. 21–30. DOI:10.1038/35036198.

Jin, S., Shimizu, M., Balasubramanyam, A. and Epstein, H. F. (2000) Myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) induces actin cytoskeletal reorganization and apoptotic-like blebbing in lens cells, *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 45 (2), pp. 133–148. DOI:10.1002/(SICI)1097-0169(200002)45:2<133::AID-CM5>3.0.CO;2-S.

Johnson, E., Ringo, J. and Dowse, H. (2001) Dynamin, encoded by *shibire*, is central to cardiac function, *Journal of Experimental Zoology*, 289 (2), pp. 81–89. DOI:10.1002/1097-010X(20010201)289:2<81::AID-JEZ1>3.0.CO;2-T.

Joseph, J. T., Richards, C. S., Anthony, D. C., Upton, M., Perez-Atayde, A. R. and Greenstein, P. (1997) Congenital myotonic dystrophy pathology and somatic mosaicism, *Neurology*, 49 (5), pp. 1457–1460.

Jung, J. and Bonini, N. (2007) CREB-Binding Protein Modulates Repeat Instability in a *Drosophila* Model for PolyQ Disease, *Science*, 315 (5820), pp. 1857–1859. DOI:10.1126/science.1139517.

Kaletta, T. and Hengartner, M. O. (2006) Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism, *Nature Reviews Drug Discovery*, 5 (5), pp. 387–399. DOI:10.1038/nrd2031.

Kaliman, P., Catalucci, D., Lam, J. T., Kondo, R., Gutiérrez, J. C. P., Reddy, S., *et al.* (2005) Myotonic Dystrophy Protein Kinase Phosphorylates Phospholamban and Regulates Calcium Uptake in Cardiomyocyte Sarcoplasmic Reticulum, *Journal of Biological Chemistry*, 280 (9), pp. 8016–8021. DOI:10.1074/jbc.M412845200.

Kaliman, P. and Llagostera, E. (2008) Myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) and its role in the



- pathogenesis of myotonic dystrophy 1, *Cellular Signalling*, 20 (11), pp. 1935–1941. DOI:10.1016/j.cellsig.2008.05.005.
- Kalsotra, A., Xiao, X., Ward, A. J., Castle, J. C., Johnson, J. M., Burge, C. B., *et al.* (2008) A postnatal switch of CELF and MBNL proteins reprograms alternative splicing in the developing heart, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (51), pp. 20333–20338.
- Kalsotra, A., Singh, R. K., Gurha, P., Ward, A. J., Creighton, C. J. and Cooper, T. A. (2014) The Mef2 Transcription Network Is Disrupted in Myotonic Dystrophy Heart Tissue, Dramatically Altering miRNA and mRNA Expression, *Cell Reports*, 6 (2), pp. 336–345. DOI:10.1016/j.celrep.2013.12.025.
- Kanadia, R. N., Johnstone, K. A., Mankodi, A., Lungu, C., Thornton, C. A., Esson, D., *et al.* (2003a) A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy, *Science (New York, N.Y.)*, 302 (5652), pp. 1978–1980. DOI:10.1126/science.1088583.
- Kanadia, R. N., Urbinati, C. R., Crusselle, V. J., Luo, D., Lee, Y.-J., Harrison, J. K., *et al.* (2003b) Developmental expression of mouse muscleblind genes Mbnl1, Mbnl2 and Mbnl3, *Gene Expression Patterns*, 3 (4), pp. 459–462. DOI:10.1016/S1567-133X(03)00064-4.
- Kanadia, R. N., Shin, J., Yuan, Y., Beattie, S. G., Wheeler, T. M., Thornton, C. A., *et al.* (2006) Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscleblind overexpression in a mouse poly(CUG) model for myotonic dystrophy, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (31), pp. 11748–11753. DOI:10.1073/pnas.0604970103.
- Khoshbakht, R., Soltanzadeh, A., Zamani, B., Abdi, S., Gharagozli, K., Kahrizi, K., *et al.* (2014) Correlation between distribution of muscle weakness, electrophysiological findings and CTG expansion in myotonic dystrophy, *Journal of Clinical Neuroscience*, 21 (7), pp. 1123–1126. DOI:10.1016/j.jocn.2013.09.016.
- Kim, D.-H., Langlois, M.-A., Lee, K.-B., Riggs, A. D., Puymirat, J. and Rossi, J. J. (2005) HnRNP H inhibits nuclear export of mRNA containing expanded CUG repeats and a distal branch point sequence, *Nucleic Acids Research*, 33 (12), pp. 3866–3874. DOI:10.1093/nar/gki698.
- Kim, H. and Kim, J.-S. (2014) A guide to genome engineering with programmable nucleases, *Nature Reviews. Genetics*, 15 (5), pp. 321–334. DOI:10.1038/nrg3686.
- Kim, Y. K., Furic, L., Parisien, M., Major, F., DesGroseillers, L. and Maquat, L. E. (2007) Staufen1 regulates diverse classes of mammalian transcripts, *The EMBO Journal*, 26 (11), pp. 2670–2681. DOI:10.1038/sj.emboj.7601712.
- Kim, Y. K., Mandal, M., Yadava, R. S., Paillard, L. and Mahadevan, M. S. (2014) Evaluating the effects of CELF1 deficiency in a mouse model of RNA toxicity, *Human Molecular Genetics*, 23 (2), pp. 293–302. DOI:10.1093/hmg/ddt419.
- Kimura, T. (2005) Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase in myotonic dystrophy type 1, *Human Molecular Genetics*, 14 (15), pp. 2189–2200. DOI:10.1093/hmg/ddi223.
- Kino, Y., Washizu, C., Oma, Y., Onishi, H., Nezu, Y., Sasagawa, N., *et al.* (2009) MBNL and CELF proteins regulate alternative splicing of the skeletal muscle chloride channel CLCN1, *Nucleic Acids Research*, 37 (19), pp. 6477–6490. DOI:10.1093/nar/gkp681.
- Klesert, T. R., Otten, A. D., Bird, T. D. and Tapscott, S. J. (1997) Trinucleotide repeat expansion at the myotonic dystrophy locus reduces expression of DMAHP, *Nature Genetics*, 16 (4), pp. 402–406. DOI:10.1038/ng0897-402.

- Klesert, T. R., Cho, D. H., Clark, J. I., Maylie, J., Adelman, J., Snider, L., *et al.* (2000) Mice deficient in Six5 develop cataracts: implications for myotonic dystrophy, *Nature Genetics*, 25 (1), pp. 105–109.
- Klinck, R., Fourrier, A., Thibault, P., Toutant, J., Durand, M., Lapointe, E., *et al.* (2014) RBFOX1 Cooperates with MBNL1 to Control Splicing in Muscle, Including Events Altered in Myotonic Dystrophy Type 1, *PLoS ONE*, 9 (9). DOI:10.1371/journal.pone.0107324.
- Koga, R., Nakao, Y., Kurano, Y., Tsukahara, T., Nakamura, A., Ishiura, S., *et al.* (1994) Decreased Myotonin-Protein Kinase in the Skeletal and Cardiac Muscles in Myotonic Dystrophy, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 202 (1), pp. 577–585. DOI:10.1006/bbrc.1994.1967.
- Konieczny, P., Stepniak-Konieczna, E. and Sobczak, K. (2014) MBNL proteins and their target RNAs, interaction and splicing regulation, *Nucleic Acids Research*, pp. gku767. DOI:10.1093/nar/gku767.
- Koscianska, E., Witkos, T. M., Kozłowska, E., Wojciechowska, M. and Krzyzosiak, W. J. (2015) Cooperation meets competition in microRNA-mediated DMPK transcript regulation, *Nucleic Acids Research*, pp. gkv849. DOI:10.1093/nar/gkv849.
- Koshelev, M., Sarma, S., Price, R. E., Wehrens, X. H. T. and Cooper, T. A. (2010) Heart-specific overexpression of CUGBP1 reproduces functional and molecular abnormalities of myotonic dystrophy type 1, *Human Molecular Genetics*, 19 (6), pp. 1066–1075. DOI:10.1093/hmg/ddp570.
- Koutsoulidou, A., Kyriakides, T. C., Papadimas, G. K., Christou, Y., Kararizou, E., Papanicolaou, E. Z., *et al.* (2015) Elevated Muscle-Specific miRNAs in Serum of Myotonic Dystrophy Patients Relate to Muscle Disease Progress, *PLoS ONE*, 10 (4). DOI:10.1371/journal.pone.0125341.
- Krol, J., Fiszer, A., Mykowska, A., Sobczak, K., de Mezer, M. and Krzyzosiak, W. J. (2007) Ribonuclease dicer cleaves triplet repeat hairpins into shorter repeats that silence specific targets, *Molecular Cell*, 25 (4), pp. 575–586. DOI:10.1016/j.molcel.2007.01.031.
- Kuyumcu-Martinez, N. M., Wang, G.-S. and Cooper, T. A. (2007) Increased steady-state levels of CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation, *Molecular Cell*, 28 (1), pp. 68–78.
- Ladd, A. N., Taffet, G., Hartley, C., Kearney, D. L. and Cooper, T. A. (2005) Cardiac Tissue-Specific Repression of CELF Activity Disrupts Alternative Splicing and Causes Cardiomyopathy, *Molecular and Cellular Biology*, 25 (14), pp. 6267–6278. DOI:10.1128/MCB.25.14.6267-6278.2005.
- Lai, Z. C., Fortini, M. E. and Rubin, G. M. (1991) The embryonic expression patterns of zfh-1 and zfh-2, two Drosophila genes encoding novel zinc-finger homeodomain proteins, *Mechanisms of Development*, 34 (2–3), pp. 123–134.
- Lai, C.-H., Chou, C.-Y., Ch'ang, L.-Y., Liu, C.-S. and Lin, W. (2000) Identification of Novel Human Genes Evolutionarily Conserved in Caenorhabditis elegans by Comparative Proteomics, *Genome Research*, 10 (5), pp. 703–713. DOI:10.1101/gr.10.5.703.
- Lalevée, N., Monier, B., Sénatore, S., Perrin, L. and Sémériva, M. (2006) Control of Cardiac Rhythm by ORK1, a Drosophila Two-Pore Domain Potassium Channel, *Current Biology*, 16 (15), pp. 1502–1508. DOI:10.1016/j.cub.2006.05.064.
- Lam, L. T., Pham, Y. C., Nguyen, T. M. and Morris, G. E. (2000) Characterization of a monoclonal antibody panel shows that the myotonic dystrophy protein kinase, DMPK, is expressed almost exclusively in muscle and heart, *Human Molecular Genetics*, 9 (14), pp. 2167–2173.
- Landis, G. N., Abdueva, D., Skvortsov, D., Yang, J., Rabin, B. E., Carrick, J., *et al.* (2004) Similar

- gene expression patterns characterize aging and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (20), pp. 7663–7668. DOI:10.1073/pnas.0307605101.
- Larkin, K. and Farfalei, M. (2001) Myotonic dystrophy—a multigene disorder, *Brain Research Bulletin*, 56 (3), pp. 389–395.
- Laurent, F.-X., Sureau, A., Klein, A. F., Trouslard, F., Gasnier, E., Furling, D., *et al.* (2012) New function for the RNA helicase p68/DDX5 as a modifier of MBNL1 activity on expanded CUG repeats, *Nucleic Acids Research*, 40 (7), pp. 3159–3171. DOI:10.1093/nar/gkr1228.
- Lavedan, C., Hofmann-Radvanyi, H., Shelbourne, P., Rabes, J. P., Duros, C., Savoy, D., *et al.* (1993) Myotonic dystrophy: size-and sex-dependent dynamics of CTG meiotic instability, and somatic mosaicism., *American Journal of Human Genetics*, 52 (5), pp. 875.
- Lazarus, A., Varin, J., Babuty, D., Anselme, F. rédéric, Coste, J. and Duboc, D. (2002) Long-term follow-up of arrhythmias in patients with myotonic dystrophy treated by pacing: A multicenter diagnostic pacemaker study, *Journal of the American College of Cardiology*, 40 (9), pp. 1645–1652. DOI:10.1016/S0735-1097(02)02339-2.
- Le Mée, G., Ezzeddine, N., Capri, M. and Aït-Ahmed, O. (2008) Repeat Length and RNA Expression Level Are Not Primary Determinants in CUG Expansion Toxicity in *Drosophila* Models, *PLoS ONE*, 3 (1), pp. e1466. DOI:10.1371/journal.pone.0001466.
- Lee, J. E., Lee, J. Y., Wilusz, J., Tian, B. and Wilusz, C. J. (2010) Systematic Analysis of Cis-Elements in Unstable mRNAs Demonstrates that CUGBP1 Is a Key Regulator of mRNA Decay in Muscle Cells, *PLoS ONE*, 5 (6), pp. e11201. DOI:10.1371/journal.pone.0011201.
- Li, J., Xuan, Z. and Liu, C. (2013) Long non-coding RNAs and complex human diseases, *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (9), pp. 18790–18808. DOI:10.3390/ijms140918790.
- Lim, H.-Y., Wang, W., Chen, J., Ocorr, K. and Bodmer, R. (2014) ROS regulate cardiac function via a distinct paracrine mechanism, *Cell Reports*, 7 (1), pp. 35–44. DOI:10.1016/j.celrep.2014.02.029.
- Lin, X. (2006) Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy, *Human Molecular Genetics*, 15 (13), pp. 2087–2097. DOI:10.1093/hmg/ddl132.
- Lin, Y., Hubert, L. and Wilson, J. H. (2009) TRANSCRIPTION DESTABILIZES TRIPLET REPEATS, *Molecular Carcinogenesis*, 48 (4), pp. 350–361. DOI:10.1002/mc.20488.
- Lints, T. J., Parsons, L. M., Hartley, L., Lyons, I. and Harvey, R. P. (1993) Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants, *Development*, 119 (2), pp. 419–431.
- Liquori, C. L., Ricker, K., Moseley, M. L., Jacobsen, J. F., Kress, W., Naylor, S. L., *et al.* (2001) Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9, *Science (New York, N.Y.)*, 293 (5531), pp. 864–867. DOI:10.1126/science.1062125.
- Llagostera, E., Catalucci, D., Marti, L., Liesa, M., Camps, M., Ciaraldi, T. P., *et al.* (2007) Role of Myotonic Dystrophy Protein Kinase (DMPK) in Glucose Homeostasis and Muscle Insulin Action, *PLoS ONE*, 2 (11). DOI:10.1371/journal.pone.0001134.
- Lloyd, T. E. and Taylor, J. P. (2010) Flightless flies: *Drosophila* models of neuromuscular disease, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1184, pp. e1-20.
- Long, C., McAnally, J. R., Shelton, J. M., Mireault, A. A., Bassel-Duby, R. and Olson, E. N. (2014) Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA,



- Science*, 345 (6201), pp. 1184–1188. DOI:10.1126/science.1254445.
- Machuca-Tzili, L., Brook, D. and Hilton-Jones, D. (2005) Clinical and molecular aspects of the myotonic dystrophies: A review, *Muscle & Nerve*, 32 (1), pp. 1–18. DOI:10.1002/mus.20301.
- Machuca-Tzili, L. E., Buxton, S., Thorpe, A., Timson, C. M., Wigmore, P., Luther, P. K., *et al.* (2011) Zebrafish deficient for Muscleblind-like 2 exhibit features of myotonic dystrophy., *Disease Models & Mechanisms*, 4 (3), pp. 381–92. DOI:10.1242/dmm.004150.
- Maeda, M., Taft, C. S., Bush, E. W., Holder, E., Bailey, W. M., Neville, H., *et al.* (1995) Identification, Tissue-specific Expression, and Subcellular Localization of the 80- and 71-kDa Forms of Myotonic Dystrophy Kinase Protein, *Journal of Biological Chemistry*, 270 (35), pp. 20246–20249. DOI:10.1074/jbc.270.35.20246.
- Mahadevan, M., Tsilfidis, C., Sabourin, L., Shutler, G., Amemiya, C., Jansen, G., *et al.* (1992) Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene, *Science (New York, N.Y.)*, 255 (5049), pp. 1253–1255.
- Mahadevan, M. S., Amemiya, C., Jansen, G., Sabourin, L., Baird, S., Neville, C. E., *et al.* (1993) Structure and genomic sequence of the myotonic dystrophy (DM kinase) gene, *Human Molecular Genetics*, 2 (3), pp. 299–304. DOI:10.1093/hmg/2.3.299.
- Mahadevan, M. S., Yadava, R. S., Yu, Q., Balijepalli, S., Frenzel-McCardell, C. D., Bourne, T. D., *et al.* (2006) Reversible model of RNA toxicity and cardiac conduction defects in myotonic dystrophy, *Nature Genetics*, 38 (9), pp. 1066–1070. DOI:10.1038/ng1857.
- Mankodi, A. (2000) Myotonic Dystrophy in Transgenic Mice Expressing an Expanded CUG Repeat, *Science*, 289 (5485), pp. 1769–1772. DOI:10.1126/science.289.5485.1769.
- Mankodi, A., Urbinati, C. R., Yuan, Q.-P., Moxley, R. T., Sansone, V., Krym, M., *et al.* (2001) Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2, *Human Molecular Genetics*, 10 (19), pp. 2165–2170.
- Mankodi, A., Takahashi, M. P., Jiang, H., Beck, C. L., Bowers, W. J., Moxley, R. T., *et al.* (2002) Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of ClC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy, *Molecular Cell*, 10 (1), pp. 35–44.
- Mankodi, A., Teng-Ummuay, P., Krym, M., Henderson, D., Swanson, M. and Thornton, C. A. (2003) Ribonuclear inclusions in skeletal muscle in myotonic dystrophy types 1 and 2, *Annals of Neurology*, 54 (6), pp. 760–768. DOI:10.1002/ana.10763.
- Manley, K., Shirley, T. L., Flaherty, L. and Messer, A. (1999) Msh2 deficiency prevents in vivo somatic instability of the CAG repeat in Huntington disease transgenic mice, *Nature Genetics*, 23 (4), pp. 471–473. DOI:10.1038/70598.
- Maqbool, T. and Jagla, K. (2007) Genetic control of muscle development: learning from Drosophila, *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 28 (7–8), pp. 397–407. DOI:10.1007/s10974-008-9133-1.
- Marcelle, C., Stark, M. R. and Bronner-Fraser, M. (1997) Coordinate actions of BMPs, Wnts, Shh and noggin mediate patterning of the dorsal somite, *Development*, 124 (20), pp. 3955–3963.
- Martorell, L., Monckton, D. G., Gamez, J. and Baiget, M. (2000) Complex patterns of male germline instability and somatic mosaicism in myotonic dystrophy type 1, *European Journal of Human Genetics*, 8 (6), pp. 423–430.
- Masuda, A., Andersen, H. S., Doktor, T. K., Okamoto, T., Ito, M., Andresen, B. S., *et al.* (2012)

- CUGBP1 and MBNL1 preferentially bind to 3' UTRs and facilitate mRNA decay, *Scientific Reports*, 2. DOI:10.1038/srep00209.
- Mateos-Aierdi, A. J., Goicoechea, M., Aiausti, A., Fernández-Torrón, R., Garcia-Puga, M., Matheu, A., *et al.* (2015) Muscle wasting in myotonic dystrophies: a model of premature aging, *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7. DOI:10.3389/fnagi.2015.00125.
- Mathieu, J., De Braekeleer, M. and Prévost, C. (1990) Genealogical reconstruction of myotonic dystrophy in the Saguenay-Lac-Saint-Jean area (Quebec, Canada), *Neurology*, 40 (5), pp. 839–842.
- Mathieu, J., Allard, P., Potvin, L., Prevost, C. and Begin, P. (1999) A 10-year study of mortality in a cohort of patients with myotonic dystrophy, *Neurology*, 52 (8), pp. 1658–1658.
- Matynia, A., Ng, C. H., Dansithong, W., Chiang, A., Silva, A. J. and Reddy, S. (2010) Muscleblind1, but not Dmpk or Six5, contributes to a complex phenotype of muscular and motivational deficits in mouse models of myotonic dystrophy, *PLoS One*, 5 (3), pp. e9857. DOI:10.1371/journal.pone.0009857.
- McMurray, C. T. (2010) Mechanisms of trinucleotide repeat instability during human development, *Nature Reviews. Genetics*, 11 (11), pp. 786–799. DOI:10.1038/nrg2828.
- Medioni, C., Sénatore, S., Salmand, P.-A., Lalevée, N., Perrin, L. and Sémériva, M. (2009) The fabulous destiny of the Drosophila heart, *Current Opinion in Genetics & Development*, 19 (5), pp. 518–525. DOI:10.1016/j.gde.2009.07.004.
- Mendell, J. R. and Rodino-Klapac, L. R. (2016) Duchenne muscular dystrophy: CRISPR/Cas9 treatment, *Cell Research*, 26 (5), pp. 513–514. DOI:10.1038/cr.2016.28.
- Meola, G. and Cardani, R. (2015) Myotonic dystrophies: An update on clinical aspects, genetic, pathology, and molecular pathomechanisms, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1852 (4), pp. 594–606. DOI:10.1016/j.bbadis.2014.05.019.
- Merino, J. L., Carmona, J. R., Fernández-Lozano, I., Peinado, R., Basterra, N. and Sobrino, J. A. (1998) Mechanisms of Sustained Ventricular Tachycardia in Myotonic Dystrophy, *Circulation*, 98 (6), pp. 541–546. DOI:10.1161/01.CIR.98.6.541.
- Messina, G. and Cossu, G. (2009) The origin of embryonic and fetal myoblasts: a role of Pax3 and Pax7, *Genes & Development*, 23 (8), pp. 902–905. DOI:10.1101/gad.1797009.
- Michalowski, S., Miller, J. W., Urbinati, C. R., Paliouras, M., Swanson, M. S. and Griffith, J. (1999) Visualization of double-stranded RNAs from the myotonic dystrophy protein kinase gene and interactions with CUG-binding protein., *Nucleic Acids Research*, 27 (17), pp. 3534–3542.
- Michel, L., Huguet-Lachon, A. and Gourdon, G. (2015) Sense and Antisense DMPK RNA Foci Accumulate in DM1 Tissues during Development, *PLoS One*, 10 (9), pp. e0137620.
- Millburn, G. H., Crosby, M. A., Gramates, L. S., Tweedie, S. and Consortium, the F. (2016) FlyBase portals to human disease research using Drosophila models, *Disease Models and Mechanisms*, 9 (3), pp. 245–252. DOI:10.1242/dmm.023317.
- Miller, J. W., Urbinati, C. R., Teng-umnuay, P., Stenberg, M. G., Byrne, B. J., Thornton, C. A., *et al.* (2000) Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)<sub>n</sub> expansions associated with myotonic dystrophy, *The EMBO Journal*, 19 (17), pp. 4439–4448. DOI:10.1093/emboj/19.17.4439.
- Miller, M. R., Robinson, K. J., Cleary, M. D. and Doe, C. Q. (2009) TU-tagging: cell type-specific RNA isolation from intact complex tissues, *Nature Methods*, 6 (6), pp. 439–441. DOI:10.1038/nmeth.1329.

- Molina, M. R. and Cripps, R. M. (2001) Ostia, the inflow tracts of the *Drosophila* heart, develop from a genetically distinct subset of cardiac cells, *Mechanisms of Development*, 109 (1), pp. 51–59.
- Monaco, G., van Dam, S., Casal Novo Ribeiro, J. L., Larbi, A. and de Magalhães, J. P. (2015) A comparison of human and mouse gene co-expression networks reveals conservation and divergence at the tissue, pathway and disease levels, *BMC Evolutionary Biology*, 15, pp. 259. DOI:10.1186/s12862-015-0534-7.
- Monfredi, O., Dobrzynski, H., Mondal, T., Boyett, M. R. and Morris, G. M. (2010) The Anatomy and Physiology of the Sinoatrial Node—A Contemporary Review, *Pacing and Clinical Electrophysiology*, 33 (11), pp. 1392–1406. DOI:10.1111/j.1540-8159.2010.02838.x.
- Monier, B., Astier, M., Sémériva, M. and Perrin, L. (2005) Steroid-dependent modification of Hox function drives myocyte reprogramming in the *Drosophila* heart, *Development*, 132 (23), pp. 5283–5293. DOI:10.1242/dev.02091.
- Monnier, V., Iché-Torres, M., Rera, M., Contremoulins, V., Guichard, C., Lalevée, N., *et al.* (2012) dJun and Vri/dNFIL3 are major regulators of cardiac aging in *Drosophila*, *PLoS Genetics*, 8 (11), pp. e1003081. DOI:10.1371/journal.pgen.1003081.
- Moore, H., Greenwell, P. W., Liu, C.-P., Arnheim, N. and Petes, T. D. (1999) Triplet repeats form secondary structures that escape DNA repair in yeast, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (4), pp. 1504–1509.
- Morgan, T. H. (1915) *The mechanism of Mendelian heredity*. Holt.
- Mounsey, J. P., John, J. E., Helmke, S. M., Bush, E. W., Gilbert, J., Roses, A. D., *et al.* (2000) Phospholemman is a substrate for myotonic dystrophy protein kinase, *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (30), pp. 23362–23367. DOI:10.1074/jbc.M000899200.
- Murányi, A., Derkach, D., Erdodi, F., Kiss, A., Ito, M. and Hartshorne, D. J. (2005) Phosphorylation of Thr695 and Thr850 on the myosin phosphatase target subunit: inhibitory effects and occurrence in A7r5 cells, *FEBS Letters*, 579 (29), pp. 6611–6615. DOI:10.1016/j.febslet.2005.10.055.
- Musova, Z., Mazanec, R., Krepelova, A., Ehler, E., Vales, J., Jaklova, R., *et al.* (2009) Highly unstable sequence interruptions of the CTG repeat in the myotonic dystrophy gene, *American Journal of Medical Genetics Part A*, 149A (7), pp. 1365–1374. DOI:10.1002/ajmg.a.32987.
- Na, J., Musselman, L. P., Pendse, J., Baranski, T. J., Bodmer, R., Ocorr, K., *et al.* (2013) A *Drosophila* model of high sugar diet-induced cardiomyopathy, *PLoS Genetics*, 9 (1), pp. e1003175. DOI:10.1371/journal.pgen.1003175.
- Nakamori, M., Pearson, C. E. and Thornton, C. A. (2011) Bidirectional transcription stimulates expansion and contraction of expanded (CTG) $\cdot$ (CAG) repeats, *Human Molecular Genetics*, 20 (3), pp. 580–588. DOI:10.1093/hmg/ddq501.
- Nakamori, M., Sobczak, K., Puwanant, A., Welle, S., Eichinger, K., Pandya, S., *et al.* (2013) Splicing biomarkers of disease severity in myotonic dystrophy: Splicing Biomarkers of DM, *Annals of Neurology*, 74 (6), pp. 862–872. DOI:10.1002/ana.23992.
- Nazarian, S., Wagner, K. R., Caffo, B. S. and Tomaselli, G. F. (2011) Clinical Predictors of Conduction Disease Progression in Type I Myotonic Muscular Dystrophy, *Pacing and Clinical Electrophysiology : PACE*, 34 (2), pp. 171–176. DOI:10.1111/j.1540-8159.2010.02905.x.
- Nguyen, H. H., Wolfe, J. T., Holmes, D. R. and Edwards, W. D. (1988) Pathology of the cardiac conduction system in myotonic dystrophy: a study of 12 cases, *Journal of the American College of*

*Cardiology*, 11 (3), pp. 662–671.

Nigro, G., Papa, A. A. and Politano, L. (2012) The heart and cardiac pacing in Steinert disease, *Acta Myologica*, 31 (2), pp. 110.

Nüsslein-Volhard, C. and Wieschaus, E. (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*, *Nature*, 287 (5785), pp. 795–801. DOI:10.1038/287795a0.

Ocorr, K., Reeves, N. L., Wessells, R. J., Fink, M., Chen, H.-S. V., Akasaka, T., *et al.* (2007) KCNQ potassium channel mutations cause cardiac arrhythmias in *Drosophila* that mimic the effects of aging, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104 (10), pp. 3943–3948.

Ocorr, K., Vogler, G. and Bodmer, R. (2014) Methods to assess *Drosophila* heart development, function and aging, *Methods (San Diego, Calif.)*, 68 (1), pp. 265–272. DOI:10.1016/j.ymeth.2014.03.031.

O’Hoy, K. L., Tsilfidis, C., Mahadevan, M. S., Neville, C. E., Barceló, J., Hunter, A. G., *et al.* (1993) Reduction in size of the myotonic dystrophy trinucleotide repeat mutation during transmission, *Science (New York, N.Y.)*, 259 (5096), pp. 809–812.

Olson, E. N. (2006) Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart, *Science*, 313 (5795), pp. 1922–7. DOI:10.1126/science.1132292.

Orengo, J. P., Chambon, P., Metzger, D., Mosier, D. R., Snipes, G. J. and Cooper, T. A. (2008) Expanded CTG repeats within the DMPK 3’ UTR causes severe skeletal muscle wasting in an inducible mouse model for myotonic dystrophy, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (7), pp. 2646–2651.

Ørngreen, M. C., Arlien-Søborg, P., Duno, M., Hertz, J. M. and Vissing, J. (2012) Endocrine function in 97 patients with myotonic dystrophy type 1, *Journal of Neurology*, 259 (5), pp. 912–920. DOI:10.1007/s00415-011-6277-5.

Otten, A. D. and Tapscott, S. J. (1995) Triplet repeat expansion in myotonic dystrophy alters the adjacent chromatin structure, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92 (12), pp. 5465–5469.

Oude Ophuis, R. J. A., Mulders, S. A. M., van Herpen, R. E. M. A., van de Vorstenbosch, R., Wieringa, B. and Wansink, D. G. (2009) DMPK protein isoforms are differentially expressed in myogenic and neural cell lineages, *Muscle & Nerve*, 40 (4), pp. 545–555. DOI:10.1002/mus.21352.

Ounzain, S., Crippa, S. and Pedrazzini, T. (2013) Small and long non-coding RNAs in cardiac homeostasis and regeneration, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833 (4), pp. 923–933. DOI:10.1016/j.bbamcr.2012.08.010.

Paff, G. H., Boucek, R. J. and Harrell, T. C. (1968) Observations on the development of the electrocardiogram, *The Anatomical Record*, 160 (3), pp. 575–581. DOI:10.1002/ar.1091600306.

Paillard, L., Omilli, F., Legagneux, V., Bassez, T., Maniey, D. and Osborne, H. B. (1998) EDEN and EDEN-BP, a cis element and an associated factor that mediate sequence-specific mRNA deadenylation in *Xenopus* embryos, *The EMBO Journal*, 17 (1), pp. 278–287.

Paillard, L., Legagneux, V. and Beverley Osborne, H. (2003) A functional deadenylation assay identifies human CUG-BP as a deadenylation factor, *Biology of the Cell / Under the Auspices of the European Cell Biology Organization*, 95 (2), pp. 107–113.

Pandey, U. B. and Nichols, C. D. (2011) Human Disease Models in *Drosophila melanogaster* and the Role of the Fly in Therapeutic Drug Discovery, *Pharmacological Reviews*, 63 (2), pp. 411–436.

DOI:10.1124/pr.110.003293.

Parker, M. H., Seale, P. and Rudnicki, M. A. (2003) Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis, *Nature Reviews Genetics*, 4 (7), pp. 497–507. DOI:10.1038/nrg1109.

Pascual, M., Vicente, M., Monferrer, L. and Artero, R. (2006) The Muscleblind family of proteins: an emerging class of regulators of developmentally programmed alternative splicing, *Differentiation*, 74 (2–3), pp. 65–80. DOI:10.1111/j.1432-0436.2006.00060.x.

Paul, S., Dansithong, W., Kim, D., Rossi, J., Webster, N. J. G., Comai, L., *et al.* (2006) Interaction of muscleblind, CUG-BP1 and hnRNP H proteins in DM1-associated aberrant IR splicing, *The EMBO Journal*, 25 (18), pp. 4271–4283. DOI:10.1038/sj.emboj.7601296.

Paul, S., Dansithong, W., Jog, S. P., Holt, I., Mittal, S., Brook, J. D., *et al.* (2011) Expanded CUG Repeats Dysregulate RNA Splicing by Altering the Stoichiometry of the Muscleblind 1 Complex, *Journal of Biological Chemistry*, 286 (44), pp. 38427–38438. DOI:10.1074/jbc.M111.255224.

Pearson, C. E. and Sinden, R. R. (1996) Alternative structures in duplex DNA formed within the trinucleotide repeats of the myotonic dystrophy and fragile X loci, *Biochemistry*, 35 (15), pp. 5041–5053.

Pearson, C. E., Edamura, K. N. and Cleary, J. D. (2005) Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations, *Nature Reviews Genetics*, 6 (10), pp. 729–742. DOI:10.1038/nrg1689.

Pearson, C. E. (2011) Repeat Associated Non-ATG Translation Initiation: One DNA, Two Transcripts, Seven Reading Frames, Potentially Nine Toxic Entities!, *PLoS Genetics*, 7 (3). DOI:10.1371/journal.pgen.1002018.

Pelargonio, G., Russo, A. D., Sanna, T., De Martino, G. and Bellocchi, F. (2002) Myotonic dystrophy and the heart, *Heart*, 88 (6), pp. 665–670.

Perfetti, A., Greco, S., Bugiardini, E., Cardani, R., Gaia, P., Gaetano, C., *et al.* (2014) Plasma microRNAs as biomarkers for myotonic dystrophy type 1, *Neuromuscular Disorders*, 24 (6), pp. 509–515. DOI:10.1016/j.nmd.2014.02.005.

Petri, H., Vissing, J., Witting, N., Bundgaard, H. and Køber, L. (2012) Cardiac manifestations of myotonic dystrophy type 1, *International Journal of Cardiology*, 160 (2), pp. 82–88. DOI:10.1016/j.ijcard.2011.08.037.

Petri, H., Witting, N., Ersbøll, M. K., Sajadieh, A., Dunø, M., Helweg-Larsen, S., *et al.* (2014) High prevalence of cardiac involvement in patients with myotonic dystrophy type 1: A cross-sectional study, *International Journal of Cardiology*, 174 (1), pp. 31–36. DOI:10.1016/j.ijcard.2014.03.088.

Petruska, J., Hartenstine, M. J. and Goodman, M. F. (1998) Analysis of Strand Slippage in DNA Polymerase Expansions of CAG/CTG Triplet Repeats Associated with Neurodegenerative Disease, *Journal of Biological Chemistry*, 273 (9), pp. 5204–5210. DOI:10.1074/jbc.273.9.5204.

Pettersson, O. J., Aagaard, L., Andrejeva, D., Thomsen, R., Jensen, T. G. and Damgaard, C. K. (2014) DDX6 regulates sequestered nuclear CUG-expanded DMPK-mRNA in dystrophia myotonica type 1, *Nucleic Acids Research*, 42 (11), pp. 7186–7200. DOI:10.1093/nar/gku352.

Pettersson, O. J., Aagaard, L., Jensen, T. G. and Damgaard, C. K. (2015) Molecular mechanisms in DM1 -- a focus on foci, *Nucleic Acids Research*, 43 (4), pp. 2433–2441. DOI:10.1093/nar/gkv029.

Pham, Y. C. N., Man, N. thi, Lam, L. T. and Morris, G. E. (1998) Localization of myotonic dystrophy protein kinase in human and rabbit tissues using a new panel of monoclonal antibodies, *Human*



- Molecular Genetics*, 7 (12), pp. 1957–1965. DOI:10.1093/hmg/7.12.1957.
- Phelps, C. B. and Brand, A. H. (1998) Ectopic gene expression in *Drosophila* using GAL4 system, *Methods (San Diego, Calif.)*, 14 (4), pp. 367–379. DOI:10.1006/meth.1998.0592.
- Philips, A. V. (1998) Disruption of Splicing Regulated by a CUG-Binding Protein in Myotonic Dystrophy, *Science*, 280 (5364), pp. 737–741. DOI:10.1126/science.280.5364.737.
- Piazza, N. and Wessells, R. J. (2011) *Drosophila* Models of Cardiac Disease, *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 100, pp. 155–210. DOI:10.1016/B978-0-12-384878-9.00005-4.
- Picchio, L., Plantie, E., Renaud, Y., Poovthumkadavil, P. and Jagla, K. (2013) Novel *Drosophila* model of myotonic dystrophy type 1: phenotypic characterization and genome-wide view of altered gene expression, *Human Molecular Genetics*, 22 (14), pp. 2795–2810. DOI:10.1093/hmg/ddt127.
- Pickett, F. B. and Meeks-Wagner, D. R. (1995) Seeing double: appreciating genetic redundancy., *The Plant Cell*, 7 (9), pp. 1347–1356. DOI:10.1105/tpc.7.9.1347.
- Pisani, V., Panico, M. B., Terracciano, C., Bonifazi, E., Meola, G., Novelli, G., *et al.* (2008) Preferential central nucleation of type 2 myofibers is an invariable feature of myotonic dystrophy type 2, *Muscle & Nerve*, 38 (5), pp. 1405–1411. DOI:10.1002/mus.21122.
- P.Leeflang, E. and Arnheim, N. (1995) A novel repeat structure at the myotonic dystrophy locus in a 37 repeat allele with unexpectedly high stability, *Human Molecular Genetics*, 4 (1), pp. 135–136. DOI:10.1093/hmg/4.1.135.
- Poulos, M. G., Batra, R., Li, M., Yuan, Y., Zhang, C., Darnell, R. B., *et al.* (2013) Progressive impairment of muscle regeneration in muscleblind-like 3 isoform knockout mice, *Human Molecular Genetics*, 22 (17), pp. 3547–3558. DOI:10.1093/hmg/ddt209.
- Pourquié, O. (2001) Vertebrate Somitogenesis, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17 (1), pp. 311–350. DOI:10.1146/annurev.cellbio.17.1.311.
- Prior, T. W. (2009) Technical standards and guidelines for myotonic dystrophy type 1 testing, *Genetics in Medicine*, 11 (7), pp. 552–555. DOI:10.1097/GIM.0b013e3181abce0f.
- Puymirat, J., Giguère, Y., Mathieu, J. and Bouchard, J.-P. (2009) Intergenerational Contraction of the Ctg Repeats in 2 Families with Myotonic Dystrophy Type 1, *Neurology*, 73 (24), pp. 2126–2127. DOI:10.1212/WNL.0b013e3181c677e1.
- Ranum, L. P., Rasmussen, P. F., Benzow, K. A., Koob, M. D. and Day, J. W. (1998) Genetic mapping of a second myotonic dystrophy locus, *Nature Genetics*, 19 (2), pp. 196–198. DOI:10.1038/570.
- Ranum, L. P. and Cooper, T. A. (2006) RNA-mediated neuromuscular disorders, *Annu. Rev. Neurosci.*, 29, pp. 259–277.
- Rattenbacher, B., Beisang, D., Wiesner, D. L., Jeschke, J. C., von Hohenberg, M., St Louis-Vlasova, I. A., *et al.* (2010) Analysis of CUGBP1 targets identifies GU-repeat sequences that mediate rapid mRNA decay, *Molecular and Cellular Biology*, 30 (16), pp. 3970–3980. DOI:10.1128/MCB.00624-10.
- Rau, F., Freyermuth, F., Fugier, C., Villemain, J.-P., Fischer, M.-C., Jost, B., *et al.* (2011) Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy, *Nature Structural & Molecular Biology*, 18 (7), pp. 840–845. DOI:10.1038/nsmb.2067.
- Rau, F., Lainé, J., Ramanoudjame, L., Ferry, A., Arandel, L., Delalande, O., *et al.* (2015) Abnormal splicing switch of DMD’s penultimate exon compromises muscle fibre maintenance in myotonic

- dystrophy, *Nature Communications*, 6. DOI:10.1038/ncomms8205.
- Ravel-Chapuis, A., Bélanger, G., Yadava, R. S., Mahadevan, M. S., DesGroseillers, L., Côté, J., *et al.* (2012) The RNA-binding protein Staufen1 is increased in DM1 skeletal muscle and promotes alternative pre-mRNA splicing, *The Journal of Cell Biology*, 196 (6), pp. 699–712. DOI:10.1083/jcb.201108113.
- Reddy, S., Smith, D. B., Rich, M. M., Leferovich, J. M., Reilly, P., Davis, B. M., *et al.* (1996) Mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase develop a late onset progressive myopathy, *Nature Genetics*, 13 (3), pp. 325–335. DOI:10.1038/ng0796-325.
- Reeve, E. C. R. and Black, I. (2001) *Encyclopedia of Genetics*. Taylor & Francis.
- Reiter, L. T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M. and Bier, E. (2001) A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*, *Genome Research*, 11 (6), pp. 1114–1125. DOI:10.1101/gr.169101.
- Relaix, F., Montarras, D., Zaffran, S., Gayraud-Morel, B., Rocancourt, D., Tajbakhsh, S., *et al.* (2006) Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells, *The Journal of Cell Biology*, 172 (1), pp. 91–102. DOI:10.1083/jcb.200508044.
- Ridley, A. J. (2001) Rho proteins: linking signaling with membrane trafficking, *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 2 (5), pp. 303–310.
- Rizki, T. M. (1978) circulatory system and associated cells and tissues, *Genetics and Biology of Drosophila*. Available from: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301393040>
- Roberts, R., Timchenko, N. A., Miller, J. W., Reddy, S., Caskey, C. T., Swanson, M. S., *et al.* (1997) Altered phosphorylation and intracellular distribution of a (CUG)<sub>n</sub> triplet repeat RNA-binding protein in patients with myotonic dystrophy and in myotonin protein kinase knockout mice, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 (24), pp. 13221–13226.
- Rotstein, B. and Paululat, A. (2016) On the Morphology of the *Drosophila* Heart, *Journal of Cardiovascular Development and Disease*, 3 (2), pp. 15. DOI:10.3390/jcdd3020015.
- Rubin, G. M. and Lewis, E. B. (2000) A Brief History of *Drosophila*'s Contributions to Genome Research, *Science*, 287 (5461), pp. 2216–2218. DOI:10.1126/science.287.5461.2216.
- Ruiz-Gomez, M. (1998) Muscle patterning and specification in *Drosophila*, *INTERNATIONAL JOURNAL OF DEVELOPMENTAL BIOLOGY*, 42, pp. 283–290.
- Saba, S., Vanderbrfnk, B. A., Luciano, B., Aronovitz, M. J., Berul, C. I., Reddy, S., *et al.* (1999) Localization of the Sites of Conduction Abnormalities in a Mouse Model of Myotonic Dystrophy, *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 10 (9), pp. 1214–1220. DOI:10.1111/j.1540-8167.1999.tb00298.x.
- Said, S. A. M., Baart, J. C. and de Voogt, W. G. (2006) Pacing for conduction disturbances in Steinert's disease: a new indication for biventricular ICD?, *Netherlands Heart Journal*, 14 (7–8), pp. 258–262.
- Samadashwily, G. M., Raca, G. and Mirkin, S. M. (1997) Trinucleotide repeats affect DNA replication in vivo, *Nature Genetics*, 17 (3), pp. 298–304. DOI:10.1038/ng1197-298.
- Santoro, M., Masciullo, M., Bonvissuto, D., Bianchi, M. L. E., Michetti, F. and Silvestri, G. (2013) Alternative splicing of human insulin receptor gene (INSR) in type I and type II skeletal muscle fibers of patients with myotonic dystrophy type 1 and type 2, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 380 (1–2), pp. 259–265. DOI:10.1007/s11010-013-1681-z.



- Sarkar, P. S., Appukuttan, B., Han, J., Ito, Y., Ai, C., Tsai, W., *et al.* (2000) Heterozygous loss of Six5 in mice is sufficient to cause ocular cataracts, *Nature Genetics*, 25 (1), pp. 110–114. DOI:10.1038/75500.
- Savkur, R. S., Philips, A. V. and Cooper, T. A. (2001) Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy, *Nature Genetics*, 29 (1), pp. 40–47. DOI:10.1038/ng704.
- Savkur, R. S., Philips, A. V., Cooper, T. A., Dalton, J. C., Moseley, M. L., Ranum, L. P. W., *et al.* (2004) Insulin receptor splicing alteration in myotonic dystrophy type 2, *American Journal of Human Genetics*, 74 (6), pp. 1309–1313. DOI:10.1086/421528.
- Savouret, C., Brisson, E., Essers, J., Kanaar, R., Pastink, A., te Riele, H., *et al.* (2003) CTG repeat instability and size variation timing in DNA repair-deficient mice, *The EMBO Journal*, 22 (9), pp. 2264–2273. DOI:10.1093/emboj/cdg202.
- Savouret, C., Garcia-Cordier, C., Megret, J., te Riele, H., Junien, C. and Gourdon, G. (2004) MSH2-Dependent Germinal CTG Repeat Expansions Are Produced Continuously in Spermatogonia from DM1 Transgenic Mice, *Molecular and Cellular Biology*, 24 (2), pp. 629–637. DOI:10.1128/MCB.24.2.629-637.2004.
- Schara, U. and Schoser, B. G. H. (2006) Myotonic Dystrophies Type 1 and 2: A Summary on Current Aspects, *Seminars in Pediatric Neurology*, 13 (2), pp. 71–79. DOI:10.1016/j.spn.2006.06.002.
- Schiaffino, S. and Reggiani, C. (2011) Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles, *Physiological Reviews*, 91 (4), pp. 1447–1531. DOI:10.1152/physrev.00031.2010.
- Schumacher, S., Pinet, I. and Bichara, M. (2001) Modulation of transcription reveals a new mechanism of triplet repeat instability in Escherichia coli, *Journal of Molecular Biology*, 307 (1), pp. 39–49. DOI:10.1006/jmbi.2000.4489.
- Schweitzer, R., Zelzer, E. and Volk, T. (2010) Connecting muscles to tendons: tendons and musculoskeletal development in flies and vertebrates, *Development (Cambridge, England)*, 137 (17), pp. 2807–2817. DOI:10.1242/dev.047498.
- Scott, W., Stevens, J. and Binder-Macleod, S. A. (2001) Human Skeletal Muscle Fiber Type Classifications, *Physical Therapy*, 81 (11), pp. 1810–1816.
- Seale, P., Sabourin, L. A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P. and Rudnicki, M. A. (2000) Pax7 Is Required for the Specification of Myogenic Satellite Cells, *Cell*, 102 (6), pp. 777–786. DOI:10.1016/S0092-8674(00)00066-0.
- Seznec, H., Agbulut, O., Sergeant, N., Savouret, C., Ghestem, A., Tabti, N., *et al.* (2001) Mice transgenic for the human myotonic dystrophy region with expanded CTG repeats display muscular and brain abnormalities, *Human Molecular Genetics*, 10 (23), pp. 2717–2726.
- Shah, A. P., Nongthomba, U., Kelly Tanaka, K. K., Denton, M. L. B., Meadows, S. M., Bancroft, N., *et al.* (2011) Cardiac remodeling in Drosophila arises from changes in actin gene expression and from a contribution of lymph gland-like cells to the heart musculature, *Mechanisms of Development*, 128 (3–4), pp. 222–233. DOI:10.1016/j.mod.2011.01.001.
- Shao, J. and Diamond, M. I. (2007) Polyglutamine diseases: emerging concepts in pathogenesis and therapy, *Human Molecular Genetics*, 16 (R2), pp. R115–R123. DOI:10.1093/hmg/ddm213.
- Shapiro, H. (1932) The rate of oviposition in the fruit fly, Drosophila, *The Biological Bulletin*, 63 (3), pp. 456–471.

- Shaw, D. J., McCurrach, M., Rundle, S. A., Harley, H. G., Crow, S. R., Sohn, R., *et al.* (1993) Genomic organization and transcriptional units at the myotonic dystrophy locus, *Genomics*, 18 (3), pp. 673–679.
- Shelbourne, P., Winqvist, R., Kunert, E., Davies, J., Leisti, J., Thiele, H., *et al.* (1992) Unstable DNA may be responsible for the incomplete penetrance of the myotonic dystrophy phenotype, *Human Molecular Genetics*, 1 (7), pp. 467–473.
- Sicot, G., Gourdon, G. and Gomes-Pereira, M. (2011) Myotonic dystrophy, when simple repeats reveal complex pathogenic entities: new findings and future challenges, *Human Molecular Genetics*, 20 (R2), pp. R116–R123. DOI:10.1093/hmg/ddr343.
- Sicot, G. and Gomes-Pereira, M. (2013) RNA toxicity in human disease and animal models: From the uncovering of a new mechanism to the development of promising therapies, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1832 (9), pp. 1390–1409. DOI:10.1016/j.bbadis.2013.03.002.
- Smith, K. G., Jie, J., Fox, G. E. and Gao, X. (1995) DNA CTG triplet repeats involved in dynamic mutations of neurologically related gene sequences form stable duplexes, *Nucleic Acids Research*, 23 (21), pp. 4303–4311. DOI:10.1093/nar/23.21.4303.
- Sparrow, J., Hughes, S. M. and Segalat, L. (2008) Other model organisms for sarcomeric muscle diseases, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 642, pp. 192–206.
- Spilker, K. A., Wang, G. J., Tugizova, M. S. and Shen, K. (2012) Caenorhabditis elegans Muscleblind homolog mbl-1 functions in neurons to regulate synapse formation, *Neural Development*, 7, pp. 7. DOI:10.1186/1749-8104-7-7.
- Steinberg, H. and Wagner, A. (2008) [Hans Steinert: 100 years of myotonic dystrophy], *Der Nervenarzt*, 79 (8), pp. 961–962, 965–970. DOI:10.1007/s00115-008-2502-6.
- Stojanovic, V. R., Peric, S., Paunic, T., Pavlovic, S., Cvitan, E., Basta, I., *et al.* (2013) Cardiologic predictors of sudden death in patients with myotonic dystrophy type 1, *Journal of Clinical Neuroscience*, 20 (7), pp. 1002–1006. DOI:10.1016/j.jocn.2012.09.014.
- Storbeck, C. J., Drmanic, S., Daniel, K., Waring, J. D., Jirik, F. R., Parry, D. J., *et al.* (2004) Inhibition of myogenesis in transgenic mice expressing the human DMPK 3'-UTR, *Human Molecular Genetics*, 13 (6), pp. 589–600. DOI:10.1093/hmg/ddh064.
- Suominen, T., Bachinski, L. L., Auvinen, S., Hackman, P., Baggerly, K. A., Angelini, C., *et al.* (2011) Population frequency of myotonic dystrophy: higher than expected frequency of myotonic dystrophy type 2 (DM2) mutation in Finland, *European Journal of Human Genetics*, 19 (7), pp. 776–782. DOI:10.1038/ejhg.2011.23.
- Taghli-Lamalle, O., Plantié, E. and Jagla, K. (2016) Drosophila in the Heart of Understanding Cardiac Diseases: Modeling Channelopathies and Cardiomyopathies in the Fruitfly, *Journal of Cardiovascular Development and Disease*, 3 (1), pp. 7. DOI:10.3390/jcdd3010007.
- Tallafuss, A., Washbourne, P. and Postlethwait, J. (2014) Temporally and spatially restricted gene expression profiling, *Current Genomics*, 15 (4), pp. 278–292. DOI:10.2174/1389202915666140602230106.
- Talmadge, R. J., Roy, R. R. and Edgerton, V. R. (1993) Muscle fiber types and function, *Current Opinion in Rheumatology*, 5 (6), pp. 695–705.
- Taneja (1995) Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues,

*The Journal of Cell Biology*, 128 (6), pp. 995–1002.

Tang, Z. Z., Yarotsky, V., Wei, L., Sobczak, K., Nakamori, M., Eichinger, K., *et al.* (2012) Muscle weakness in myotonic dystrophy associated with misregulated splicing and altered gating of Ca(V)1.1 calcium channel, *Human Molecular Genetics*, 21 (6), pp. 1312–1324. DOI:10.1093/hmg/ddr568.

Tapscott, S. J. (2000) Deconstructing Myotonic Dystrophy, *Science*, 289 (5485), pp. 1701–1702. DOI:10.1126/science.289.5485.1701.

Taylor, M. V. (2000) Muscle development: molecules of myoblast fusion, *Current Biology*, 10 (17), pp. R646–R648.

Teplova, M. and Patel, D. J. (2008) Structural insights into RNA recognition by the alternative-splicing regulator muscleblind-like MBNL1, *Nature Structural & Molecular Biology*, 15 (12), pp. 1343–1351. DOI:10.1038/nsmb.1519.

Tetsuo Ashizawa and Sarkar, P. S. (2011) Myotonic dystrophy types 1 and 2, *Handbook of Clinical Neurology*, 101, pp. 193–237. DOI:10.1016/B978-0-08-045031-5.00015-3.

Theadom, A., Rodrigues, M., Roxburgh, R., Balalla, S., Higgins, C., Bhattacharjee, R., *et al.* (2014) Prevalence of Muscular Dystrophies: A Systematic Literature Review, *Neuroepidemiology*, 43 (3–4), pp. 259–268. DOI:10.1159/000369343.

Thisse, C., Perrin-Schmitt, F., Stoetzel, C. and Thisse, B. (1991) Sequence-specific transactivation of the *Drosophila* twist gene by the dorsal gene product, *Cell*, 65 (7), pp. 1191–1201.

Thornell, L.-E., Lindstöm, M., Renault, V., Klein, A., Mouly, V., Ansved, T., *et al.* (2009) Satellite cell dysfunction contributes to the progressive muscle atrophy in myotonic dystrophy type 1, *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 35 (6), pp. 603–613. DOI:10.1111/j.1365-2990.2009.01014.x.

Thornton, C. A., Johnson, K. and Moxley, R. T. (1994) Myotonic dystrophy patients have larger CTG expansions in skeletal muscle than in leukocytes, *Annals of Neurology*, 35 (1), pp. 104–107. DOI:10.1002/ana.410350116.

Thornton, C. A., Wymer, J. P., Simmons, Z., McClain, C. and Moxley, R. T. (1997) Expansion of the myotonic dystrophy CTG repeat reduces expression of the flanking DMAHP gene, *Nature Genetics*, 16 (4), pp. 407–409. DOI:10.1038/ng0897-407.

Tian, B. and Manley, J. L. (2013) Alternative cleavage and polyadenylation: the long and short of it, *Trends in Biochemical Sciences*, 38 (6), pp. 312–320. DOI:10.1016/j.tibs.2013.03.005.

Tian, B., White, R. J., Xia, T., Welle, S., Turner, D. H., Mathews, M. B., *et al.* (2000) Expanded CUG repeat RNAs form hairpins that activate the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR, *RNA (New York, N.Y.)*, 6 (1), pp. 79–87.

Timchenko, L. T., Miller, J. W., Timchenko, N. A., DeVore, D. R., Datar, K. V., Lin, L., *et al.* (1996a) Identification of a (CUG)<sub>n</sub> triplet repeat RNA-binding protein and its expression in myotonic dystrophy, *Nucleic Acids Research*, 24 (22), pp. 4407–4414.

Timchenko, L. T., Miller, J. W., Timchenko, N. A., DeVore, D. R., Datar, K. V., Lin, L., *et al.* (1996b) Identification of a (CUG)<sub>n</sub> triplet repeat RNA-binding protein and its expression in myotonic dystrophy., *Nucleic Acids Research*, 24 (22), pp. 4407–4414.

Timchenko, N. A., Cai, Z.-J., Welm, A. L., Reddy, S., Ashizawa, T. and Timchenko, L. T. (2001) RNA CUG Repeats Sequester CUGBP1 and Alter Protein Levels and Activity of CUGBP1, *Journal of Biological Chemistry*, 276 (11), pp. 7820–7826. DOI:10.1074/jbc.M005960200.

- Timchenko, N. A., Patel, R., Iakova, P., Cai, Z.-J., Quan, L. and Timchenko, L. T. (2004) Overexpression of CUG Triplet Repeat-binding Protein, CUGBP1, in Mice Inhibits Myogenesis, *Journal of Biological Chemistry*, 279 (13), pp. 13129–13139. DOI:10.1074/jbc.M312923200.
- Tixier, V., Bataillé, L. and Jagla, K. (2010) Diversification of muscle types: Recent insights from *Drosophila*, *Experimental Cell Research*, 316 (18), pp. 3019–3027. DOI:10.1016/j.yexcr.2010.07.013.
- Todd, P. K., Ackall, F. Y., Hur, J., Sharma, K., Paulson, H. L. and Dowling, J. J. (2014) Transcriptional changes and developmental abnormalities in a zebrafish model of myotonic dystrophy type 1, *Disease Models & Mechanisms*, 7 (1), pp. 143–155. DOI:10.1242/dmm.012427.
- Tohgi, H., Kawamorita, A., Utsugisawa, K., Yamagata, M. and Sano, M. (1994) Muscle histopathology in myotonic dystrophy in relation to age and muscular weakness, *Muscle & Nerve*, 17 (9), pp. 1037–1043. DOI:10.1002/mus.880170911.
- Tortora, G. J. and Grabowski, S. R. (1994) *Principes d'anatomie et de physiologie*. De Boeck.
- Ulane, C. M., Teed, S. and Sampson, J. (2014) Recent advances in myotonic dystrophy type 2, *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 14 (2), pp. 429. DOI:10.1007/s11910-013-0429-1.
- Valaperta, R., Lombardi, F., Cardani, R., Fossati, B., Brignonzi, E., Merli, I., *et al.* (2015) Development and Validation of a New Molecular Diagnostic Assay for Detection of Myotonic Dystrophy Type 2, *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 19 (12), pp. 703–709. DOI:10.1089/gtmb.2015.0135.
- Van Wagoner, D. R., Pond, A. L., McCarthy, P. M., Trimmer, J. S. and Nerbonne, J. M. (1997) Outward K<sup>+</sup> current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation, *Circ Res*, 80 (6), pp. 772–81.
- Venken, K. J. T. and Bellen, H. J. (2005) Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*, *Nature Reviews Genetics*, 6 (3), pp. 167–178. DOI:10.1038/nrg1553.
- Vihola, A., Bachinski, L. L., Sirtio, M., Olufemi, S.-E., Hajibashi, S., Baggerly, K. A., *et al.* (2010) Differences in aberrant expression and splicing of sarcomeric proteins in the myotonic dystrophies DM1 and DM2, *Acta Neuropathologica*, 119 (4), pp. 465–479. DOI:10.1007/s00401-010-0637-6.
- Vlasova, I. A. and Bohjanen, P. R. (2008) Posttranscriptional regulation of gene networks by GU-rich elements and CELF proteins, *RNA Biology*, 5 (4), pp. 201–207.
- Vlasova, I. A., Tahoe, N. M., Fan, D., Larsson, O., Rattenbacher, B., SternJohn, J. R., *et al.* (2008) Conserved GU-Rich Elements Mediate mRNA Decay by Binding to CUG-Binding Protein 1, *Molecular Cell*, 29 (2), pp. 263–270. DOI:10.1016/j.molcel.2007.11.024.
- Vogler, J., Breithardt, G. and Eckardt, L. (2012) Bradyarrhythmias and Conduction Blocks, *Revista Española de Cardiología (English Edition)*, 65 (7), pp. 656–667. DOI:10.1016/j.rec.2012.01.027.
- Wahbi, K., Algalarrondo, V., Bécane, H. M., Fressart, V., Beldjord, C., Azibi, K., *et al.* (2013) Brugada syndrome and abnormal splicing of SCN5A in myotonic dystrophy type 1, *Archives of Cardiovascular Diseases*, 106 (12), pp. 635–643. DOI:10.1016/j.acvd.2013.08.003.
- Wahbi K, Meune C, Porcher R and et al (2012) ELeCtrophysiological study with prophylactic pacing and survival in adults with myotonic dystrophy and conduction system disease, *JAMA*, 307 (12), pp. 1292–1301. DOI:10.1001/jama.2012.346.
- Wang, J., Pegoraro, E., Menegazzo, E., Gennarelli, M., Hoop, R. C., Angelini, C., *et al.* (1995) Myotonic dystrophy: evidence for a possible dominant-negative RNA mutation, *Human Molecular Genetics*, 4 (4), pp. 599–606. DOI:10.1093/hmg/4.4.599.

- Wang, G.-S., Kearney, D. L., De Biasi, M., Taffet, G. and Cooper, T. A. (2007) Elevation of RNA-binding protein CUGBP1 is an early event in an inducible heart-specific mouse model of myotonic dystrophy, *Journal of Clinical Investigation*, 117 (10), pp. 2802–2811. DOI:10.1172/JCI32308.
- Wang, L.-C., Hung, W.-T., Pan, H., Chen, K.-Y., Wu, Y.-C., Liu, Y.-F., *et al.* (2008) Growth-dependent effect of muscleblind knockdown on *Caenorhabditis elegans*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 366 (3), pp. 705–709. DOI:10.1016/j.bbrc.2007.12.024.
- Wang, G.-S., Kuyumcu-Martinez, M. N., Sarma, S., Mathur, N., Wehrens, X. H. T. and Cooper, T. A. (2009) PKC inhibition ameliorates the cardiac phenotype in a mouse model of myotonic dystrophy type 1, *Journal of Clinical Investigation*, 119 (12), pp. 3797–3806. DOI:10.1172/JCI37976.
- Wang, L.-C., Chen, K.-Y., Pan, H., Wu, C.-C., Chen, P.-H., Liao, Y.-T., *et al.* (2011) Muscleblind participates in RNA toxicity of expanded CAG and CUG repeats in *Caenorhabditis elegans*, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68 (7), pp. 1255–1267. DOI:10.1007/s00018-010-0522-4.
- Wang, E. T., Cody, N. A. L., Jog, S., Biancolella, M., Wang, T. T., Treacy, D. J., *et al.* (2012) Transcriptome-wide Regulation of Pre-mRNA Splicing and mRNA Localization by Muscleblind Proteins, *Cell*, 150 (4), pp. 710–724. DOI:10.1016/j.cell.2012.06.041.
- Wang, E. T., Ward, A. J., Cherone, J. M., Giudice, J., Wang, T. T., Treacy, D. J., *et al.* (2015) Antagonistic regulation of mRNA expression and splicing by CELF and MBNL proteins, *Genome Research*, 25 (6), pp. 858–871. DOI:10.1101/gr.184390.114.
- Wansink, D. G., Herpen, R. E. M. A. van, Coerwinkel-Driessen, M. M., Groenen, P. J. T. A., Hemmings, B. A. and Wieringa, B. (2003) Alternative Splicing Controls Myotonic Dystrophy Protein Kinase Structure, Enzymatic Activity, and Subcellular Localization, *Molecular and Cellular Biology*, 23 (16), pp. 5489–5501. DOI:10.1128/MCB.23.16.5489-5501.2003.
- Ward, E. J. and Skeath, J. B. (2000) Characterization of a novel subset of cardiac cells and their progenitors in the *Drosophila* embryo, *Development (Cambridge, England)*, 127 (22), pp. 4959–4969.
- Wasserthal, L. T. (2007) *Drosophila* flies combine periodic heartbeat reversal with a circulation in the anterior body mediated by a newly discovered anterior pair of ostial valves and ‘venous’ channels, *Journal of Experimental Biology*, 210 (21), pp. 3707–3719. DOI:10.1242/jeb.007864.
- Weintraub, H., Davis, R., Tapscott, S., Thayer, M., Krause, M., Benezra, R., *et al.* (1991) The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage, *Science (New York, N.Y.)*, 251 (4995), pp. 761–766.
- Wells, R. D., Dere, R., Hebert, M. L., Napierala, M. and Son, L. S. (2005) Advances in mechanisms of genetic instability related to hereditary neurological diseases, *Nucleic Acids Research*, 33 (12), pp. 3785–3798. DOI:10.1093/nar/gki697.
- Wessells, R. J., Fitzgerald, E., Cypser, J. R., Tatar, M. and Bodmer, R. (2004) Insulin regulation of heart function in aging fruit flies, *Nature Genetics*, 36 (12), pp. 1275–1281. DOI:10.1038/ng1476.
- Westerlaken, J. H., Van der Zee, C. E., Peters, W. and Wieringa, B. (2003) The DMWD protein from the myotonic dystrophy (DM1) gene region is developmentally regulated and is present most prominently in synapse-dense brain areas, *Brain Research*, 971 (1), pp. 116–127.
- Whiting, E. J., Waring, J. D., Tamai, K., Somerville, M. J., Hincke, M., Staines, W. A., *et al.* (1995) Characterization of myotonic dystrophy kinase (DMK) protein in human and rodent muscle and central nervous tissue, *Human Molecular Genetics*, 4 (6), pp. 1063–1072. DOI:10.1093/hmg/4.6.1063.
- Wit, A. L., Weiss, M. B., Berkowitz, W. D., Rosen, K. M., Steiner, C. and Damato, A. N. (1970)



- Patterns of atrioventricular conduction in the human heart, *Circulation Research*, 27 (3), pp. 345–359.
- Wolf, M. J. and Rockman, H. A. (2011) *Drosophila*, Genetic Screens, and Cardiac Function, *Circulation Research*, 109 (7), pp. 794–806. DOI:10.1161/CIRCRESAHA.111.244897.
- Wong, L. J., Ashizawa, T., Monckton, D. G., Caskey, C. T. and Richards, C. S. (1995) Somatic heterogeneity of the CTG repeat in myotonic dystrophy is age and size dependent., *American Journal of Human Genetics*, 56 (1), pp. 114.
- Xinran Xu, F. D. (2014) The Role of miR-1 in the Heart: From Cardiac Morphogenesis to Physiological Function, *Human Genetics & Embryology*, 4 (1). DOI:10.4172/2161-0436.1000119.
- Yadava, R. S., Frenzel-McCardell, C. D., Yu, Q., Srinivasan, V., Tucker, A. L., Puymirat, J., *et al.* (2008) RNA toxicity in myotonic muscular dystrophy induces NKX2-5 expression, *Nature Genetics*, 40 (1), pp. 61–68. DOI:10.1038/ng.2007.28.
- Yang, W., Tu, Z., Sun, Q. and Li, X.-J. (2016) CRISPR/Cas9: Implications for Modeling and Therapy of Neurodegenerative Diseases, *Frontiers in Molecular Neuroscience*, pp. 30. DOI:10.3389/fnmol.2016.00030.
- Yotova, V., Labuda, D., Zietkiewicz, E., Gehl, D., Lovell, A., Lefebvre, J.-F., *et al.* (2005) Anatomy of a founder effect: myotonic dystrophy in Northeastern Quebec, *Human Genetics*, 117 (2–3), pp. 177–187. DOI:10.1007/s00439-005-1298-8.
- Yu, Z., Teng, X. and Bonini, N. M. (2011) Triplet Repeat–Derived siRNAs Enhance RNA–Mediated Toxicity in a *Drosophila* Model for Myotonic Dystrophy, *PLoS Genetics*, 7 (3), pp. e1001340. DOI:10.1371/journal.pgen.1001340.
- Zaffran, S., Astier, M., Gratecos, D., Guillen, A. and Sémériva, M. (1995) Cellular interactions during heart morphogenesis in the *Drosophila* embryo, *Biology of the Cell / Under the Auspices of the European Cell Biology Organization*, 84 (1–2), pp. 13–24.
- Zatz, M., Passos-Bueno, M. R., Cerqueira, A., Marie, S. K., Vainzof, M. and Pavanello, R. C. M. (1995) Analysis of the CTG repeat in skeletal muscle of young and adult myotonic dystrophy patients: when does the expansion occur?, *Human Molecular Genetics*, 4 (3), pp. 401–406. DOI:10.1093/hmg/4.3.401.
- Zeitouni, B., Sénatore, S., Séverac, D., Aknin, C., Sémériva, M. and Perrin, L. (2007) Signalling Pathways Involved in Adult Heart Formation Revealed by Gene Expression Profiling in *Drosophila*, *PLoS Genetics*, 3 (10), pp. e174. DOI:10.1371/journal.pgen.0030174.
- Zhang, F., Zhao, Y., Chao, Y., Muir, K. and Han, Z. (2013) Cubilin and Amnionless Mediate Protein Reabsorption in *Drosophila* Nephrocytes, *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 24 (2), pp. 209–216. DOI:10.1681/ASN.2012080795.
- Zinn, K. (2009) Choosing the road less traveled by: a ligand-receptor system that controls target recognition by *Drosophila* motor axons, *Genes & Development*, 23 (9), pp. 1042–1045. DOI:10.1101/gad.1803009.
- Zu, T., Gibbens, B., Doty, N. S., Gomes-Pereira, M., Huguet, A., Stone, M. D., *et al.* (2011) Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (1), pp. 260–265. DOI:10.1073/pnas.1013343108.







# **Annexes**



Search Term	Human Symbol	DIOPT Score	Weighted Score	Rank	Best Score	Best Score Reverse
Amy-d	AMY2B	10	9.819	high	Yes	Yes
Amy-d	AMY2A	8	7.919	moderate	No	Yes
Amy-d	AMY1C	8	7.816	moderate	No	Yes
Amy-d	AMY1B	7	6.851	moderate	No	Yes
Amy-d	AMY1A	6	5.901	moderate	No	Yes
cyp6w1	CYP3A4	4	3.864	moderate	Yes	No
cyp6w1	TBXAS1	2	2.004	low	No	No
cyp6w1	CYP3A5	2	1.911	low	No	No
mhc	MYH7	8	7.979	high	Yes	Yes
mhc	MYH6	8	7.809	high	Yes	Yes
mhc	MYH4	7	6.929	moderate	No	Yes
mhc	MYH1	7	6.849	moderate	No	Yes
mhc	MYH7B	7	6.806	moderate	No	Yes
mhc	MYH15	7	6.806	moderate	No	Yes
mhc	MYH3	6	5.926	moderate	No	Yes
mhc	MYH2	6	5.926	moderate	No	Yes
mhc	MYH13	6	5.886	moderate	No	Yes
mhc	MYH8	5	4.916	moderate	No	Yes
CG32444	GALM	7	6.796	moderate	Yes	No
Up	TNNT2	6	5.825	high	Yes	Yes
Up	TNNT1	5	4.978	moderate	No	Yes
Up	TNNT3	5	4.875	moderate	No	Yes
CG17597	SCP2	9	8.819	moderate	Yes	No
smvt	SLC5A6	2	2.101	moderate	Yes	No
smvt	SLC5A5	2	1.931	moderate	Yes	No
smvt	SLC5A8	2	1.931	moderate	Yes	No
smvt	SLC5A12	2	1.931	moderate	Yes	No
smvt	SLC5A1	2	1.88	high	Yes	Yes
Cyp4e1	CYP4V2	3	3.001	moderate	Yes	No
Cyp4e1	CYP4F12	3	2.811	high	Yes	Yes
Cyp4e1	CYP4A11	2	1.901	low	No	No
Cyp4e1	CYP4B1	2	1.901	moderate	No	Yes
Cyp4e1	CYP4F11	2	1.901	moderate	No	Yes
Cyp4e1	CYP4F2	2	1.901	low	No	No
Cyp4e1	CYP4X1	2	1.901	low	No	No
Cyp4e1	CYP4A22	2	1.901	low	No	No
Cyp4e1	CYP4F8	2	1.81	moderate	No	Yes
CG33138	GBE1	11	10.769	high	Yes	Yes
apc	APC	7	6.804	high	Yes	Yes
apc	APC	7	6.806	high	Yes	Yes
apc	AXIN1	7	6.718	high	Yes	Yes
apc	AXIN2	6	5.708	moderate	No	Yes

## Annexe 1. Résultats de l'analyse d'orthologie entre la drosophile et l'Homme pour les candidats CTG-dépendants.

L'analyse d'homologie entre les gènes candidats chez la drosophile et l'Homme a été faite à l'aide de l'outil en ligne DIOPT (DRSC Integrative Ortholog Prediction Tool). Les orthologues humains sont classés en fonction d'un score calculé à partir des résultats d'homologie de plusieurs bases de données. L'association du score DIOPT et du score basé sur la conservation de Gene Ontology (weighted score) permet de classer les orthologues putatifs en fonction de leur probabilité de conservation comme élevée, modérée ou faible.

Search Term	Mouse Symbol	DIOPT Score	Weighted Score	Rank	Best Score	Best Score Reverse	Search Term	Mouse Symbol	DIOPT Score	Weighted Score	Rank	Best Score	Best Score Reverse
CG17597	Scp2	10	9.769	high	Yes	Yes	Amy-d	Amy2a2	9	8.719	high	Yes	Yes
smvt	Slc5a6	2	2.101	moderate	Yes	No	Amy-d	Amy1	8	7.816	moderate	No	Yes
smvt	Slc5a8	2	1.931	moderate	Yes	No	Amy-d	Amy2a5	8	7.811	moderate	No	Yes
smvt	Slc5a12	2	1.931	moderate	Yes	No	Amy-d	Amy2a1	5	5.001	moderate	No	Yes
smvt	Slc5a5	2	1.931	moderate	Yes	No	Amy-d	Amy2a3	5	4.791	moderate	No	Yes
smvt	Slc5a1	2	1.88	high	Yes	Yes	Amy-d	Amy2a4	5	4.791	moderate	No	Yes
Cyp4e1	Cyp4v3	3	3.001	moderate	Yes	No	Amy-d	Amy2b	2	1.92	moderate	No	Yes
Cyp4e1	Cyp4f37	3	2.811	high	Yes	Yes	cyp6w1	Cyp3a13	3	2.954	moderate	Yes	No
Cyp4e1	Cyp4a10	3	2.811	high	Yes	Yes	cyp6w1	Cyp3a11	2	2.004	low	No	No
Cyp4e1	Cyp4f16	3	2.811	high	Yes	Yes	cyp6w1	Cyp3a44	2	2.004	low	No	No
Cyp4e1	Cyp4f18	3	2.811	moderate	Yes	No	cyp6w1	Cyp3a41b	2	2.004	low	No	No
Cyp4e1	Cyp4a32	3	2.811	moderate	Yes	No	cyp6w1	Tbxas1	2	2.004	low	No	No
Cyp4e1	Cyp4f15	2	1.901	low	No	No	mhc	Myh6	8	7.909	high	Yes	Yes
Cyp4e1	Cyp4a12b	2	1.901	moderate	No	Yes	mhc	Myh7	8	7.908	high	Yes	Yes
Cyp4e1	Cyp4a14	2	1.901	moderate	No	Yes	mhc	Myh7b	6	5.896	moderate	No	Yes
Cyp4e1	Cyp4f13	2	1.901	moderate	No	Yes	mhc	Myh13	6	5.886	moderate	No	Yes
Cyp4e1	Cyp4f14	2	1.901	low	No	No	mhc	Myh4	5	5.018	moderate	No	Yes
Cyp4e1	Cyp4f39	2	1.901	moderate	No	Yes	mhc	Myh1	5	5.009	moderate	No	Yes
Cyp4e1	Cyp4b1	2	1.901	moderate	No	Yes	mhc	Myh3	4	4.015	moderate	No	Yes
Cyp4e1	Cyp4a31	2	1.901	moderate	No	Yes	mhc	Myh8	4	4.006	moderate	No	Yes
Cyp4e1	Cyp4a12a	2	1.901	low	No	No	mhc	Myh2	4	4.006	moderate	No	Yes
CG33138	Gbe1	10	9.768	high	Yes	Yes	mhc	Myh15	3	2.891	moderate	No	Yes
apc	Apc2	7	6.804	high	Yes	Yes	CG32444	Galm	7	6.796	moderate	Yes	No
apc	Apc	7	6.806	high	Yes	Yes	Up	Tnnt3	6	5.878	high	Yes	Yes
apc	Axin2	7	6.718	high	Yes	Yes	Up	Tnnt1	5	4.978	moderate	No	Yes
apc	Axin1	5	4.798	moderate	No	Yes	Up	Tnnt2	5	4.865	moderate	No	Yes

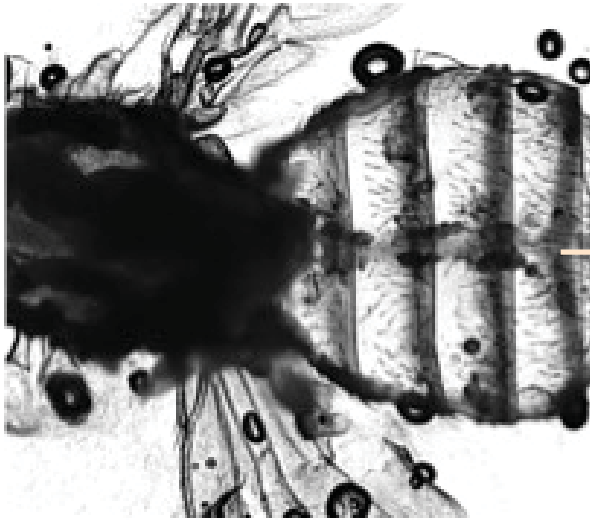
## Annexe 2. Résultats de l'analyse d'orthologie entre la drosophile et la souris pour les candidats CTG-dépendants.

L'analyse d'homologie entre les gènes candidats chez la drosophile et la souris a été faite à l'aide de l'outil en ligne DIOPT (DRSC Integrative Ortholog Prediction Tool). Les orthologues murins sont classés en fonction d'un score calculé à partir des résultats d'homologie de plusieurs bases de données. L'association du score DIOPT et du score basé sur la conservation de Gene Ontology (weighted score) permet de classer les orthologues putatifs en fonction de leur probabilité de conservation comme élevée, modérée ou faible.

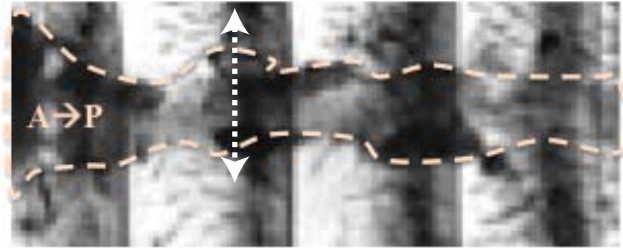
	Gène	Sens de l'amorce	Séquence 5' vers 3'
<b>Drosophile</b>	<i>Rp49</i>	F R	GCT TCA AGG GAC AGT ATC TG AAA CGC GGT TCT GCA TGA G
	<i>Hsp26</i>	F R	TCG CTT TCA TTT GCC TTA AC GTG CTC ACC GTC AGT ATT CC
	<i>CG11911</i>	F R	AAG AGG AGC AGA TGT TGG AC AAG ACC CTG CAG ACT GTG AC
	<i>CG17167</i>	F R	TCG TAT GAA CTG CTG CTT CTC TAA GAA CAA AGA GGC CAT CG
	<i>Apc</i>	F R	TGA AGC CAA GAT TCG ATT TC CAA GAT GAT TCG CTG AGT TC
	<i>CG33138</i>	F R	CGC ATC CAT TTA AAA AGC TC CGG AAT GGT TGC GAA TTA T
	<i>Cyp4e1</i>	F R	ATG GAA AAC CGA AGT TCC TC AGA GGT ATT TGT TGC GCT TC
<b>Souris</b>	<i>Rpl30</i>	F R	AGT CTC TGG AGT CGA TCA ACT AGC CAG TGT GCA TAC TCT GTA G
	<i>Rps17</i>	F R	ATG ACT TCC ACA CCA ACA AGC GCC AAC TGT AGG CTG AGT GAC
	<i>Ppia</i>	F R	GTG GTC TTT GGG AAG GTG AA TTA CAG GAC ATT GCG AGC AG
	<i>Dmpk</i>	F R	AGC CCT GGA AGA AGA GGT TC TCT CCA TCC GTT CCT GTA GC
	<i>Amy2a2</i>	F R	CTT TGG AAA TGG CCG TGT GA ATG ATC CTC CAG CAC CAT GT
	<i>Myh4</i>	F R	ACT TGG CCA GGT TGA CAT TG GCA GGA CTT GGT GGA CAA AC
	<i>Myh7</i>	F R	GAG CCT TGG ATT CTC AAA CG GTG GCT CCG AGA AAG GAA G
	<i>Scp2</i>	F R	TGA CCC ACT TTC CTC CGT AA CGA TGT CGA CGT GAT AGA GC
<i>Gbe1</i>	F R	TTA TAC CTG CGC TGG AAG TC CCC GAT GCT CGT CTG GAG	
<b>Humain</b>	<i>HsPPIA</i>	F R	GAC CCA ACA CAA ATG GTT CC TTT CAC TTT GCC AAA CAC CA
	<i>DMPK</i>	F R	CGA GAT TCT GAA GGT GAT CG AGC ATG TCC CAC TTG TTC AT
	<i>TNNT1</i>	F R	TTT CGA GCA GCG GAA GAA G TTC CTT CTC AGT TCT GAA GC
	<i>SCP2</i>	F R	CTG CAA GTG ATG GAT TTA AGG ACC ACC GAT TTT CTT CAC AA
	<i>GBE1</i>	F R	GGG AGC AGA AGG AGT TTT TC GCT CCC ATT TTC CAT AAT CC

**Annexe 3. Liste des amorces utilisées pour les RT-qPCR chez la drosophile, la souris et l'Homme.**

① Préparation semi-intacte d'un coeur de drosophile adulte

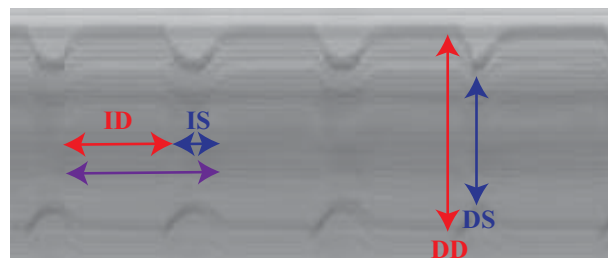


② Zoom sur le tube cardiaque et films de 30 secondes des battements cardiaques



Sélection d'une rangée verticale de pixels le long du coeur pour la génération d'un M-mode

③ Analyse des paramètres rythmiques et contractiles sur les M-modes



Parois du coeur  
Analyse des diamètres  
Diamètre diastolique (DD)  
Diamètre systolique (DS)

← Temps →

Analyse des intervalles de contraction et relaxation

Intervalle diastolique (ID)  
Intervalle systolique (IS)  
Période cardiaque

Annexe 4. La méthode SOHA pour l'analyse des paramètres cardiaques.

La méthode SOHA consiste en une dissection de coeur semi-intacte qui permet d'exposer le coeur à la caméra qui va filmer les battements cardiaques (1). On réalise ensuite des films de 30 secondes en zoomant sur les segments du coeur A3 et A4 qui sont similaires de part leur structure (2). A partir d'une rangée verticale de pixels, le logiciel Matlab génère un M-mode (3) qui permet d'analyser les paramètres contractiles (diamètres de contraction et de dilatation) et rythmiques (intervalles diastoliques, systoliques et période cardiaque) des battements du coeur.



## Annexe 5. Articles de revue rédigés durant ma thèse :

**Article 1** : Plantié, E†; Migocka-Patrzalek, M†; Daczewska, M; Jagla, K. *Model Organisms in the Fight against Muscular Dystrophy: Lessons from Drosophila and Zebrafish*. Mol. Basel Switz. 2015, 20 (4), 6237–6253

Cette revue, dans laquelle je suis co-1<sup>er</sup> auteur, a été rédigée en collaboration avec l'équipe de M. Daczewska en Pologne qui travaille sur le poisson zèbre et décrit les apports des modèles drosophile et poisson zèbre pour l'étude des maladies musculaires et en particulier des dystrophies.

**Article 2** : Taghli-Lamalle, O†; Plantié, E†; Jagla, K. *Drosophila in the Heart of Understanding Cardiac Diseases: Modeling Channelopathies and Cardiomyopathies in the Fruitfly*. J. Cardiovasc. Dev. Dis. 2016, 3 (1), 7

Cette revue rédigée avec Ouarda Taghli-Lamalle, membre de notre équipe, résume les apports de la drosophile pour la compréhension des canalopathies (atteinte des canaux ioniques) ou des cardiomyopathies.



Review

## Model Organisms in the Fight against Muscular Dystrophy: Lessons from *Drosophila* and Zebrafish

Emilie Plantié <sup>1,†</sup>, Marta Migocka-Patrzałek <sup>2,†</sup>, Małgorzata Daczewska <sup>2</sup> and Krzysztof Jagla <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> GReD (Genetics, Reproduction and Development laboratory), INSERM U1103, CNRS UMR6293, University of Clermont-Ferrand, 28 place Henri-Dunant, 63000 Clermont-Ferrand, France; E-Mail: emilie.plantie@udamail.fr

<sup>2</sup> Department of Animal Developmental Biology, Institute of Experimental Biology, University of Wrocław, 21 Sienkiewicza Street, 50-335 Wrocław, Poland; E-Mails: marta.migocka-patrzalek@uni.wroc.pl (M.M.-P.); malgorzata.daczewska@uni.wroc.pl (M.D.)

† These authors contributed equally to this work.

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: christophe.jagla@udamail.fr; Tel.: +33-473178181; Fax: +33-473276132.

Academic Editor: Leonidas A. Phylactou

Received: 24 February 2015 / Accepted: 1 April 2015 / Published: 9 April 2015

---

**Abstract:** Muscular dystrophies (MD) are a heterogeneous group of genetic disorders that cause muscle weakness, abnormal contractions and muscle wasting, often leading to premature death. More than 30 types of MD have been described so far; those most thoroughly studied are Duchenne muscular dystrophy (DMD), myotonic dystrophy type 1 (DM1) and congenital MDs. Structurally, physiologically and biochemically, MDs affect different types of muscles and cause individual symptoms such that genetic and molecular pathways underlying their pathogenesis thus remain poorly understood. To improve our knowledge of how MD-caused muscle defects arise and to find efficacious therapeutic treatments, different animal models have been generated and applied. Among these, simple non-mammalian *Drosophila* and zebrafish models have proved most useful. This review discusses how zebrafish and *Drosophila* MD have helped to identify genetic determinants of MDs and design innovative therapeutic strategies with a special focus on DMD, DM1 and congenital MDs.

**Keywords:** muscular dystrophies; animal models; *Drosophila*; zebrafish; pathophysiology; therapeutic screens

---

## 1. Introduction

Muscular dystrophies (MDs) are a heterogeneous group of inherited rare disorders primarily affecting the muscle system, causing progressive skeletal muscle weakness, and often associated with cardiomyopathy and respiratory problems [1,2]. Duchenne MD (DMD), Becker MD (BMD), Limb-Girdle MD (LGMD), myotonic dystrophy type 1 (DM1), oculo-pharyngeal MD (OPMD), fascio-scapulo-humeral MD (FSHMD), Emery-Dreifuss MD (EDMD), distal muscular dystrophy (DD) and congenital MD (CMD) are the nine most common muscular dystrophies. Among them, DMD caused by the mutation in the *Dystrophin* gene identified more than twenty years ago [3–5] still has no effective therapy, illustrating a lasting need to find efficacious treatments for MDs.

Due to technical and ethical reasons, it is not always possible to investigate disease processes directly in humans. Model organisms, both mammalian and non-mammalian, are essential to understanding normal and pathological muscle development in humans. The major non-mammalian animal models, the fruitfly *Drosophila melanogaster*, the zebrafish *Danio rerio* and the nematode *Caenorhabditis elegans*, are considered useful alternatives for studying human diseases and particularly muscular dystrophies [3]. Among them, *Drosophila melanogaster* has been used as a model organism for over 100 years, particularly in genetics, where it was useful to better understand the concept of trait heritability [4,5]. The fruitfly genome was fully sequenced in 2000 [6], revealing that key physiological processes and disease-related genes are well-conserved between flies and humans [7,8], making it a model of choice for these studies. Finally, the availability of *Drosophila* transgenic and mutant line collections facilitates functional analyses of disease genes. Compared with the fruitfly, the worm, owing to a lack of muscle cell fusion, restricted gene conservation and a short lifespan, appears suitable for studying only some aspects of muscle defects observed in MDs.

By contrast, the vertebrate model zebrafish conserves the majority (84%) of the genes known to be associated with human diseases, both rare and common [9], with significant degrees of synteny between the conserved genes [10]. The zebrafish offers many advantages: it can quickly produce a large number of externally developing, diploid embryos; the transparency of zebrafish embryos and larvae allows real-time imaging of all developmental stages; and the genome sequence, as for *Drosophila*, is available [9]. To generate disease models, three main methods are used in zebrafish: morpholino-mediated knockdown [11,12]; *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU) mutagenesis [13], which is widely used to identify new genes involved in muscles diseases [14–17]; and finally genome-editing technologies such as the clustered regularly interspaced short palindromic repeats technique (CRISPR), successfully used in both zebrafish [18–20] and *Drosophila* [21,22].

Importantly, besides gene conservation, *Drosophila* and zebrafish muscles share many structural, histological and functional similarities with human muscle [23–25]. These similarities further support the view that *Drosophila* and zebrafish models are well-suited to studying human muscle disorders including MDs.

## 2. *Drosophila* and Zebrafish Models in Understanding the Molecular Basis of Muscular Diseases

*Drosophila* and zebrafish models have been used to study human diseases for many years, and have helped us gain a better understanding of the molecular mechanisms underlying these disorders, explore therapeutic strategies and restore normal conditions in affected individuals [8,26–32].

A growing body of new models of muscular diseases is being created using these animals.

For the purpose of this review, we will focus on some particular MDs, namely DMD [33,34], DM1 [35–38] and congenital MD (Walker-Warburg syndrome [39] and CMD Type 1 A [40]), which have been modelled in both fruitfly and zebrafish.

The most common muscular dystrophies are the X-linked, lethal childhood (more severe) DMD and the (less severe) BMD, both caused by mutations in the dystrophin gene. In skeletal muscles, dystrophin associates with various proteins to form a large membrane-bound protein complex called the dystrophin-associated glycoprotein complex (DGC). DGC plays a crucial structural role in linking the actin filaments to the extracellular matrix. Mutation of the dystrophin gene destabilizes this complex and leads to progressive fibre damage, sarcolemma destabilization and leakage [41,42]. Comparative genomic studies have shown sequence conservation of dystrophin in vertebrate and invertebrate species including zebrafish and *Drosophila* [43].

The second MD described, myotonic dystrophy type 1 (DM1), is a neuromuscular disorder caused by a microsatellite CTG repeat expansion in the 3'UTR of the dystrophin myotonia protein kinase (DMPK) gene. Mutated transcripts with expanded repeats accumulate in the nuclei and sequester an alternative splicing factor, called MBNL1, causing foci formation. It leads to splicing defects that can cause a variety of symptoms, ranging from myotonia, muscle weakness to heart symptoms such as arrhythmia or conduction defects [44–47].

Although DM1 is a well-characterized disorder, its molecular mechanisms are not yet fully understood [48].

The third subgroup of MDs described here are the congenital MDs, a heterogeneous group of diseases that include the dystroglycanopathies (caused by mutations in POMT1, POMT2, FKTN, FKRP and other genes), laminin alpha-2 deficiency (CMD 1A), collagen VI-deficient CMD, SEPN1-related CMD, LMNA-related CMD (L-CMD) [49–52] and the most severe congenital MD, Walker-Warburg syndrome (WWS). This rare disorder mainly affects the ocular system and the brain, but also muscles, causing muscle weakness, mental retardation and vision impairment [53]. Several genes are involved in WWS, but major mutations target POMT1 and POMT2 genes [54].

Despite the focus on these three particular subtypes of MD, others have been characterized in *Drosophila* [33,35,36,39,55–59] and zebrafish [32,37,38,40,60–63] and are listed in Table 1.

### 2.1. *Drosophila* for Disease Modelling and Understanding of Pathogenesis Mechanisms of MD

As stated above, *Drosophila* has been used for several decades as a model organism to characterize pathogenesis mechanisms of human diseases. For example, in 2002 Takeyama and co-workers developed a spinobulbar muscular atrophy (SBMA) *Drosophila* model, consisting of CAG expansion in androgen receptor (AR) gene, and showed that a ligand-dependent activation of AR is necessary for motor neuron degeneration [64]. Similarly, *smn* hypomorphic mutants [65] were found to recapitulate

symptoms observed in spinal muscular atrophy (SMA), and this model helped to identify the involvement of the BMP pathway in SMA pathogenesis [66]. Among many others, *Drosophila* models were also instrumental in gaining insights into the pathogenesis of OPMD [57] and Barth syndrome [67].

**Table 1.** Major Muscular Dystrophies (MD) modelled in *Drosophila* and zebrafish.

Disease	Mutated Gene	Animal Model		Mutation Type in Animal Models		Shared Symptoms with Patients	Ref.
		D	Z	<i>Drosophila</i>	Zebrafish		
<b>DMD/BMD</b>	Dystrophin	✓	✓	Dys deletion mutants	Nonsense mutation in dystrophin gene	Age-dependent muscle degeneration/Loss of muscle integrity	[33,55]
					Splice mutation in dystrophin gene		[60–62]
<b>LGMD</b>	Lamin A/C	✓	X	Partial/null mutations in the <i>Drosophila</i> $\delta$ -sarcoglycan locus	X	Reduced lifespan & mobility in aged flies	[56]
	Sarcoglycan						
<b>DM1</b>	DMPK	✓	✓	Expression of CTG repeats in adult/larval muscle	MBNL gene knockdown	Myotonia/Muscle defects Splicing defects Foci formation	[35,36]
					Injection of CUG repeat-containing mRNA		[37,38,68]
<b>OPMD</b>	PABPN1	✓	X	Human PABPN1-17ala expressed in adult muscle	X	Progressive muscle degeneration Nuclear inclusions	[57]
<b>EDMD</b>	Emerin Lamin A/C	✓	X	Transgenic flies expressing a mutant form of Lamin-C (lacking the first 42 AA)	X	Muscle defects Early death	[58,59]
<b>CMD</b>	POMT1 Fukutin Laminin $\alpha$ 2	✓	✓	Mutants for POMT1 & POMT2 <i>Drosophila</i> orthologs	Point mutation in laminin $\alpha$ 2 gene	Shortened lifespan Age-dependent severity of muscle phenotypes/Disorder of primary motor neurons innervation	[39,40]

Notes: Abbreviations: **D** *Drosophila*, **Z** Zebrafish, **DMD** Duchenne MD, **BMD** Becker MD, **LGMD** Limb-Girdle MD, **DM1** Myotonic Dystrophy Type 1, **OPMD** Oculo-Pharyngeal MD, **EDMD** Emery-Dreifuss MD, **CMD** Congenital MD. More comprehensive tables of additional models can be found in other recent reviews such as [32,63].

Regarding DMD, the conservation of genes forming the DGC complex and their reduced number makes the fly a good model to study DMD [69]. To model this disease, mutations in Dg and Dys, as well as RNAi lines against these genes, have been generated and analysed. Shcherbata *et al.* demonstrated mobility defects and age-dependent muscle degeneration and neural defects in *dys* mutants [33]. Also, the specific loss of dys in the heart led to an age-dependent disruption of the myofibrillar organization within the myocardium, and to alterations in cardiac performance and development of dilated cardiomyopathy [70]. More recently, a study of the *Drosophila* DMD model

exposed to chronic hypoxia revealed impairment of the muscle function *in vivo* [55]. It has been assumed that systemic hypoxia could contribute to DMD pathophysiology in patients. Moreover, *mdx* mice (the naturally occurring DMD model) present worsened diaphragmatic dysfunction following hypoxia [71]. These models confirm that *Drosophila* is a suitable model to study DMD, demonstrating that Dg and Dys interaction is necessary for muscle maintenance, and that the reduced Dys level could explain the degeneration observed in patients.

In addition to DMD, the RNA-dominant disorder DM1 has been modelled in the fruitfly by several groups. First in 2005, Houseley and colleagues showed the sequestration of the MBNL1 orthologue in muscle nuclei by CTG<sub>162</sub> toxic repeats, but did not detect any locomotor activity perturbation, muscle defects or reduced lifespan [72]. Shortly afterwards, another DM1 model with 480 interrupted CUG repeats was generated, again showing the accumulation of toxic repeats in nuclear foci, colocalizing with Mbl (MBNL1 orthologue). The DM1 flies exhibited muscle wasting and degeneration, also seen in patients as a result of decreased MBNL1 and increased CUGBP1 levels [35]. More recently, our group generated novel DM1 models consisting of inducible transgenic lines carrying increasing numbers of CTG repeats, which could allow the assessment of effects of CTG repeat size. In addition to foci formation and reduced motility, we observed a hypercontracted phenotype in DM1 larvae, reminiscent of myotonia in patients. It could involve the calcium pump dSERCA, an Mbl splice target because the membrane dSERCA isoform was sufficient to rescue this DM1-induced hypercontraction phenotype in our model. Also, we demonstrated that nuclear accumulation of toxic CUG repeats can affect gene expression independently of splicing [36].

Regarding Walker-Warburg syndrome (WWS), Wairkar and co-workers performed a screen for synaptic abnormalities in *Drosophila* and identified mutations in POMT1 orthologue, *rotated abdomen (rt)*. They demonstrated that *rt* is required to glycosylate the *Drosophila* dystroglycan ortholog Dg *in vivo*, suggesting that this defective glycosylation in *rt* mutants could impair synaptic transmission and cause the mental symptoms [73]. Muscle structure and behaviour of knockdown flies for POMT1 and POMT2 orthologues, *rt* and *twisted (tw)* respectively, have also been analysed by Ueyama *et al.* [39]. They demonstrated a reduced lifespan, together with locomotion defects and adversely affected muscle structure, also seen in WWS patients. Moreover, they described an age-related worsening of the ultrastructural abnormalities in muscles, associated with excessive apoptosis of myoblasts in the wing disc of *tw* mutants (POMT2 orthologue) [39]. The authors proposed a new mechanism caused by mutation in POMT genes, involving increased apoptosis that could explain muscle disorganization and muscle defects observed in the disease.

## 2.2. Zebrafish Models Designed to Dissect the Molecular Mechanisms of MD

Among all animal model organisms, many unique advantages of the zebrafish (described above) make it an attractive model for human diseases and for dissecting pathological processes. Zebrafish models have been used, for example, to study congenital and hereditary diseases; carcinogenesis; infection; inflammation and wound healing; immunological, metabolic, endocrine and nutritional diseases; and psychological and behavioural abnormalities, as reviewed in [29].

One of the animal models for DMD investigation are naturally isolated *mdx* mouse mutants. However, *mdx* mice have only a mild DMD phenotype owing to the high regenerative capacity of



mouse muscles [74–76]. Another widely used model to study MD is the zebrafish. Different groups reported that the zebrafish carries an orthologue of the human dystrophin gene, encoding a 400 kDa protein that mimics the subcellular pattern of human dystrophin in adult muscles [77,78]. Large-scale mutagenesis screening in zebrafish has identified a large number of mutants that affect muscle formation, one class of which, called “dystrophic class mutants,” presented damaged and disorganized structure of muscles under polarized light. Among them, the *sapje* (*sap*) allele has been shown to carry mutation at *zf-dystrophin*, the zebrafish orthologue of human DMD locus [13,61,79]. This nonsense mutation resulting in a premature stop codon within the N-terminal actin-binding domain of *dystrophin* removes the large muscle-specific isoform, and causes progressive muscle degeneration by disrupting the link between the actin cytoskeleton and the extracellular matrix in skeletal muscles. Compared with the *mdx* mice, homozygous *sap* mutant embryos display more severe phenotypes, sharing a large number of similarities with human disease, e.g., humans and zebrafish lack the compensatory levels of utrophin thought to protect *mdx* mice [80,81]. In homozygous *sap* mutants, dystrophin deficiency causes a progressive loss of muscle integrity as a result of muscle attachment failure at the embryonic myotendinous junction (MTJ) [62]. It was also found that in *sap* mutants, fibre degeneration involves separation of the terminal sarcomeres from the terminal sarcolemma, as well as detachment of the terminal sarcolemma from the myoseptum [82]. Furthermore, myofibrils in *sap* mutants shown by transmission electron microscopy exhibit nuclear condensation indicating cell death [61].

Numerous animal models of DM1 have already been generated, but they all have some limitations. Making use of the advantages of zebrafish, Machuca-Tzili and co-workers applied this model to determine the role of MBNL in DM1 pathogenesis. The morpholino knockdown model showed the essential role of the *MBNL2* gene during embryonic development. A lack of *mbnl2* caused muscle defects and splicing abnormalities, typical of DM1. An absence of the *mbnl2* gene also led to disruption of myofibril organization in skeletal and heart muscles, and reduction of the amount of slow and fast muscles. The phenotypes of *mbnl2*-morphants were specifically due to *mbnl2* knockdown and were rescued with *mbnl2* mRNA [37]. More recently, Todd *et al.* described a new zebrafish model designed to explore the impact of CUG repeat expression during early development. This model of DM1 is based on injection of mRNA, carrying expanded CUG repeats, at a single-cell stage zebrafish embryo. This leads to alteration in fish morphology, behaviour and transcriptional activity during early development. CUG repeat-containing mRNA degrades progressively and is no longer detected after 72 hpf; embryos that survive the first 48 h thus show no significant alterations as adult fish. As stated above, the sequestration of MBNL proteins by CUG RNA is an important pathogenic mechanism of DM. The authors showed that coexpression of zebrafish *mbnl2* and CUG RNA suppresses the CUG repeats-mediated toxicity. Thus these studies reveal the influence of toxic CUG repeat-containing mRNA during early development, and suggest that zebrafish DM1 models are attractive tools to conduct small-molecule screening and develop new drug therapies for myotonic dystrophy [38]. The zebrafish DM1 model described above was applied to study the *in vitro* effects of CUG pseudouridylation [68]. Pseudouridine is an isomerization product of uridine and is the most common structure-stabilizing RNA modification. The studies showed that pseudouridylation of CUG repeats prevents CUG RNA toxicity in the zebrafish DM1 model, implying that the structure of toxic RNAs plays a significant role in the pathogenesis of DM1. These results open new perspectives for the understanding of disease mechanisms and for corresponding drug design.

Zebrafish is also an excellent animal model to study congenital muscular dystrophies including CMD Type 1 A (CMD 1A) caused by mutation in the human laminin  $\alpha 2$  (*LAMA2*) gene [83]. The *LAMA2* mutation leads to muscle degeneration, necrosis, fibrosis and abnormalities in peripheral nerves. *LAMA2* plays a crucial structural role in the maintenance of sarcolemmal integrity through its interaction with dystrophin-associated glycoprotein. Hall and co-workers [40] revealed that zebrafish dystrophic mutant *candyfloss* is the result of mutations in the laminin  $\alpha 2$  (*LAMA2*) gene. The authors demonstrated that early muscle differentiation and myoblast fusion occurred correctly, indicating that deficiency in early Lama2 signalling does not contribute to muscle pathology. However, they observed that innervation by the primary motor neurons was affected. The authors find that muscle tissue damage and subsequent cell death occur through mechanically induced fibre detachments in the absence of sarcolemmal rupture.

### 3. Major Advances for MD through Therapeutic Drug Screening in the Fruitfly and Zebrafish

In this section, fundamental findings in *Drosophila* and zebrafish models to help cure muscular dystrophies will be discussed. We will focus on drug and genetic screening performed in DMD and DM1 models in both species (Table 2).

**Table 2.** Screens performed in *Drosophila* and zebrafish MD models.

Disease Model	Animal Model	Type of Performed Screen	Identified Drug/Genetic Modifier Mode of Action	Enhanced/Suppressed Phenotype	Ref.
	<i>Drosophila</i>	Genetic interactors of Dys/Dg	Interactors involved in: muscle, motor & cytoskeleton function, neuronal migration or PCP genes, Notch signaling, TGF- $\beta$ signaling, EGFR signaling	Wing-vein phenotype (anterior and posterior cross veins detached/altered cross veins)	[27,84]
			Reduction of <i>mbl</i> levels enhance muscle phenotypes	Abnormal muscle phenotype	
			Dystrophic flies with reduced wunen exhibit less age-dependent degeneration		
<b>DMD</b>			Fluoxetine	Prevention of membrane fragility, survival promotion	[85]
	Zebrafish	Drug screening on sapje and sapje-like mutants	Aminophylline, Eprizole, Homochlorcyclizine dihydrochloride, Conessine, Equilin, Pentetic acid, Proscillaridin A, Sildenafil, Crassin acetate, Cerulenin, Prostaglandin	Restoration of normal muscle structure in affected embryos	[86–89]
		Exon-skipping antisense synthetic oligonucleotides (ASO)	Aminoglycoside antibiotics (ataluren-PTC124)		[32,90]

Table 2. Cont.

Disease Model	Animal Model	Type of Performed Screen	Identified Drug/Genetic Modifier Mode of Action	Enhanced/Suppressed Phenotype	Ref.
DM1	<i>Drosophila</i>	Drug screening on DM1 flies (480 interrupted CTG)	10 suppressor drugs: Non-steroidal anti-inflammatory agents, dopamine receptors and monoamine uptake inhibitors, Na <sup>+</sup> and Ca <sup>2+</sup> metabolism, Muscarinic, cholinergic and histamine receptors inhibitors, ...	CUG-induced lethality	[91]
		Genetic modifier screening on DM1 flies (480 interrupted CTG)	Suppressors: <i>cnc</i> , <i>Nurf-38</i> , <i>foi</i> , <i>coro</i> , <i>csk</i> , <i>spinster</i> , ... Enhancers: <i>seven up</i> , <i>viking</i> , <i>cg4589</i>	CUG-induced rough-eye phenotype	
	Zebrafish	Drug testing on DM1 zebrafish model (CUG-repeat expansion zebrafish model)	Kinase inhibitor (Ro 31-8220) examination - additional assay to complement drug screen performed in cell culture	Partial rescue of somite number and length to width ratio of the tail	[92]

Notes: Genetic and drug screens performed in *Drosophila* and zebrafish models of Duchenne muscular dystrophy (DMD) and myotonic dystrophy type 1 (DM1). Abbreviations: PCP Planar Cell Polarity, Dys Dystrophin, Dg Dystrolycan.

The different therapeutic approaches developed to treat neuromuscular disorders and other diseases are (i) **gene therapy** to repair the mutated gene, either using exon skipping in the case of a missplicing mutation or by adeno-associated virus (AAV) mediated gene delivery to restore the normal copy of a gene; (ii) **cell therapy** to repair the affected cells that are degenerating in these types of disease; and (iii) **drug therapy** to treat mainly the consequences of the mutations and to soothe the symptoms [93–96].

These strategies utilize different animal models. The gene and cell therapy approaches are developed mainly using mouse models, whereas major advances have been made using *C. elegans*, *D. melanogaster* and the fish *D. rerio*, due to their compatibility with high-throughput screening (HTS) [26,97]. Drug discovery using mammals can be very costly, and so is often used to test only small sets of compounds [60]. Although cell cultures are more efficient for testing large numbers of molecules, their metabolism may also be completely different from that of a whole organism. Hence, maintaining the physiological contexts in the animals allows a better assessment of the toxicity of the molecules tested.

A variety of small molecules have become available from various academic facilities and companies; for example, Prestwick chemical library (Harvard ICCB) contains 1120 small molecules, composed of 90% marked drugs and 10% bioactive alkaloids or related substances. These safe-for-humans compounds were selected for their high chemical and pharmacological diversity [86]. Low molecular weight compounds bind to specific proteins and alter their function, resulting in phenotype changes.

The use of *Drosophila* in the screening of compound libraries helped to find potential therapeutic targets for several neurodegenerative disease models including fragile X syndrome (FXS) [66], Alzheimer's disease (AD) [98], fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS) [99] and more recently, Huntington disease (HD) [100].

Regarding muscular dystrophies, Garcia-Lopez and co-workers used screening on their DM1 *Drosophila* model to identify modifiers of CUG-induced lethality. Ten suppressor drugs involved in sodium and calcium metabolism were identified and found to improve survival of DM1 flies [91].

The same DM1 model has also been used to identify drugs that can eliminate the CUG-RNA hairpin formation responsible for the sequestration of MBNL1 and splicing defects. Garcia-Lopez and co-workers [101] applied a positional scanning synthetic combinatorial library (PS-SCL) of D-amino acid hexapeptides, and identified a peptide that binds to CUG repeats and suppresses their toxicity. This ABP1 peptide was also able to reverse missplicing in a DM1 mouse model. The discovery of ABP1 as a suppressor of RNA toxicity in both *Drosophila* and mouse DM1 models supports the view that *Drosophila* is an accurate model system for developing therapeutics in muscular dystrophies.

*Drosophila* is also well-suited for the identification of genetic modifiers, and in particular suppressors of pathological phenotypes [102]. Genetic modifier screens have been performed on *Drosophila* models of spinobulbar muscular atrophy (SBMA) [64], spinal muscular atrophy [103], inclusion body myopathy with early-onset Paget disease and frontotemporal dementia (IBMPFD) [104], and in MD models such as OPMD [57], DM1 [91] and DMD [84]. Regarding DMD, two important genetic interactors have been identified: muscleblind (Mbl) and wunen. The splicing factor Mbl, known to interact with Dg-Dys complex, was found to enhance muscle phenotypes observed in *dys* mutants. By contrast, wunen, a human lipid phosphate phosphatase (LPP) 3 homolog, was identified as a suppressor of the dystrophic wing vein phenotype. The wunen-based suppression of *dys* mutant phenotypes could be related to an increase in the bioactive lipid sphingosine 1-phosphate (S1P) known to promote cell proliferation and differentiation in many tissues, including muscle. The identification of wunen as a suppressor of DMD-associated muscle degeneration could lead to new DMD therapeutic strategies by elevating S1P signalling to suppress or alleviate the dystrophic muscle symptoms [27]. Further genetic modifier screening performed in ageing dystrophic *Drosophila* muscles identified interactors of Dys and/or Dg that are involved in stress response pathways and encode proteins involved in communication between muscle and neuron [105]. Likewise, screening was performed in a DM1 model to identify genetic modifiers of the rough eye phenotype, generated by eye-targeted expression of toxic CUG repeats. Garcia-Lopez and co-workers identified 15 genetic modifiers of eye degeneration, among which genes encoding cell adhesion proteins, regulators of gene expression or cell proliferation and actin cytoskeleton components [91]. Moreover, in recent screening for modifiers of eye and muscle degeneration in DM1 model, a genetic interactor of CUGBP1, Smaug (SMAD4A) was identified and found to act as a suppressor of CUG-induced myopathy [106].

The zebrafish, because of its advantages discussed above, and in particular the ability of zebrafish embryos to absorb chemicals, has become a model of choice in screening and testing new drugs [29–32,61,92]. This is the case for *sapje* and *sapje*-like dystrophin mutants, which are excellent models for DMD therapeutic screens [85–88]. For example, Kawahara and co-workers [87], using easy birefringence assays, have identified seven small molecules that influence muscle phenotypes in *sapje* mutants. Although chemical treatment did not restore dystrophin expression, three of the seven

compounds restored normal birefringence and showed increased survival of mutant embryos. Among them, aminophylline showed the greatest ability to restore normal muscle structure in affected embryos. This non-selective phosphodiesterase inhibitor (traditionally used for asthma treatment) increases intracellular cAMP levels, causing activation of the cAMP-dependent protein kinase PKA pathway [87]. Aminophylline-treated fish showed increased levels of phosphorylated PKA, indicating PKA-dependent restoration of muscle structure [86]. Other drug screening carried out on *dys* mutants [89] revealed that some aminoglycoside antibiotics (e.g., ataluren-PTC124) can cause read-through of premature stop codon caused by nonsense mutations. Ataluren treatment led to significant improvement of muscle structure and function in *sapje* mutants accompanied by reexpression of dystrophin.

Another therapeutic strategy involving the zebrafish model is based on the exon-skipping strategy and administration of antisense synthetic oligonucleotides (ASO). Exon skipping partially restores the disrupted reading frame, leading to production of a shorter but still functional dystrophin protein. Statistical and systematic evaluation of exon-skipping in dystrophin-deficient zebrafish mutants demonstrated that the restored *dystrophin* transcripts represent 10%–20% of the normal *dystrophin* transcript level, leading to only partial restoration of muscle function, whereas at least 30%–40% is required to recover dystrophic pathology [63,90]. Altogether, the examples presented above illustrate the importance of the zebrafish model in designing and testing therapeutic approaches for muscular dystrophies and in particular for DMD.

#### 4. Conclusions

Despite an increasing body of breakthroughs made in the understanding of MDs, the molecular mechanisms underlying many muscle disorders remain poorly understood, limiting the development of efficacious therapies. Technological advances, such as next-generation sequencing (NGS), allow the fast identification of gene variants and pathological mutations in MD patients, while simple animal models such as fruitfly and zebrafish provide means to evaluate their significance. Zebrafish and *Drosophila* models have been successfully used in the past to uncover cellular and molecular pathways underlying human muscular diseases, reviewed in [3,30,32,107], revealing particular strengths of each model. For example, the zebrafish model, owing to embryo transparency and visual assessment of muscle structure and mobility phenotypes, is well-suited to large-scale drug screening [29,32,87]. The *Drosophila* model, for which there are large collections of mutants, RNAi lines and other genetic tools, has demonstrated its valuable role in identifying suppressors or enhancers of disease phenotypes through genetic screening [91,97,98].

Overall, this review highlights the role of the zebrafish and *Drosophila* models in understanding the genetic and molecular basis of human MDs and helping to design therapeutic strategies. As these are simple non-mammalian animal models, the knowledge gained needs appropriate validation before it is applied to treating MD in humans.

#### Acknowledgments

We are grateful to the funding agencies listed below that support our work. AFM grant No.19001, ANR grant ID-CELL-SPE, the Equipe FRM-2014 grant to KJ and the Polish State Committee for



Scientific Research, projects No. 1018/S/IZ/2014 and European Union, European Social Fund grant no. BPZ.506.50.2012.MS to M.D and M.MP.

### Author Contributions

E.P and M.MP contributed to the design of this review and wrote the paper, M.D and K.J coordinated draft preparation.

### Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

### References

1. Emery, A.E. The muscular dystrophies. *Lancet* **2002**, *359*, 687–695.
2. Mercuri, E.; Muntoni, F. Muscular dystrophies. *Lancet* **2013**, *381*, 845–860.
3. Sparrow, J.; Hughes, S.M.; Segalat, L. Other model organisms for sarcomeric muscle diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2008**, *642*, 192–206.
4. Rubin, G.M.; Lewis, E.B. A brief history of drosophila's contributions to genome research. *Science* **2000**, *287*, 2216–2218.
5. Arias, A.M. *Drosophila melanogaster* and the development of biology in the 20th century. In *Methods in Molecular Biology: Drosophila: Methods and Protocols*; Springer: Totowa, NJ, USA, 2008; pp. 1–25.
6. Adams, M.D.; Celniker, S.E.; Holt, R.A.; Evans, C.A.; Gocayne, J.D.; Amanatides, P.G.; Scherer, S.E.; Li, P.W.; Hoskins, R.A.; Galle, R.F.; *et al.* The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **2000**, *287*, 2185–2195.
7. Reiter, L.T.; Potocki, L.; Chien, S.; Gribskov, M.; Bier, E. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* **2001**, *11*, 1114–1125.
8. Lloyd, T.E.; Taylor, J.P. Flightless flies: *Drosophila* models of neuromuscular disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2010**, *1184*, e1–e20.
9. Howe, K.; Clark, M.D.; Torroja, C.F.; Tarrance, J.; Berthelot, C.; Muffato, M.; Collins, J.E.; Humphray, S.; McLaren, K.; Matthews, L.; *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* **2013**, *496*, 498–503.
10. Barbazuk, W.B.; Korf, I.; Kadavi, C.; Heyen, J.; Tate, S.; Wun, E.; Bedell, J.A.; McPherson, J.D.; Johnson, S.L. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res.* **2000**, *10*, 1351–1358.
11. Bedell, V.M.; Westcot, S.E.; Ekker, S.C. Lessons from morpholino-based screening in zebrafish. *Brief. Funct. Genomics* **2011**, *10*, 181–188.
12. Stainier, D.Y.R.; Kontarakis, Z.; Rossi, A. Making sense of anti-sense data. *Dev. Cell* **2015**, *32*, 7–8.
13. Granato, M.; van Eeden, F.J.; Schach, U.; Trowe, T.; Brand, M.; Furutani-Seiki, M.; Haffter, P.; Hammerschmidt, M.; Heisenberg, C.P.; Jiang, Y.J.; *et al.* Genes controlling and mediating locomotion behavior of the zebrafish embryo and larva. *Dev. Camb. Engl.* **1996**, *123*, 399–413.

14. Gupta, V.; Kawahara, G.; Gundry, S.R.; Chen, A.T.; Lencer, W.I.; Zhou, Y.; Zon, L.I.; Kunkel, L.M.; Beggs, A.H. The zebrafish *dag1* mutant: A novel genetic model for dystroglycanopathies. *Hum. Mol. Genet.* **2011**, *20*, 1712–1725.
15. Gupta, V.A.; Kawahara, G.; Myers, J.A.; Chen, A.T.; Hall, T.E.; Manzini, M.C.; Currie, P.D.; Zhou, Y.; Zon, L.I.; Kunkel, L.M.; *et al.* A splice site mutation in laminin- $\alpha$ 2 results in a severe muscular dystrophy and growth abnormalities in zebrafish. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e43794.
16. Hirata, H.; Wen, H.; Kawakami, Y.; Naganawa, Y.; Ogino, K.; Yamada, K.; Saint-Amant, L.; Low, S.E.; Cui, W.W.; Zhou, W.; *et al.* Connexin 39.9 protein is necessary for coordinated activation of slow-twitch muscle and normal behavior in zebrafish. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 1080–1089.
17. Saint-Amant, L.; Sprague, S.M.; Hirata, H.; Li, Q.; Cui, W.W.; Zhou, W.; Poudou, O.; Hume, R.I.; Kuwada, J.Y. The zebrafish *ennui* behavioral mutation disrupts acetylcholine receptor localization and motor axon stability. *Dev. Neurobiol.* **2008**, *68*, 45–61.
18. Jinek, M.; Chylinski, K.; Fonfara, I.; Hauer, M.; Doudna, J.A.; Charpentier, E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **2012**, *337*, 816–821.
19. Irion, U.; Krauss, J.; Nusslein-Volhard, C. Precise and efficient genome editing in zebrafish using the CRISPR/Cas9 system. *Development* **2014**, 4827–4830.
20. Hruscha, A.; Schmid, B. Generation of zebrafish models by CRISPR/Cas9 genome editing. In *Neuronal Cell Death*; Lossi, L., Merighi, A., Eds.; Methods in Molecular Biology; Springer: New York, NY, USA, 2015; Series Volume 1254, pp. 341–350.
21. Bassett, A.R.; Tibbit, C.; Ponting, C.P.; Liu, J.-L. Highly efficient targeted mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 system. *Cell Rep.* **2013**, *4*, 220–228.
22. Harrison, M.M.; Jenkins, B.V.; O'Connor-Giles, K.M.; Wildonger, J. A CRISPR view of development. *Genes Dev.* **2014**, *28*, 1859–1872.
23. Sink, H. *Muscle Development in Drosophila*; Springer Science & Business Media, New York, NY, USA, 2007.
24. Baylies, M.K.; Bate, M.; Gomez, M.R. Myogenesis: A view from *Drosophila*. *Cell* **1998**, *93*, 921–927.
25. Saint-Amant, L.; Drapeau, P. Time course of the development of motor behaviors in the zebrafish embryo. *J. Neurobiol.* **1998**, *37*, 622–632.
26. Pandey, U.B.; Nichols, C.D. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacol. Rev.* **2011**, *63*, 411–436.
27. Pantoja, M.; Fischer, K.A.; Ieronimakis, N.; Reyes, M.; Ruohola-Baker, H. Genetic elevation of Sphingosine 1-phosphate suppresses dystrophic muscle phenotypes in *Drosophila*. *Development* **2013**, *140*, 136–146.
28. Vaquer, G.; Dannerstedt, F.R.; Mavris, M.; Bignami, F.; Llinares-Garcia, J.; Westermarck, K.; Sepodes, B. Animal models for metabolic, neuromuscular and ophthalmological rare diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 287–305.
29. Lieschke, G.J.; Currie, P.D. Animal models of human disease: Zebrafish swim into view. *Nat. Rev. Genet.* **2007**, *8*, 353–367.
30. Maves, L. Recent advances using zebrafish animal models for muscle disease drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2014**, *9*, 1033–1045.



31. Santoriello, C.; Zon, L.I. Hooked! Modeling human disease in zebrafish. *J. Clin. Investig.* **2012**, *122*, 2337–2343.
32. Gibbs, E.M.; Horstick, E.J.; Dowling, J.J. Swimming into prominence: The zebrafish as a valuable tool for studying human myopathies and muscular dystrophies. *FEBS J.* **2013**, *280*, 4187–4197.
33. Shcherbata, H.R.; Yatsenko, A.S.; Patterson, L.; Sood, V.D.; Nudel, U.; Yaffe, D.; Baker, D.; Ruohola-Baker, H. Dissecting muscle and neuronal disorders in a Drosophila model of muscular dystrophy. *EMBO J.* **2007**, *26*, 481–493.
34. Chambers, S.P.; Dodd, A.; Overall, R.; Sirey, T.; Lam, L.T.; Morris, G.E.; Love, D.R. Dystrophin in adult zebrafish muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *286*, 478–483.
35. De Haro, M.; Al-Ramahi, I.; de Gouyon, B.; Ukani, L.; Rosa, A.; Faustino, N.A.; Ashizawa, T.; Cooper, T.A.; Botas, J. MBNL1 and CUGBP1 modify expanded CUG-induced toxicity in a Drosophila model of myotonic dystrophy type 1. *Hum. Mol. Genet.* **2006**, *15*, 2138–2145.
36. Picchio, L.; Plantie, E.; Renaud, Y.; Poovthumkadavil, P.; Jagla, K. Novel Drosophila model of myotonic dystrophy type 1: Phenotypic characterization and genome-wide view of altered gene expression. *Hum. Mol. Genet.* **2013**, *22*, 2795–2810.
37. Machuca-Tzili, L.E.; Buxton, S.; Thorpe, A.; Timson, C.M.; Wigmore, P.; Luther, P.K.; Brook, J.D. Zebrafish deficient for Muscleblind-like 2 exhibit features of myotonic dystrophy. *Dis. Model. Mech.* **2011**, *4*, 381–392.
38. Todd, P.K.; Ackall, F.Y.; Hur, J.; Sharma, K.; Paulson, H.L.; Dowling, J.J. Transcriptional changes and developmental abnormalities in a zebrafish model of myotonic dystrophy type 1. *Dis. Model. Mech.* **2014**, *7*, 143–155.
39. Ueyama, M.; Akimoto, Y.; Ichimiya, T.; Ueda, R.; Kawakami, H.; Aigaki, T.; Nishihara, S. Increased apoptosis of myoblasts in drosophila model for the walker-warburg syndrome. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e11557.
40. Hall, T.E.; Bryson-Richardson, R.J.; Berger, S.; Jacoby, A.S.; Cole, N.J.; Hollway, G.E.; Berger, J.; Currie, P.D. The zebrafish candyfloss mutant implicates extracellular matrix adhesion failure in laminin alpha2-deficient congenital muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 7092–7097.
41. O'Brien, K.F.; Kunkel, L.M. Dystrophin and muscular dystrophy: Past, present, and future. *Mol. Genet. Metab.* **2001**, *74*, 75–88.
42. Guyon, J.R.; Steffen, L.S.; Howell, M.H.; Pusack, T.J.; Lawrence, C.; Kunkel, L.M. Modeling human muscle disease in zebrafish. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1772*, 205–215.
43. Roberts, R.G.; Bobrow, M. Dystrophins in vertebrates and invertebrates. *Hum. Mol. Genet.* **1998**, *7*, 589–595.
44. Brook, J.D.; McCurrach, M.E.; Harley, H.G.; Buckler, A.J.; Church, D.; Aburatani, H.; Hunter, K.; Stanton, V.P.; Thirion, J.P.; Hudson, T.; *et al.* Molecular basis of myotonic dystrophy: Expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* **1992**, *69*, 385.
45. Day, J.W.; Ranum, L.P.W. Genetics and molecular pathogenesis of the myotonic dystrophies. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **2005**, *5*, 55–59.

46. Klein, A.F.; Gasnier, E.; Furling, D. Gain of RNA function in pathological cases: Focus on myotonic dystrophy. *Biochimie* **2011**, *93*, 2006–2012.
47. Meola, G.; Cardani, R. Myotonic dystrophies: An update on clinical aspects, genetic, pathology, and molecular pathomechanisms. *Biochim. Biophys. Acta BBA—Mol. Basis Dis.* **2015**, *1852*, 594–606.
48. Pettersson, O.J.; Aagaard, L.; Jensen, T.G.; Damgaard, C.K. Molecular mechanisms in DM1—A focus on foci. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 2433–2441.
49. Bertini, E.; D’Amico, A.; Gualandi, F.; Petrini, S. Congenital muscular dystrophies: A Brief Review. *Semin. Pediatr. Neurol.* **2011**, *18*, 277–288.
50. Mercuri, E.; Muntoni, F. The ever-expanding spectrum of congenital muscular dystrophies. *Ann. Neurol.* **2012**, *72*, 9–17.
51. Sparks, S.; Quijano-Roy, S.; Harper, A.; Rutkowski, A.; Gordon, E.; Hoffman, E.P.; Pegoraro, E. Congenital muscular dystrophy overview. In *GeneReviews*(®); Pagon, R.A., Adam, M.P., Ardinger, H.H., Bird, T.D., Dolan, C.R., Fong, C.-T., Smith, R.J., Stephens, K., Eds.; University of Washington: Seattle, WA, USA, 1993.
52. Kirschner, J. Congenital muscular dystrophies. In *Handbook of Clinical Neurology*; Dulac, O., Lassonde, M., Sarnat, H., Eds.; Pediatric Neurology Part III; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2013; Volume 113, Chapter 143, pp. 1377–1385.
53. Dobyns, W.B.; Pagon, R.A.; Armstrong, D.; Curry, C.J.; Greenberg, F.; Grix, A.; Holmes, L.B.; Laxova, R.; Michels, V.V.; Robinow, M. Diagnostic criteria for walker-warburg syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **1989**, *32*, 195–210.
54. Vajsar, J.; Schachter, H. Walker-Warburg syndrome. *Orphanet J. Rare Dis.* **2006**, *1*, 29.
55. Mosqueira, M.; Willmann, G.; Ruohola-Baker, H.; Khurana, T.S. Chronic hypoxia impairs muscle function in the Drosophila model of Duchenne’s muscular dystrophy (DMD). *PLoS ONE* **2010**, *5*, e13450.
56. Allikian, M.J.; Bhabha, G.; Dospoy, P.; Heydemann, A.; Ryder, P.; Earley, J.U.; Wolf, M.J.; Rockman, H.A.; McNally, E.M. Reduced life span with heart and muscle dysfunction in Drosophila sarcoglycan mutants. *Hum. Mol. Genet.* **2007**, *16*, 2933–2943.
57. Chartier, A.; Benoit, B.; Simonelig, M. A Drosophila model of oculopharyngeal muscular dystrophy reveals intrinsic toxicity of PABPN1. *EMBO J.* **2006**, *25*, 2253–2262.
58. Dialynas, G.; Speese, S.; Budnik, V.; Geyer, P.K.; Wallrath, L.L. The role of Drosophila Lamin C in muscle function and gene expression. *Dev. Camb. Engl.* **2010**, *137*, 3067–3077.
59. Uchino, R.; Nonaka, Y.; Horigome, T.; Sugiyama, S.; Furukawa, K. Loss of Drosophila A-type lamin C initially causes tendon abnormality including disintegration of cytoskeleton and nuclear lamina in muscular defects. *Dev. Biol.* **2013**, *373*, 216–227.
60. Guyon, J.R.; Goswami, J.; Jun, S.J.; Thorne, M.; Howell, M.; Pusack, T.; Kawahara, G.; Steffen, L.S.; Galdzicki, M.; Kunkel, L.M. Genetic isolation and characterization of a splicing mutant of zebrafish dystrophin. *Hum. Mol. Genet.* **2009**, *18*, 202–211.
61. Bassett, D.I.; Currie, P.D. The zebrafish as a model for muscular dystrophy and congenital myopathy. *Hum. Mol. Genet.* **2003**, *12 Spec No 2*, R265–R270.
62. Bassett, D.; Currie, P.D. Identification of a zebrafish model of muscular dystrophy. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2004**, *31*, 537–540.

63. Berger, J.; Currie, P.D. Zebrafish models flex their muscles to shed light on muscular dystrophies. *Dis. Model. Mech.* **2012**, *5*, 726–732.
64. Takeyama, K.; Ito, S.; Yamamoto, A.; Tanimoto, H.; Furutani, T.; Kanuka, H.; Miura, M.; Tabata, T.; Kato, S. Androgen-dependent neurodegeneration by polyglutamine-expanded human androgen receptor in *Drosophila*. *Neuron* **2002**, *35*, 855–864.
65. Chan, Y.B.; Miguel-Aliaga, I.; Franks, C.; Thomas, N.; Trülsch, B.; Sattelle, D.B.; Davies, K.E.; van den Heuvel, M. Neuromuscular defects in a *Drosophila* survival motor neuron gene mutant. *Hum. Mol. Genet.* **2003**, *12*, 1367–1376.
66. Chang, S.; Bray, S.M.; Li, Z.; Zarnescu, D.C.; He, C.; Jin, P.; Warren, S.T. Identification of small molecules rescuing fragile X syndrome phenotypes in *Drosophila*. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 256–263.
67. Xu, Y.; Condell, M.; Plesken, H.; Edelman-Novemsky, I.; Ma, J.; Ren, M.; Schlame, M. A *drosophila* model of barth syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 11584–11588.
68. deLorimier, E.; Coonrod, L.A.; Copperman, J.; Taber, A.; Reister, E.E.; Sharma, K.; Todd, P.K.; Guenza, M.G.; Berglund, J.A. Modifications to toxic CUG RNAs induce structural stability, rescue mis-splicing in a myotonic dystrophy cell model and reduce toxicity in a myotonic dystrophy zebrafish model. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 12768–12778.
69. Greener, M.J.; Roberts, R.G. Conservation of components of the dystrophin complex in *Drosophila*1. *FEBS Lett.* **2000**, *482*, 13–18.
70. Taghli-Lamalle, O.; Akasaka, T.; Hogg, G.; Nudel, U.; Yaffe, D.; Chamberlain, J.S.; Ocorr, K.; Bodmer, R. Dystrophin deficiency in *Drosophila* reduces lifespan and causes a dilated cardiomyopathy phenotype. *Aging Cell* **2008**, *7*, 237–249.
71. Farkas, G.A.; McCormick, K.M.; Gosselin, L.E. Episodic hypoxia exacerbates respiratory muscle dysfunction in DMDmdx mice. *Muscle Nerve* **2007**, *36*, 708–710.
72. Houseley, J.M.; Wang, Z.; Brock, G.J.R.; Soloway, J.; Artero, R.; Perez-Alonso, M.; O'Dell, K.M.C.; Monckton, D.G. Myotonic dystrophy associated expanded CUG repeat muscleblind positive ribonuclear foci are not toxic to *Drosophila*. *Hum. Mol. Genet.* **2005**, *14*, 873–883.
73. Wairkar, Y.P.; Fradkin, L.G.; Noordermeer, J.N.; DiAntonio, A. Synaptic defects in a *drosophila* model of congenital muscular dystrophy. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 3781–3789.
74. Bulfield, G.; Siller, W.G.; Wight, P.A.; Moore, K.J. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 1189–1192.
75. Sicinski, P.; Geng, Y.; Ryder-Cook, A.S.; Barnard, E.A.; Darlison, M.G.; Barnard, P.J. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: A point mutation. *Science* **1989**, *244*, 1578–1580.
76. Im, W.B.; Phelps, S.F.; Copen, E.H.; Adams, E.G.; Slightom, J.L.; Chamberlain, J.S. Differential expression of dystrophin isoforms in strains of mdx mice with different mutations. *Hum. Mol. Genet.* **1996**, *5*, 1149–1153.
77. Bassett, D.I.; Bryson-Richardson, R.J.; Daggett, D.F.; Gautier, P.; Keenan, D.G.; Currie, P.D. Dystrophin is required for the formation of stable muscle attachments in the zebrafish embryo. *Dev. Camb. Engl.* **2003**, *130*, 5851–5860.

78. Guyon, J.R.; Mosley, A.N.; Zhou, Y.; O'Brien, K.F.; Sheng, X.; Chiang, K.; Davidson, A.J.; Volinski, J.M.; Zon, L.I.; Kunkel, L.M. The dystrophin associated protein complex in zebrafish. *Hum. Mol. Genet.* **2003**, *12*, 601–615.
79. Kunkel, L.M.; Bachrach, E.; Bennett, R.R.; Guyon, J.; Steffen, L. Diagnosis and cell-based therapy for Duchenne muscular dystrophy in humans, mice, and zebrafish. *J. Hum. Genet.* **2006**, *51*, 397–406.
80. Deconinck, A.E.; Rafael, J.A.; Skinner, J.A.; Brown, S.C.; Potter, A.C.; Metzinger, L.; Watt, D.J.; Dickson, J.G.; Tinsley, J.M.; Davies, K.E. Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* **1997**, *90*, 717–727.
81. Grady, R.M.; Teng, H.; Nichol, M.C.; Cunningham, J.C.; Wilkinson, R.S.; Sanes, J.R. Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: A model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* **1997**, *90*, 729–738.
82. Collins, C.A.; Morgan, J.E. Duchenne's muscular dystrophy: Animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. *Int. J. Exp. Pathol.* **2003**, *84*, 165–172.
83. Jones, K.J.; Morgan, G.; Johnston, H.; Tobias, V.; Ouvrier, R.A.; Wilkinson, I.; North, K.N. The expanding phenotype of laminin alpha2 chain (merosin) abnormalities: case series and review. *J. Med. Genet.* **2001**, *38*, 649–657.
84. Kucherenko, M.M.; Pantoja, M.; Yatsenko, A.S.; Shcherbata, H.R.; Fischer, K.A.; Maksymiv, D.V.; Chernyk, Y.I.; Ruohola-Baker, H. Genetic modifier screens reveal new components that interact with the Drosophila dystroglycan-dystrophin complex. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e2418.
85. Waugh, T.A.; Horstick, E.; Hur, J.; Jackson, S.W.; Davidson, A.E.; Li, X.; Dowling, J.J. Fluoxetine prevents dystrophic changes in a zebrafish model of Duchenne muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **2014**, *23*, 4651–4662.
86. Kawahara, G.; Kunkel, L.M. Zebrafish based small molecule screens for novel DMD drugs. *Drug Discov. Today Technol.* **2013**, *10*, e91–e96.
87. Kawahara, G.; Karpf, J.A.; Myers, J.A.; Alexander, M.S.; Guyon, J.R.; Kunkel, L.M. Drug screening in a zebrafish model of Duchenne muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 5331–5336.
88. Kawahara, G.; Gasperini, M.J.; Myers, J.A.; Widrick, J.J.; Eran, A.; Serafini, P.R.; Alexander, M.S.; Pletcher, M.T.; Morris, C.A.; Kunkel, L.M. Dystrophic muscle improvement in zebrafish via increased heme oxygenase signaling. *Hum. Mol. Genet.* **2014**, *23*, 1869–1878.
89. Li, M.; Andersson-Lendahl, M.; Sejersen, T.; Arner, A. Muscle dysfunction and structural defects of dystrophin-null sapje mutant zebrafish larvae are rescued by ataluren treatment. *FASEB J.* **2014**, *28*, 1593–1599.
90. Berger, J.; Berger, S.; Jacoby, A.S.; Wilton, S.D.; Currie, P.D. Evaluation of exon-skipping strategies for Duchenne muscular dystrophy utilizing dystrophin-deficient zebrafish. *J. Cell. Mol. Med.* **2011**, *15*, 2643–2651.
91. Garcia-Lopez, A.; Monferrer, L.; Garcia-Alcover, I.; Vicente-Crespo, M.; Alvarez-Abril, M.C.; Artero, R.D. Genetic and chemical modifiers of a CUG toxicity Model in drosophila. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e1595.
92. Ketley, A.; Chen, C.Z.; Li, X.; Arya, S.; Robinson, T.E.; Granados-Riveron, J.; Udosen, I.; Morris, G.E.; Holt, I.; Furling, D.; *et al.* High-content screening identifies small molecules that remove nuclear foci, affect MBNL distribution and CELF1 protein levels via a PKC-independent pathway in myotonic dystrophy cell lines. *Hum. Mol. Genet.* **2014**, *23*, 1551–1562.

93. Blau, H.M.; Springer, M.L. Gene therapy—A novel Form of Drug Delivery. *N. Engl. J. Med.* **1995**, *333*, 1204–1207.
94. Chamberlain, J.S. Gene therapy of muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **2002**, *11*, 2355–2362.
95. Malik, V.; Rodino-Klapac, L.R.; Mendell, J.R. Emerging drugs for Duchenne muscular dystrophy. *Expert Opin. Emerg. Drugs* **2012**, *17*, 261–277.
96. Benedetti, S.; Hoshiya, H.; Tedesco, F.S. Repair or replace? Exploiting novel gene and cell therapy strategies for muscular dystrophies. *FEBS J.* **2013**, *280*, 4263–4280.
97. Giacomotto, J.; Ségalat, L. High-throughput screening and small animal models, where are we? *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *160*, 204–216.
98. McKoy, A.F.; Chen, J.; Schupbach, T.; Hecht, M.H. A novel inhibitor of Amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) peptide aggregation from high throughput screening to efficacy in an animal model of alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 38992–39000.
99. Qurashi, A.; Liu, H.; Ray, L.; Nelson, D.L.; Duan, R.; Jin, P. Chemical screen reveals small molecules suppressing fragile X premutation rCGG repeat-mediated neurodegeneration in *Drosophila*. *Hum. Mol. Genet.* **2012**, *21*, 2068–2075.
100. Schulte, J.; Sepp, K.J.; Wu, C.; Hong, P.; Littleton, J.T. High-content chemical and RNAi screens for suppressors of neurotoxicity in a huntington's disease model. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e23841.
101. García-López, A.; Llamusi, B.; Orzáez, M.; Pérez-Payá, E.; Artero, R.D. *In vivo* discovery of a peptide that prevents CUG–RNA hairpin formation and reverses RNA toxicity in myotonic dystrophy models. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 11866–11871.
102. St Johnston, D. The art and design of genetic screens: *drosophila melanogaster*. *Nat. Rev. Genet.* **2002**, *3*, 176–188.
103. Chang, H.C.-H.; Dimlich, D.N.; Yokokura, T.; Mukherjee, A.; Kankel, M.W.; Sen, A.; Sridhar, V.; Fulga, T.A.; Hart, A.C.; Van Vactor, D.; *et al.* Modeling spinal muscular atrophy in *Drosophila*. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e3209.
104. Ritson, G.P.; Custer, S.K.; Freibaum, B.D.; Guinto, J.B.; Geffel, D.; Moore, J.; Tang, W.; Winton, M.J.; Neumann, M.; Trojanowski, J.Q.; *et al.* TDP-43 mediates degeneration in a novel *Drosophila* model of disease caused by mutations in VCP/p97. *J. Neurosci.* **2010**, *30*, 7729–7739.
105. Kucherenko, M.M.; Marrone, A.K.; Rishko, V.M.; Magliarelli Hde, F.; Shcherbata, H.R. Stress and muscular dystrophy: A genetic screen for Dystroglycan and Dystrophin interactors in *Drosophila* identifies cellular stress response components. *Dev. Biol.* **2011**, *352*, 228–242.
106. De Haro, M.; Al-Ramahi, I.; Jones, K.R.; Holth, J.K.; Timchenko, L.T.; Botas, J. Smaug/SAMD4A restores translational activity of CUGBP1 and suppresses CUG-Induced myopathy. *PLoS Genet* **2013**, *9*, e1003445.
107. Phillips, J.B.; Westerfield, M. Zebrafish models in translational research: Tipping the scales toward advancements in human health. *Dis. Model. Mech.* **2014**, *7*, 739–743.







Review

# *Drosophila* in the Heart of Understanding Cardiac Diseases: Modeling Channelopathies and Cardiomyopathies in the Fruitfly

Ouarda Taghli-Lamalle<sup>†</sup>, Emilie Plantié<sup>†</sup> and Krzysztof Jagla<sup>\*</sup>

GReD (Genetics, Reproduction and Development laboratory), INSERM U1103, CNRS UMR6293, University of Clermont-Ferrand, 28 place Henri-Dunant, 63000 Clermont-Ferrand, France; ouarda.taghli-lamalle@udamail.fr (O.T.-L.); emilie.plantie@udamail.fr (E.P.)

<sup>\*</sup> Correspondence: christophe.jagla@udamail.fr; Tel.: +33-473-178-181

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

Academic Editors: Georg Vogler and Rolf Bodmer

Received: 31 December 2015; Accepted: 6 February 2016; Published: 18 February 2016

**Abstract:** Cardiovascular diseases and, among them, channelopathies and cardiomyopathies are a major cause of death worldwide. The molecular and genetic defects underlying these cardiac disorders are complex, leading to a large range of structural and functional heart phenotypes. Identification of molecular and functional mechanisms disrupted by mutations causing channelopathies and cardiomyopathies is essential to understanding the link between an altered gene and clinical phenotype. The development of animal models has been proven to be efficient for functional studies in channelopathies and cardiomyopathies. In particular, the *Drosophila* model has been largely applied for deciphering the molecular and cellular pathways affected in these inherited cardiac disorders and for identifying their genetic modifiers. Here we review the utility and the main contributions of the fruitfly models for the better understanding of channelopathies and cardiomyopathies. We also discuss the investigated pathological mechanisms and the discoveries of evolutionarily conserved pathways which reinforce the value of *Drosophila* in modeling human cardiac diseases.

**Keywords:** human cardiac disease; *Drosophila*; channelopathies; cardiomyopathies; sarcomeric proteins; cytoskeletal proteins; K<sup>+</sup> channels

## 1. Introduction

Cardiovascular diseases (CVDs) remain the leading cause of death worldwide, with over four million deaths per year in Europe (46% of all deaths) and 787,650 in the United States (31.9% of all deaths) [1,2]. The CVDs affect the structure and/or function of the heart and blood vessels and comprise congenital, coronary and rheumatic heart diseases, hypertrophic, dilated and restrictive cardiomyopathies, as well as cardiac arrhythmias and stroke. The molecular and genetic defects underlying congenital heart diseases and cardiomyopathies are still not fully understood, awaiting further investigations to identify affected genes and pathways.

Cardiomyopathies are defined as myocardial disorders in which the cardiac dysfunction ranges from symptomless to major health complications such as arrhythmia, heart failure and sudden cardiac death. Cardiomyopathies are classified, based on ventricular morphology and function, into hypertrophic (HCM), dilated (DCM), arrhythmogenic right ventricular (ARVC), and restrictive cardiomyopathy (RCM) [3]. They can be caused by monogenic mutations inherited in Mendelian fashion, and are thus called inherited cardiomyopathies.



HCM, the most common with an estimated prevalence of one in 500 individuals [4], is characterized by increased left ventricular (LV) wall thickness, myocyte hypertrophy, myofibrillar disarray, increased fibrosis and impaired LV diastolic function [5]. DCM is characterized by dilation and impaired contraction of the left or both ventricles (systolic dysfunction) which leads to progressive heart failure and sudden cardiac death from ventricular arrhythmia [6]. The prevalence of DCM is estimated to be one in 2500 [7]. RCM is an uncommon form of cardiomyopathy, characterized by increased stiffness and restrictive filling of the left and/or right ventricle despite normal wall thickness and systolic function [8]. RCM is rare and several reports suggest genetic overlap with HCM [9,10]. ARVC has a prevalence of at least one in 1000 and corresponds to a chronic and progressive myocardial disorder, leading to sudden cardiac death in general in people less than 35 years old [11,12]. Early ARVC bears more resemblance to channelopathies (ion channel diseases) such as Long QT and Brugada syndrome [13] and as the disease progresses, typical histomorphological changes occur including myocyte loss, fibrosis and adiposis [14].

Genetically engineered animal models of cardiovascular diseases provide valuable tools to investigate the molecular and cellular mechanisms of CVD pathogenesis and to evaluate therapeutic strategies (reviewed in [15–17]). The fruitfly exhibits strong gene conservation with human genes, including 75% of disease-related genes, and has proven to be an accurate model for studying human diseases ranging from neurological and endocrine diseases to muscular and cardiac disorders [18–23].

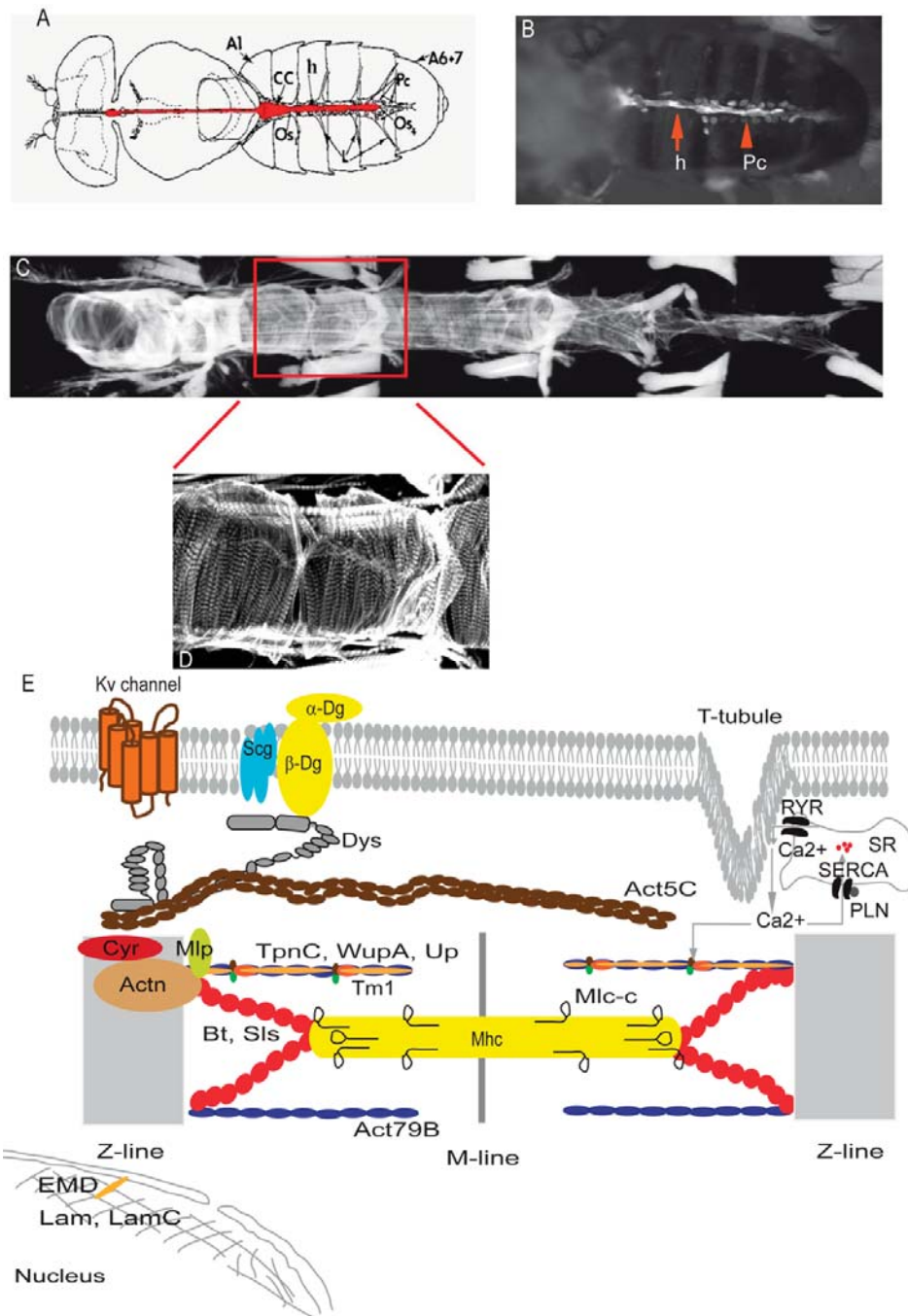
Following the discovery of the homeobox transcription factor Tinman (Tin) in *Drosophila* [24], regulatory cardiogenic network and conserved mechanisms with higher organisms have been elucidated [25,26]. In particular, it has been shown that the cardiac master genes *tinman/Nkx2-5*, *neuromancer/Tbx20*, *pannier/GATA4/6* and *dHand/Hand* not only specify the heart during development but also play a role in heart function in both the adult fly and in humans [27–31]. As a consequence, the extended conservation of transcriptional and signaling networks that control cardiac development and heart physiology made the fly a model of choice for studying human cardiac diseases [19,25,32–36].

The *Drosophila* heart is a relatively simple linear tube located dorsally in the body (Figure 1A,B). It originates, like the vertebrate heart, from the lateral part of the mesoderm. The fly heart comprises two rows of contractile cells that form an inner lumen known as the myocardium and the non-muscular pericardial cells that align along the myocardial cells. The contractile cells contain spirally oriented myofibrils covered by a ventral layer of longitudinal non-myocardial muscle cells running along the heart tube (Figure 1C,D). Importantly, *Drosophila* cardiomyocytes have a sarcomeric structure and components similar to mammalian cardiac cells [37] (Figure 1E).

The availability of genetic tools makes the fruitfly not only an excellent model for investigating heart development but also for studying heart function and cardiac aging. The development of a large set of cardiac physiology assays to measure heart rate, rhythmicity, and contractility provided means to assess heart function defects in the generated fruitfly models of cardiac diseases [22]. Among them, extracellular and intracellular electrical recordings have been developed to monitor the fly electrocardiogram (ECG) [38–40]. Intracellular action potentials have been reported from both larvae and intact pupae. Action potentials were recorded from the posterior part of larval heart preparations with a standard microelectrode recording technique [40]. This study has identified that the two-pore domain potassium channel Ork1 likely sets the resting membrane potential and regulates heart rate and rhythm. In pupae, the intracellular recording was performed by sharpened tungsten electrodes that were inserted near the anterior part and in the caudal end of the heart [38]. The ECG generated from pupae bearing the *shibire* mutation showed irregular and compromised electrical currents, with a slower and less rhythmic heartbeat [38]. The extracellular recording system consists of using a micropipette tip to monitor the potential generated by spontaneous heart contractions for a 6–8 h period. An excitatory effect has been demonstrated while exposing the heart to octopamine with a reduction in amplitude of the extracellular potential [39]. Optical recording of cardiac activity directly through the cuticle [41] and projecting infrared light through the dorsal side of the abdomen [42] allowed recording pulsations of the heart. The noninvasive optical detections based on hearts expressing Green

Fluorescent Protein (GFP) allowed observation under the microscope of the heart movements through the dorsal cuticle [41]. However, the projection of infrared light through the dorsal side of the abdomen followed by the collection of the pulse signal by a multichannel sensor chip has proven effective for obtaining a survey of periodic heartbeat reversals [42]. Similarly, the heart movements were tracked by a photodiode-transistor-based assay and video microscopy [43,44] whereas in live pupae, an edge-tracing system has been developed for tracking heart wall movements [45]. Measurements of transmitted light through the late-stage larvae change in consonance with the heart movements as the heart changes its shape in a diastole/systole cyclical fashion. The lightening and the darkening of the heart wall thus produce a trace of changing light exposure reflecting the cardiac rate and rhythmicity [43,44]. A similar method has been employed in which pixel-tracing camera technology has replaced the photodiode [45]. To assess heart failure (cardiac arrest or fibrillation) under stress conditions, a method that employs external electrical pacing or elevated temperature to drive increased heart rates has been useful in gauging cardiac performance [45–47]. In such assays, adult hearts are paced to a higher rate by increasing the temperature [46] or by passing through a current of 6 Hz for a time length of 30 s [45]. Immediately after pacing, the flies are scored depending on whether the heart can still contract following the stimulation or whether it fails to beat. Both cardiac stress tests were used to compare the effects of different mutations and the effect of age on heart performance. Moreover, the so-called Semi-automatic Optical Heartbeat Analysis (SOHA) method based on high-speed movies recorded from semi-intact adult fly heart preparations allowed detailed image-based analysis and characterization of cardiac parameters [48,49] whereas the optical coherence tomography (OCT) has been successfully adapted to assess cardiac parameters in awake flies [50]. The SOHA method relies on using two algorithms that have been developed to combine information extracted from overall darkness changes of the frame movie and pixel-wide intensity changes detected only in the regions that are moving from one frame to another in recorded images at a speed of 150 frames per second. The noninvasive image acquisition technique OCT has also been adapted to flies and permits detailed measurements of live cardiac performance in intact animals. In this technique, the internal space of the heart chamber is detected in real time as it shortens and expands through an ultrasound exposure. Both methods allow us to produce high-resolution qualitative records of heart wall movements (M-mode) and detailed parameters of cardiac function including diastolic/systolic interval diameters, fractional shortening, and heart rate. More recently, an alternative cardiac-specific pacing approach based on optogenetics has been developed to investigate rhythm disorders [51]. This method combines transgenic flies expressing channelrhodopsin-2 (ChR2), a light-gated cation channel, in the heart, and optical coherence microscopy to noninvasively analyze the heart structure and function *in vivo* [51]. Optogenetic pacing and capture of the response of the ChR2-expressing *Drosophila* heart to stimulation pulses can be performed at different developmental stages, including larva, pupa and adult. Finally, an atomic force microscopy-based indentation approach was applied to measure the myocardial stiffness, offering a mean to investigate heart cells' mechanical properties and diastolic dysfunction [52]. Briefly, this technique uses a silicon cantilever with a 2  $\mu\text{m}$  borosilicate sphere tip that is placed directly on the heart, stepped down and its deflection measured with a laser, providing a relative measure of stiffness. Using this approach, it has been shown that the stiffness of the heart changes with age or due to a particular genetic background.

In this review, we provide an overview of the fly model contributions to the understanding of genetic determinants and cellular pathways underlying channelopathies and cardiomyopathies. We discuss examples of insights gained from *Drosophila* models into pathogenic mechanisms involved in the cardiac remodeling processes or dysfunction which contribute to heart failure. We also address the challenges in CVD modeling in terms of therapy development, modifier screens and polygenic disorder investigations. Overall, this review pinpoints the growing interest in the fruitfly model and its applications to cardiac disorders.



**Figure 1.** Adult heart structure and schematic representation of the cytoarchitectural proteins involved in cardiomyopathies. (A) Illustration demonstrating the heart tube located along the dorsal abdominal midline. CC: conical chamber; Os: ostia; h: heart; Pc: pericardial cells; A1: Abdominal segment 1; (B) Semi-intact preparation of *Drosophila* with ventral abdominal cuticle showing the green fluorescent protein expression in the heart tube (Hand-Gal4 > GFP); (C) Representative confocal stacks of the fly heart (anterior to left) stained with actin-phalloidin. Abdominal segment 2 is outlined in red; (D) Representative confocal stacks of A2 segment stained with actin-phalloidin revealing detail of heart structure; (E) Schematic representation of the cytoarchitectural components in flies. Some of the proteins studied induced cardiomyopathies in *Drosophila*. Kv channel: voltage-activated potassium channel; Dg: Dystroglycan; Scg: Sarcoglycan; RYR: ryanodine receptors; SERCA: Sarcoendoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase; SR: sarcoplasmic reticulum; PLN: Phospholamban; Dys: Dystrophin; Act: Actin; Cyr: Cypher; Actn:  $\alpha$ -actinin; Mlp: Muscle LIM protein; Bt: Bent; Sls: Sallimus; TpnC: Troponin-C; WupA: Troponin-I; Up: Troponin-T; Tm1: tropomyosin; Mhc: Myosin heavy chain; Mlc: Myosin light chain; EMD: Emerin; Lam: Lamin.

## 2. Cardiovascular Disease Modeling Using *Drosophila*

With the recently developed techniques to assess *Drosophila* heart function, this model has been used to study channelopathies [40,44,48,53,54] and inherited cardiomyopathies including DCM, RCM and HCM [55–60].

### 2.1. Channelopathies

Ion channels are pore-forming proteins that selectively control ionic movement across the cell membrane and coordinate electrical signals in most tissues. Ion channels are either depolarizing cells, by moving positively charged ions in, or repolarizing cells, by moving positively charged ions out. Mutations in genes coding for ion channel subunits or any related regulators cause human diseases known as channelopathies, including Brugada syndrome and Long QT syndrome. We focus here only on the heart channelopathies.

*Drosophila* has made an important contribution in the field of channels, thanks to the forward genetic approach, by the identification and cloning of the *Shaker*, *ether-a-go-go*, *seizure*, and *slowpoke* genes. Genetic screens conducted in flies first allowed us to identify the voltage-activated potassium channel gene ( $K_v$ ) named *Shaker*, a member of the  $K_v1$  family [61–63]. One member of this family in humans, channel  $K_v1.5$ , has been involved in cardiac repolarization and associated with atrial fibrillation and is a target of anti-arrhythmic drugs [64,65]. The screening for shaker-related genes in flies allowed the discovery of other  $K^+$  channels such as *Shab*, *Shaw*, and *Shal* [66–68] and subsequent cloning of their orthologs in mammals,  $K_v2.1$ ,  $K_v3$ , and  $K_v4.3$ , respectively [69]. In *Drosophila*, blocking the *Shab* channel resulted in the slowing of heart beats but, unlike other  $K^+$  channels, did not lead to cardiac arrhythmia [54] (Table 1). In vertebrates,  $K_v2.1$  was found enriched in human ventricles and in mice and plays a role in repolarizing current in ventricular myocytes [70,71]. Also, the expression of the  $K_v4.3$  channel is altered in cardiac pathologies such as Brugada syndrome and is involved in transient outward potassium current in the human heart [72,73].

Further studies in flies identified additional channel-encoding genes including *ether-a-go-go* (*eag*) [74], *eag-related gene* (*erg*), also named *seizure* (*sei*) and *eag-like  $K^+$  channel* (*elk*), known in vertebrates as  $K_v10$ ,  $K_v11$  and  $K_v12$ , respectively [75,76]. For instance, *eag* mutant flies exhibit slightly affected rhythmicity of the heart [44]. In humans, *HERG*, the ortholog of the *Drosophila erg* channel, caused arrhythmias (Long QT interval) [77]. Moreover, the first  $Ca^{2+}$  and voltage-dependent  $K^+$  channel *slowpoke* (*slo*) has been identified in *Drosophila* [78], with mouse and human *slo* genes cloned afterwards [79]. In mammals, abnormal intracellular  $Ca^{2+}$  handling and increased blood pressure have been related to mutations in the  $\beta 1$  subunit of *slo*, suggesting the *slo* channel activators could represent a good target of treatment in coronary heart disease [80,81].

In humans, the cardiac action potential repolarization depends on  $K^+$  channel currents categorized in early activating/inactivating transient outward currents ( $I_{to}$ ) and delayed rectifiers ( $I_k$ ) contributing to the later phase of membrane repolarization [82]. Multiple types of myocardial  $K^+$  channels contribute to the action potential waveforms and to the normal cardiac rhythm [83]. Mutations in these  $K^+$  channels lead to prolonged ventricular repolarization (*i.e.*, a prolonged QT interval), as manifested by Long QT syndrome, and ventricular tachycardia called *torsades des pointes*, life-threatening cardiac arrhythmias [84]. Most commonly, the delayed repolarization is due to mutations in the  $\alpha$ -subunit of ion channels involving either *KCNQ1* ( $I_{ks}$ ) or *HERG* ( $I_{kr}$ ), responsible for the slow and rapid repolarizing of cardiac potassium currents [85,86]. Remarkably, the *Drosophila KCNQ* gene shares a conserved function with its human ortholog and maintains a rhythmic heartbeat. Null mutations in the fly *KCNQ* gene lead to repolarization defects characterized by prolonged contractions and increased arrhythmias, which worsen with age [48] (Table 1). In flies, the administration of *KCNQ* inhibitors, such as chromanol, phenocopies *KCNQ* mutant cardiac defects [87].



Interestingly, the young flies show a myogenic rhythmic beating pattern that deteriorates as they age, and by five to seven weeks *wildtype* flies exhibit non-rhythmic heart contractions with frequent asystoles and fibrillations [48]. The pronounced arrhythmias in aged flies are reminiscent of the age-dependent increase in atrial fibrillation in the aging human population [88]. Of note, cardiac-specific over-expression of *KCNQ* in aging *wildtype Drosophila* hearts strikingly reduced the incidence of arrhythmias [89]. Unlike the human heart, the  $K^+$  channels *HERG* and *KCNQ* do not play a role in action potential repolarization in adult murine hearts, with rapid repolarization and no clear plateau phase [90]. This suggests that the fly heart model may be a useful alternative for studying the  $K^+$  channel functions in cardiac repolarization and arrhythmogenic disorders.

In addition, the function of the two-pore domain potassium channel *ORK1* has been analyzed in *Drosophila*. *ORK1* mutants were found to display increased heart rate whereas over-expression of *ORK1* can stop the heart from beating [40]. Also, the  $K^+$  channel named *dSUR* (*KATP*), known to be ATP-sensitive, was found to protect against hypoxic stress and pacing stress and, when mutated, induced heart failure in *Drosophila* [53]. The protective role of *KATP* has been observed in mammalian hearts under ischemia/reperfusion injury [91]. Pharmacological activation of the *KATP* channel in old flies by treating them with pinacidil reduced their susceptibility to pacing-induced heart failure [53], indicating that *KATP* channel activity contributes to a youthful heart performance (Table 1). In relation to ion channels, the *Drosophila* model has also been used to study atrial fibrillation disease, the most common clinical tachycardia, characterized by changes in electrical, structural and functional properties of cardiomyocytes [92]. Tachypacing *Drosophila* pupae resulted in a significant reduction in the amplitude of heart wall shortening and in contraction rate, and an increase in arrhythmias. Furthermore, the authors showed that genetic or pharmacological induction of heat shock proteins, especially *DmHSP23* (ortholog of human *HSPB1*), protects against tachypacing-induced contractile dysfunction [92]. Similar findings are observed in an *in vitro* atrial cell line model of tachycardia and *in vivo* in dogs subjected to atrial fibrillation [93].

## 2.2. Cardiomyopathies

In mammals, as in *Drosophila*, mutations in sarcomeric or cytoskeletal/sub-membranous proteins have been implicated in the pathogenesis of the inherited cardiomyopathies.

### 2.2.1. HCM

HCM is a relatively common genetic disease caused by a variety of gene mutations, the majority of which encode sarcomere proteins [94]. Several hundred distinct mutations in over a dozen proteins have been identified in patients with HCM [95]. These include cardiac myosin binding protein C (*MYBPC3*), cardiac  $\alpha$ -myosin heavy chain (*MYH6*), cardiac  $\beta$ -myosin heavy chain (*MYH7*), cardiac troponin T (*TNNT*), cardiac troponin I (*TNNI3*), cardiac troponin C (*TNNC1*), regulatory and essential myosin light chain (*MYL2* and *MYL3*),  $\alpha$ -tropomyosin (*TPM1*), titin (*TTN*), and cardiac actin (*ACTC1*) [96,97]. Other proteins account for few cases of HCM and include myozenin 2 (*MYOZ2*), MLP (*CSRP3*), telethonin (*TCAP*), metavinculin (*VCL*) and junctophilin-2 (*JPH2*) and so forth [98–102]. Data from human patients suggest that approximately 60% of HCMs occur from dominant mutations of sarcomere protein genes and, among those, *MYH7* and *MYBPC3* predominate in frequency [103,104]. For example, several reports on the molecular performance of myosin revealed compromised motor biomechanical functions and, hence, hypo-contractile myocardium which is compensated by hypertrophy [105,106]. However, other studies show that specific HCM mutations isolated from murine cardiac tissue encode myosin with enhanced functional properties [107,108], suggesting that the pathophysiology of HCM is quite variable and diverse related to particular mutations, causal mechanisms and the hypertrophic response.

Recently, it has been shown that the *Drosophila* heart can undergo hypertrophy, similar to humans, in response to signals of receptor tyrosine kinase EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) and the downstream molecules such as the small GTP-ase Ras and the serine/threonine-specific protein kinase Raf [57] (Table 1). The activation of EGFR, Ras and Raf increases the heart wall thickness and reduces the cardiac lumen size at diastole in adult flies. Heart-specific down-regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK), one of the downstream effectors of Raf, prevented Raf-mediated cardiac hypertrophy. Moreover, it has been shown that Yorkie (Yki), a transcriptional coactivator in the Hippo pathway, also is stimulated by Raf to promote cardiac hypertrophy and the cardiac-specific knockdown of Yki inhibited Raf-mediated HCM in flies [59]. The authors showed in flies as well as in mammalian cells that Yki induces activity of a common downstream transcription factor, Scalloped. In addition, expressing constitutively active calcineurin, a calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase, in the fly heart induced cardiac hypertrophy, similar to mammals where calcineurin is a known mediator of cardiac hypertrophy [60,109–111]. Interestingly, a genetic screen for modifiers of the calcineurin-mediated hypertrophy in flies identified galactokinase as a new suppressor of the cardiac remodeling [60]. It remains now to verify if this regulator is involved in the HCM pathway in mammals (Table 1).

### 2.2.2. DCM

DCM is caused by mutations in various genes encoding sarcomeric proteins, cytoskeletal proteins, sarcolemmal membrane and nuclear envelope proteins [112–114]. These causative genes include *dystrophin*, *desmin*, *lamin A/C*,  $\delta$ -*sarcoglycan*,  $\beta$ -*sarcoglycan*, *metavinculin*,  $\beta$ -*myosin heavy chain*, *myosin-binding protein C*, *actin*,  $\alpha$ -*tropomyosin*, *cardiac troponin T* and *C*, *telethonin*, *phospholamban* and sodium-channel gene *SCN5A*, and so forth [115]. It is important to note that the HCM-causing mutations in many sarcomeric proteins are different from those inducing DCM pathogenesis. For example, the DCM-causing mutations in TNNT2 decrease the myofilament sensitivity to cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  and thus impair the systolic function [116–119]. The only TNNT mutation tested in flies so far is Glu88Lys, the one that may compromise the tropomyosin-TNNT associations and shows diastolic dysfunction, a hallmark of HCM and RCM [58]. It remains to be studied if this TNNT mutation tested in flies has decreased the calcium-dependent regulatory role in myofilament activation.

Interestingly, functionally depressed MHC mutant fly hearts characterized by a decreased actin-sliding velocity are significantly dilated and exhibit systolic dysfunction reflected by a drop in fractional shortening [55]. Of note, *Unc-45* knockdown, a chaperone protein necessary for myosin folding, also displays DCM [120]. Likewise, in mammals, MHC mutations found to be associated with DCM have been implicated in the disruption of myosin-actin interactions, possibly decreasing the actomyosin ATPase rates [108,121]. Other sarcomeric mutations showed a similar effect on the *Drosophila* heart tube. Mutations in Troponin I and Tropomyosin 2, which cause aberrant contractile properties, also show enlarged hearts, depressed fractional shortening and cause a phenotype reminiscent of DCM [50] (Table 1).

Examples of cytoskeletal/sub-membranous protein mutations have been associated with DCM. Transgenic flies harboring the cardiac-specific expression of human  $\delta$ -sarcoglycan<sup>S151A</sup>, a mutation associated with familial DCM, demonstrated enlarged cardiac tubes and impaired systolic function in comparison to the expression of the human *wildtype* allele [50]. Likewise, fly mutants lacking the  $\delta$ -*sarcoglycan* gene developed DCM [122]. As in mammals, *Drosophila* recapitulates cardiac phenotypes caused by *dystrophin* mutations. Interestingly, mutant flies for *dystrophin* developed distended systole and diastole diameters, impaired systolic function and age-dependent abnormalities in heart myofibrillar organization [56] (Table 1) (Figure 2).

As for cytoarchitectural proteins, fly mutants of signaling pathway components such as rhomboid 3 (*rho-3*), an intramembrane serine protease involved in EGF activation, as well as the cardiac-specific inhibition of the EGFR cause an enlarged cardiac chamber [123]. Similarly, affecting the EGFR function in humans by chemotherapies induces the development of DCM and heart failure [124]. Screening

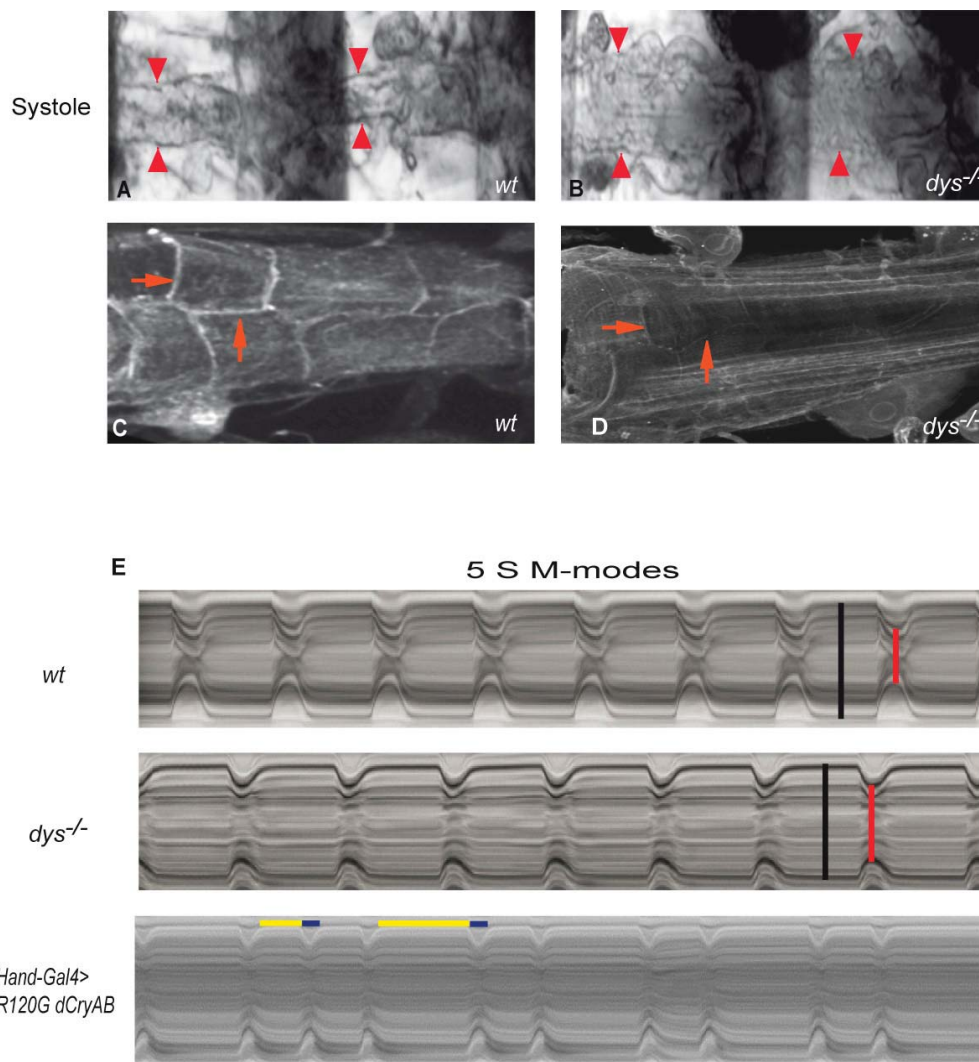
flies harboring genomic deficiencies identified a novel Notch ligand named weary (wry) that induces DCM, suggesting that Notch signaling is important for normal heart function [125]. In addition, an *in vivo* RNAi adult heart screen in *Drosophila* identifies Not3, a component of the CCR4-Not complex. Silencing CCR4-Not components in flies resulted in DCM and myofibrillar disarray, and subsequent experiments in mice show that Not3 haploinsufficiency resulted in impaired cardiac contractility [126]. Thanks to this data, a single-nucleotide polymorphism in the human NOT3 promoter that is associated with prolonged QT intervals and sudden death has been identified [126] (Table 1).

**Table 1.** *Drosophila* models of channelopathies and cardiomyopathies.

Disease Type	Human Gene	<i>Drosophila</i> Model	Major Findings in the <i>Drosophila</i> Model	References	
Channelopathies	K <sup>+</sup> channels	KCNQ1	KCNQ mutants	Increased arrhythmia and prolonged contractions	[48]
		KCNK	ORK1 mutants	Increased HR	[40]
		SUR2	<i>dSUR</i> mutants	Heart failure Protective role against hypoxia and pacing-stress	[53]
		KV2.1	<i>Shab</i> mutants	Reduced HR	[54]
Cardiomyopathies	Hypertrophic CM	EGFR, RAS, RAF1	Cardiac-specific expression of EGFR, Ras, Raf or Yki	Increased heart wall thickness Decreased cardiac lumen volume	[57,59]
		Calcineurin	Cardiac-specific expression of constitutively activated <i>CanA</i>	Enlarged DD and reduced FS Heart wall thickening Identification of <i>Galk</i> as a repressor of <i>CanA</i> induced HCM	[60]
	Dilated CM	TNNI3 and TPM1	<i>wupA</i> and <i>Tm1</i> mutants	Enlarged diameters and impaired systolic function	[50]
		DMD	<i>Dys</i> mutants	Dilated DD, SD and reduced FS DCM rescue by expressing mammalian form of <i>Dys</i> ( <i>Dp116</i> )	[56]
		SGCG	Human $\delta$ -Scg <sup>S151A</sup> /Large deletion of <i>Scg<math>\delta</math></i>	Enlarged heart tube, impaired systolic function and reduced FS	[50,122]
		Myosin Heavy Chain (MYH7)	Hypoactive <i>D45 Mhc</i> mutants	Dilated heart and decreased FS	[55]
		RHBDL2	<i>rho-3</i> mutants	Enlarged cardiac chamber rescued by expression of <i>rho-3</i> , <i>spitz</i> and <i>EGFR</i>	[123]
		N/A	Cardiac-specific <i>Wry</i> RNAi and mutant	Enlarged DD/SD and decreased FS in <i>wry</i> mutants rescued by <i>Notch</i> expression Identification of <i>Wry</i> as a <i>Notch</i> ligand	[125]
		CCR4-NOT3	Cardiac-specific knockdown of <i>Not3</i>	Increased DD, SD and reduced FS	[126]
		Restrictive CM	Myosin Heavy Chain (MYH7)	Hyperactive <i>Mhc</i> <sup>5</sup> mutants	Impaired diastolic function and restrictive heart phenotypes
TNNT2	<i>Up</i> <sup>101</sup> mutants		Reduced DD, SD and FS Prolonged periods of systole and reduced HP	[58]	

Abbreviations: HR: heart rate; HP: heart period; SD: systolic diameter; DD: diastolic diameter; FS: fractional shortening, N/A: not applicable (No known ortholog).





**Figure 2.** Examples of phenotypes reminiscent of dilated cardiomyopathy and arrhythmia in fly hearts. (A) Image of two abdominal segments of a one-week-old *wildtype* (*wt*) heart in systole; (B) One-week-old *dystrophin* (*dys*<sup>-/-</sup>) mutant heart in systole showing a dilated phenotype. Note that the systolic diameters are wider in the *dys*<sup>-/-</sup> mutants compared to *wt*. Arrowheads indicate the heart wall in both genotypes; (C,D) Representative confocal stacks of a segment of adult hearts stained with Dg antibody. Dg is found at the cell membrane of the cardiomyocytes (arrows); (E) Representative M-mode traces (5 s) illustrating movements of heart tube walls (Y-axis) over time (X-axis). Diastolic (**black**) and systolic (**red**) diameters were indicated in each M-mode trace. Wild-type flies show rhythmic heart beating at one-week-old and smaller systolic diameters, compared to *dy*-deficient heart. Diastolic (**yellow**) and systolic (**blue**) intervals were indicated above the *Hand-Gal4 > R120G dCryAB* M-mode trace. Note the expression of a mutation of the small heat shock protein CryAB (R120GdCryAB) induces arrhythmia in flies. Please replace.

Recent work from the Bodmer laboratory showed that the small Rho-GTPase encoded by *Cdc42* interacts with *tin* to regulate heart function in flies. Double heterozygous mutants for *tin/Cdc42* turned out to have a slower heart rate and increased arrhythmias, and showed that the two K<sup>+</sup> channels *dSUR* and *slo* act as downstream mediators of the *tin-Cdc42* pathway [29]. Interestingly, haploinsufficiency of mouse *Cdc42* and *Nkx2-5* resulted in dilated and defective cardiac contraction, suggesting a conserved genetic and functional *Cdc42/Nkx2-5* interaction in mammals [29].

### 2.2.3. RCM

RCM is characterized by decreased volumes of both ventricles and pronounced diastolic dysfunction which results from decreased myocardial wall elasticity. To date, RCM-linked mutations are found in sarcomere protein genes, including *ACTC1*, *TNNI3*, *TNNT*, *MYH7* [127–129]. In addition, missense variants in the *desmin* gene have been identified in several families with desmin-related myopathy and presenting RCM [130]. *In vitro* analysis revealed that the RCM-causing sarcomeric gene mutations drastically increase the myofilament sensitivity to cytoplasmic  $Ca^{2+}$ , a greater enhancement compared to the HCM mutations [131].

In contrast to the cardiac phenotype resulting from depressed myosin function, *Drosophila* hearts expressing kinetically and mechanically enhanced myosin motors displayed morphological and functional cardiac characteristics associated with RCM [55]. The cardiac tubes expressing the hyperactive Mhc<sup>5</sup> myosin exhibit a narrowing of the heart chamber and impaired diastolic function, a phenotype which progressively worsened with age. In addition, *Drosophila* expressing glutamic acid to lysine *Up*<sup>101</sup> troponin-T mutation exhibit a restrictive and stiffer phenotype with diastolic dysfunction, a variant causing elevated numbers of basally cycling myosin cross-bridges [58] (Table 1).

## 3. Pathological Mechanisms Investigated

### 3.1. Impaired Calcium Handling

Cardiac calcium signaling is an important factor in regulating excitation-contraction coupling for proper contraction and relaxation of the heart [132]. The amount of extra- and intra-cellular  $Ca^{2+}$  must be tightly controlled by several genes encoding L- and T-type voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels,  $Na^+/Ca^{2+}$  exchangers (NCX), dihydropyridine receptors, ryanodine receptor (RyR), SR  $Ca^{2+}$  ATP-dependent carrier (SERCA) and phospholamban (a SERCA inhibitor). Mutations in one of these proteins perturb  $Ca^{2+}$  homeostasis and contribute to diastolic dysfunction, causing heart failure or heart hypertrophy [133,134]. The SERCA mutant studies in the fruitfly showed reduced heartbeat as well as increased arrhythmia [135,136]. Also, the SERCA-interacting protein *sarcolamban* (*scl*), named after its mammalian orthologs *phospholamban* (*pln*) and *sarcolipin* (*sln*), has been involved in heart physiology since *scl* mutants exhibit arrhythmic heart contractions that can be linked to  $Ca^{2+}$  transport deficit [137].

Lin and colleagues measured myocardial  $Ca^{2+}$  transients in adult flies using cardiac-specific, genetically encoded, calcium-dependent fluorescent protein (GCaMP2). The authors showed, in troponin I mutants that exhibit impaired cardiac function and dilated cardiomyopathy, abnormalities in cardiac calcium handling, reduced expression of ryanodine receptor transcripts and a decreased response to caffeine-augmented calcium release [138]. Of note, the reduction in the RyR transcript level is consistent with the prolonged duration of 50%  $Ca^{2+}$  rise to peak intensity in the cytoplasm [138]. In addition, *Ryr*<sup>16</sup> larval mutants exhibit a reduced heart rate, mainly due to decreased fast contractions, attesting the functional conservation of RyR with vertebrates [139]. Moreover, as described above, *sarcolamban* mutants exhibit altered rhythmic contractions due to perturbed calcium current and lead to delayed or absent action potential [137], indicating that many genes involved in  $Ca^{2+}$  handling within cardiomyocytes are functionally conserved between *Drosophila* and mammals.

### 3.2. Altered Metabolism

The heart is the organ with the most important demand in energy within the whole body, due to high consumption caused by the excitation-contraction coupling process. Adenosine Triphosphate (ATP) generated from its main substrates, fatty acids, ketone bodies and carbohydrates provides this energy source [140,141]. The balance between energy demand and consumption needs to be controlled for efficient cardiac contraction-relaxation cycles because of the low ATP reserve in the heart. When energy uptake is increased, such as in Western countries due to high fat and high sugar diets, it leads to increased triglyceride and glucose levels, causing obesity and diabetes associated with heart dysfunction. Metabolic syndrome caused by a high fat diet is a disorder recapitulating

these metabolic perturbations (obesity and increased risk of type 2 diabetes mellitus) with increased incidence of cardiomyopathy [142]. Due to the conservation of fat and sugar metabolisms in *Drosophila*, this model has been used to uncover the pathways deregulated in these contexts [138,143–145]. For instance, Birse and colleagues showed that feeding the flies a high fat diet caused a metabolic syndrome similar to what is observed in humans with cardiac dysfunction involving the Insulin-TOR pathways. The high calorie diets induced an increase in Insulin-like peptide 2 (dIIP-2) transcript levels as well as activation of the TOR pathway, as measured by increased 4EBP and S6K phosphorylation [143]. Moreover, a high sugar diet (HSD) has also been assessed in flies and caused insulin resistance and type 2 diabetes with the development of cardiomyopathies. Flies fed with HSD have a reduced lifespan together with increased arrhythmia and deterioration of the heart which are modulated by the Insulin and MAPK pathways [146]. Since patients with a HSD tend to develop diabetes usually associated with cardiac fibrosis, Na and colleagues assessed the level of extracellular matrix proteins in HSD-fed flies [146]. They showed an increase of the type IV collagen-like protein Pericardin, demonstrating the fibrosis-like collagen accumulation in flies with other signs of diabetic cardiomyopathy, reminiscent of the symptoms observed in type 2 diabetes mellitus patients [146]. More recently, the key metabolic genes modulating cardiac lipotoxicity were described, showing the protective role of *Drosophila* Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 (PGC1), called *spargel* (*srl*), downstream of the TOR pathway [147]. The deleterious high calorie diets-induced cardiac dysfunction is alleviated by down-regulating *brummer*, the fly homolog of adipocyte triglyceride lipase (ATGL), and *spargel*, suggesting that cardiac-specific inhibition of TOR blocks the heart effects of a high caloric diet in flies [143,146,147]. Likewise, the induction of SREBP by TOR activation, in parallel to ATGL inhibition, caused FAS induction and lipid storage. These studies describe the genetic network involving several metabolic regulators of lipotoxic cardiomyopathy including the Insulin-TOR pathway, ATGL, PGC1 and SREBP orthologs, already described for their implication in obesity in humans [148]. More recently, the effect of time-restricted feeding (TRF) was studied in the fly, showing its protective effect against age-related cardiac decline compared to a normal unlimited diet [149]. Five-week-old flies fed in a 12 h time-restricted manner have improved cardiac function shown by shorter heart periods, less arrhythmia and better fractional shortening, which has been correlated to the increased sleep duration of these TRF flies. Importantly, TRF protects against the cardiac decline caused by a high fat diet and is mediated by the ATP-dependent TCP-1 ring complex (TRiC), the mitochondrial electron transport chain complex, as well as the circadian clock pathways. In mice, TRF was already demonstrated to be a non-pharmacological lifestyle strategy to prevent obesity and its associated-metabolic deregulations [150] since TRF reduces body weight gain and improves hepatic glucose metabolism in mice fed either with a normal or a high fat diet [150]. Of note, the TRF regimen protected against the perturbation of metabolic regulators such as mTOR and AMPK in comparison to mice fed a high fat diet frequently throughout the day and night.

Moreover, the role of cardiac aging in metabolism regulation has been extensively studied in *Drosophila*. Aging flies exhibit altered heart metabolism with increased arrhythmia, myofibrillar disorganization and dysregulation of Insulin and TOR pathways. Strikingly, reducing Insulin or TOR pathway activation increases lifespan and delays cardiac aging [151–153], showing that aging can be controlled by nutrient-sensing (reviewed elsewhere [154]).

### 3.3. Increased Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction

Oxidative stress caused by reactive oxygen species (ROS), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) or superoxide anions ( $O_2^-$ ) has deleterious effects on cells and can cause damage. In flies, significant elevation or reduction of ROS causes cardiac dysfunction [155]. The authors showed that manipulating the ROS in pericardial cells (PCs) could regulate the heart function in a paracrine manner. ROS activate a p38MAP kinase-dependent signaling cascade in PCs, which affects myocardial cell function and this mechanism does not act through the diffusion of ROS [155]. The Huntington disease fly model, in which the accumulation of polyglutamine (poly-Q) aggregates increases oxidative stress, causes

cardiac defects such as increased arrhythmia and cardiac dilation [156]. The authors demonstrated an increase in dihydroethidium (DHE), reflecting ROS production in cells, after inducing poly-Q repeats in cardiac tissue as well as an increase in density aggregates in mutant flies fed with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. However, the over-expression of superoxide dismutase (SOD), an antioxidant enzyme which catalyzes O<sub>2</sub><sup>-</sup> detoxification, rescued the poly-Q-induced cardiomyopathy. In addition, the over-expression of the antioxidant enzyme catalase suppresses age-induced arrhythmias [157].

Increased reductive stress can also be toxic for the cell, as shown in the Desmin-related myopathy (DRM) *Drosophila* model, using human  $\alpha$ B-crystallin mutant flies (expressing the human *CryAB*<sup>R120G</sup> mutation) that exhibit similar cardiac symptoms as those observed in patients. This model showed a mitochondrial NADP/H metabolism implication in increasing reductive stress and affecting the heart function [158,159]. In more detail, the human *CryAB*<sup>R120G</sup> mutation expressed in flies leads to increased diastolic and systolic diameters, decreased fractional shortening, as well as arrhythmias (Figure 2E), which is reminiscent of DCM in patients. These cardiac defects were alleviated by a cardiac-specific knockdown of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), an enzyme involved in the generation of NADPH as well as its downstream effector, 6-phosphogluconate dehydrogenase (PGD).

#### 3.4. Remodeling of Extracellular Matrix

Among the extracellular matrix (ECM) proteins, fibrillar proteins such as collagen and proteoglycans may play a role in determining the properties of the myocardium [160]. The fly has been used for fine genetic mapping of candidate genes involved in human congenital heart diseases with Down syndrome. Over-expression of these candidate genes individually or in pairwise combinations in the adult fly heart identified DSCAM and COL6A2 as the most strongly interacting pair of genes, causing a slower and less rhythmic heart rate. Afterwards, the same combination of genes has been expressed in the mouse heart, leading to morphological and physiological defects [161]. Double-transgenic mice exhibit increased heart wall thickness of the left ventricle and the interventricular septum (hypertrophy phenotype). Several transcripts were affected in the hearts of the double-transgenic mice over-expressing DSCAM and COL6A2, including those encoding focal adhesion protein Tenascin N, cardiac Troponin T and calcium-binding protein S100A4. Further analyses of identified candidate genes in the *Drosophila* model will help in understanding the impact of extracellular matrix remodeling on cardiac function.

## 4. Challenges in CVDs Modeling

Examples provided here clearly show that the *Drosophila* heart model has already proved its value in investigating regulatory pathways that underlie CVDs. Numerous factors that are conserved between flies and humans correspond to cytoarchitectural or signaling components bearing pathological mutations known to cause CVDs. The ease in using *Drosophila* genetics makes it possible to design screens to identify second-site modifying mutations such as enhancers and suppressors of mutant phenotypes. Similar genetic interaction screens in vertebrate models are problematic because of time, cost, and early lethality or modest mutant phenotypes due to genetic redundancy. Of note, the lack of genetic redundancy in flies may represent a limitation since the associated gene regulatory networks that are present in the vertebrate system may not be functional in the fly. Also, because of evolutionary distance and morphological differences, *Drosophila* cannot be an exact model of detailed heart physiology. The fly heart has a single chamber and is a part of an open circulatory system with anterograde and retrograde beats controlled by two pacemakers [42,162]. These reversal beats can cause irregularities in the adult heart rate, making assessment of the conduction defects difficult in intact flies. The *Drosophila* heart is also not adapted to perform ischemia/reperfusion studies as it has a single layer of cardiomyocytes without coronary arteries and relies on oxygen delivery by diffusion. However, a short lifecycle and conserved genetic networks governing cardiac development and function make this organism an attractive model for investigating the inherited CVDs, including cardiomyopathies and channelopathies. In addition, several genetic tools have been developed in flies



during recent years that have further strengthened this model and permit unparalleled investigative power relative to other model systems. It is now possible to manipulate different binary expression systems to independently target cell type, level and timing. In such strategies, gene over-expression, misexpression or silencing due to RNA interference or dominant-negative proteins can be achieved using the bipartite GAL4-UAS system (GAL4-Upstream Activating sequence), the LexA system, the split Gal4/LexA system, and the Q system [163–167]. In conjunction with the large collections of fly mutants and cardiac phenotyping techniques available, the *Drosophila* heart continues to be efficient for uncovering new modifier genes that affect the penetrance of the phenotypes and for revealing polygenic interactions that are difficult to pursue in the mammalian heart.

One of the major challenges is the large number of DNA sequence variants, generated by the new sequencing technologies and personalized medicine. Distinguishing the pathogenic mutations from the background of human genetic polymorphism has emerged as problematic for interpreting the genetic test results of the cardiomyopathy/channelopathy diagnosis [168–170]. Owing to the complexity involved in correctly interpreting DNA variants, and in order to differentiate pathogenic disease-causing mutations from otherwise polymorphism, *in vivo* testing in fly heart function could be informative and can be complementary to the variant interpretation algorithms, which are under development.

Interestingly, the *Drosophila* heart has been used to easily assess the potential effect of drug therapy. For example, drug screening allowed the identification of candidate drugs for the treatment of atrial fibrillation (AF) in the fly. Tachypacing of fly pupae resulted in cardiomyocyte remodeling, reduced the contraction rate, and increased arrhythmia and reduction in heart wall shortening. A preventive protective effect is observed in tachypaced pupae after a heat-shock or pretreatment with HSP-inducers GGA and BGP-15 [92,171]. Similarly, HDAC and Sirtuins have also been implicated in AF since the treatment with HDAC or Sirtuin inhibitors (Tubacin and Nicotinamide, respectively) before tachypacing induction prevents the *Drosophila* heart from contractile dysfunction, which is reminiscent of human AF [172].

Moreover, drugs can be of help in validating the role of several ionic channels by using specific inhibitors of these channels and analyzing the fly heart physiology. For example, the administration of  $K_{ATP}$  channel inhibitor tolbutamide in flies phenocopied the increased heart failure rate observed in *dSUR* mutants. In the same way, the chromanol *KCNQ* inhibitor mimicked the increased arrhythmicity observed in *KCNQ* mutants [87].

More recently, work from Chakraborty and colleagues tested the role of Pentamidine, a drug previously involved in reducing toxic foci in myotonic dystrophy type 1 (DM1) cultured cells and mice models [173]. They showed decreased cardiac arrhythmia and improved contractility that could be due to muscleblind release from nuclear foci in adult flies expressing 250 CUG specifically in the heart [174]. Moreover, methylene blue (MB) also showed its beneficial effect on two disease models with heart involvement, Friedreich's ataxia (FRDA) and Huntington disease (HD). In FRDA, MB rescued the heart dilation caused by heart-specific frataxin depletion whereas MB partially protected the *Drosophila* heart against mutant huntingtin expression due to improvement of mitochondrial function [175,176].

Recent advances in genetic and imaging tools available to study heart function in flies open a possibility to apply this powerful model for high-throughput drug screenings and for the preclinical evaluation of drug effects. So far, cell-based assays or isolated tissues are used for the selection of cardiovascular-safe drugs, where physiological effects cannot be monitored. Thus, the fly model, by providing a mean to evaluate the drug-induced changes in cardiac electrophysiology and in the structural integrity of heart tissue, appears as an attractive, complementary method for cardiac drug screening and assessment.

## 5. Conclusions

While the fruitfly heart is a simple linear cardiac tube in comparison with higher vertebrates, investigations of the *Drosophila* heart have yielded new insights into mammalian cardiac development

and function. The morphological differences that exist between the fly and the human heart (e.g., single chamber, lack of coronary circulation and non-cardiac cells) limit the utility of the fly as a model for certain types of human heart disorders such as coronary diseases. Nevertheless, the above findings suggest that the molecular pathways involved in the inherited cardiomyopathies and the channelopathies may be conserved between flies and humans since many cytoarchitectural and signaling protein mutations cause similar heart defects in flies.

Identification of molecular and functional mechanisms of heart disease-causing mutations is essential to understand the pathways that link an altered gene to a clinical phenotype. The development of transgenic models such as flies has been proven to be efficient for functional studies in cardiovascular diseases. In fact, *Drosophila* genetics provide a mean to (1) identify genes and pathways that potentially contribute to channelopathies and cardiomyopathies; (2) discover the mechanisms by which protein mutations trigger signals that result in the remodeling of the heart; (3) test, verify or validate the pathogenic DNA variants associated with heart diseases; and (4) screen for pharmacological agents to identify novel therapeutics. Given the range of heterogeneity and phenotypes of the familial cardiomyopathies and channelopathies, the role of modifier screens in flies will be beneficial in gaining time for identifying new components or mechanisms involved in human cardiovascular diseases.

**Acknowledgments:** This work has been funded by the French Association against Myopathies (AFM-Telethon), the Agence Nationale de la Recherche (ANR) and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM).

**Author Contributions:** O.T.-L. and E.P. made an extensive bibliographic work. O.T.-L., E.P. and K.J. wrote the paper.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Nichols, M.; Townsend, N.; Scarborough, P.; Rayner, M. Cardiovascular disease in Europe 2014: Epidemiological update. *Eur. Heart J.* **2014**, *35*, 2929. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Go, A.S.; Mozaffarian, D.; Roger, V.L.; Benjamin, E.J.; Berry, J.D.; Blaha, M.J.; Dai, S.; Ford, E.S.; Fox, C.S.; Franco, S.; *et al.* Executive summary: Heart disease and stroke statistics—2014 update: A report from the American Heart Association. *Circulation* **2014**, *129*, 399–410. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Callis, T.E.; Jensen, B.C.; Weck, K.E.; Willis, M.S. Evolving molecular diagnostics for familial cardiomyopathies: At the heart of it all. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2010**, *10*, 329–351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Maron, B.J.; Gardin, J.M.; Flack, J.M.; Gidding, S.S.; Kurosaki, T.T.; Bild, D.E. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults. *Circulation* **1995**, *92*, 785–789. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Maron, B.J. Hypertrophic cardiomyopathy: A systematic review. *JAMA* **2002**, *287*, 1308–1320. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Dec, G.W.; Fuster, V. Idiopathic dilated cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* **1994**, *331*, 1564–1575. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Codd, M.B.; Sugrue, D.D.; Gersh, B.J.; Melton, L.J., 3rd. Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy. A population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1975–1984. *Circulation* **1989**, *80*, 564–572. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Kushwaha, S.S.; Fallon, J.T.; Fuster, V. Restrictive cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* **1997**, *336*, 267–276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Kubo, T.; Gimeno, J.R.; Bahl, A.; Steffensen, U.; Steffensen, M.; Osman, E.; Thaman, R.; Mogensen, J.; Elliott, P.M.; Doi, Y.; *et al.* Prevalence, clinical significance, and genetic basis of hypertrophic cardiomyopathy with restrictive phenotype. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2007**, *49*, 2419–2426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Sen-Chowdhry, S.; Morgan, R.D.; Chambers, J.C.; McKenna, W.J. Arrhythmogenic cardiomyopathy: Etiology, diagnosis, and treatment. *Annu. Rev. Med.* **2010**, *61*, 233–253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Basso, C.; Corrado, D.; Thiene, G. Cardiovascular causes of sudden death in young individuals including athletes. *Cardiol. Rev.* **1999**, *7*, 127–135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

12. Tabib, A.; Loire, R.; Chalabreysse, L.; Meyronnet, D.; Miras, A.; Malicier, D.; Thivolet, F.; Chevalier, P.; Bouvagnet, P. Circumstances of death and gross and microscopic observations in a series of 200 cases of sudden death associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy and/or dysplasia. *Circulation* **2003**, *108*, 3000–3005. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Towbin, J.A. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: A paradigm of overlapping disorders. *Ann. Noninvasive Electrocardiol.* **2008**, *13*, 325–326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Corrado, D.; Basso, C.; Thiene, G.; McKenna, W.J.; Davies, M.J.; Fontaliran, F.; Nava, A.; Silvestri, F.; Blomstrom-Lundqvist, C.; Wlodarska, E.K.; *et al.* Spectrum of clinicopathologic manifestations of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: A multicenter study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **1997**, *30*, 1512–1520. [[CrossRef](#)]
15. Bedell, M.A.; Largaespada, D.A.; Jenkins, N.A.; Copeland, N.G. Mouse models of human disease. Part II: Recent progress and future directions. *Genes Dev.* **1997**, *11*, 11–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Peters, L.L.; Robledo, R.F.; Bult, C.J.; Churchill, G.A.; Paigen, B.J.; Svenson, K.L. The mouse as a model for human biology: A resource guide for complex trait analysis. *Nat. Rev. Genet.* **2007**, *8*, 58–69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Martins, P.C.M.; Ayub-Guerrieri, D.; Martins-Bach, A.B.; Onofre-Oliveira, P.; Malheiros, J.M.; Tannus, A.; de Sousa, P.L.; Carlier, P.G.; Vainzof, M. Dmdmdx/Largemyd: A new mouse model of neuromuscular diseases useful for studying physiopathological mechanisms and testing therapies. *Dis. Model. Mech.* **2013**, *6*, 1167–1174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Reiter, L.T.; Potocki, L.; Chien, S.; Gribskov, M.; Bier, E. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* **2001**, *11*, 1114–1125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Bier, E.; Bodmer, R. *Drosophila*, an emerging model for cardiac disease. *Gene* **2004**, *342*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Sparrow, J.; Hughes, S.M.; Segalat, L. Other model organisms for sarcomeric muscle diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2008**, *642*, 192–206. [[PubMed](#)]
21. Lloyd, T.E.; Taylor, J.P. Flightless flies: *Drosophila* models of neuromuscular disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2010**, *1184*, e1–e20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Piazza, N.; Wessells, R.J. *Drosophila* Models of Cardiac Disease. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2011**, *100*, 155–210. [[PubMed](#)]
23. Plantié, E.; Migocka-Patrzałek, M.; Daczewska, M.; Jagla, K. Model Organisms in the Fight against Muscular Dystrophy: Lessons from *Drosophila* and Zebrafish. *Molecules* **2015**, *20*, 6237–6253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Bodmer, R. The gene tinman is required for specification of the heart and visceral muscles in *Drosophila*. *Development* **1993**, *118*, 719–729. [[PubMed](#)]
25. Olson, E.N. Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. *Science* **2006**, *313*, 1922–1927. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Black, B.L. Transcriptional pathways in second heart field development. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2007**, *18*, 67–76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Qian, L.; Mohapatra, B.; Akasaka, T.; Liu, J.; Ocorr, K.; Towbin, J.A.; Bodmer, R. Transcription factor neuromancer/TBX20 is required for cardiac function in *Drosophila* with implications for human heart disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 19833–19838. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Qian, L.; Bodmer, R. Partial loss of GATA factor Pannier impairs adult heart function in *Drosophila*. *Hum. Mol. Genet.* **2009**, *18*, 3153–3163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Qian, L.; Wythe, J.D.; Liu, J.; Cartry, J.; Vogler, G.; Mohapatra, B.; Otway, R.T.; Huang, Y.; King, I.N.; Maillet, M.; *et al.* Tinman/Nkx2-5 acts via miR-1 and upstream of Cdc42 to regulate heart function across species. *J. Cell Biol.* **2011**, *193*, 1181–1196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Jay, P.Y.; Harris, B.S.; Maguire, C.T.; Buerger, A.; Wakimoto, H.; Tanaka, M.; Kupersmidt, S.; Roden, D.M.; Schultheiss, T.M.; O'Brien, T.X.; *et al.* Nkx2-5 mutation causes anatomic hypoplasia of the cardiac conduction system. *J. Clin. Investig.* **2004**, *113*, 1130–1137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Moskowitz, I.P.G.; Kim, J.B.; Moore, M.L.; Wolf, C.M.; Peterson, M.A.; Shendure, J.; Nobrega, M.A.; Yokota, Y.; Berul, C.; Izumo, S.; *et al.* A molecular pathway including Id2, Tbx5, and Nkx2-5 required for cardiac conduction system development. *Cell* **2007**, *129*, 1365–1376. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Bodmer, R. Heart development in *Drosophila* and its relationship to vertebrates. *Trends Cardiovasc. Med.* **1995**, *5*, 21–28. [[CrossRef](#)]



33. Bodmer, R.; Venkatesh, T.V. Heart development in *Drosophila* and vertebrates: Conservation of molecular mechanisms. *Dev. Genet.* **1998**, *22*, 181–186. [[CrossRef](#)]
34. Cripps, R.M.; Olson, E.N. Control of cardiac development by an evolutionarily conserved transcriptional network. *Dev. Biol.* **2002**, *246*, 14–28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Sink, H. *Muscle Development in Drosophila*; Springer Science & Business Media: New York, NY, USA, 2007.
36. Choma, M.A.; Suter, M.J.; Vakoc, B.J.; Bouma, B.E.; Tearney, G.J. Physiological homology between *Drosophila melanogaster* and vertebrate cardiovascular systems. *Dis. Model. Mech.* **2011**, *4*, 411–420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Cammarato, A.; Ahrens, C.H.; Alayari, N.N.; Qeli, E.; Rucker, J.; Reedy, M.C.; Zmasek, C.M.; Gucek, M.; Cole, R.N.; Van Eyk, J.E.; *et al.* A mighty small heart: The cardiac proteome of adult *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e18497. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Johnson, E.; Ringo, J.; Dowse, H. Dynamin, encoded by shibire, is central to cardiac function. *J. Exp. Zool.* **2001**, *289*, 81–89. [[CrossRef](#)]
39. Papaefthymiou, C.; Theophilidis, G. An *in vitro* method for recording the electrical activity of the isolated heart of the adult *Drosophila melanogaster*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **2001**, *37*, 445–449. [[CrossRef](#)]
40. Lalevée, N.; Monier, B.; Sénatore, S.; Perrin, L.; Sémériva, M. Control of Cardiac Rhythm by ORK1, a *Drosophila* Two-Pore Domain Potassium Channel. *Curr. Biol.* **2006**, *16*, 1502–1508. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Dulcis, D.; Levine, R.B.; Ewer, J. Role of the neuropeptide CCAP in *Drosophila* cardiac function. *J. Neurobiol.* **2005**, *64*, 259–274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Wasserthal, L.T. *Drosophila* flies combine periodic heartbeat reversal with a circulation in the anterior body mediated by a newly discovered anterior pair of ostial valves and “venous” channels. *J. Exp. Biol.* **2007**, *210*, 3707–3719. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Dowse, H.; Ringo, J.; Power, J.; Johnson, E.; Kinney, K.; White, L. A congenital heart defect in *Drosophila* caused by an action-potential mutation. *J. Neurogenet.* **1995**, *10*, 153–168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Johnson, E.; Ringo, J.; Bray, N.; Dowse, H. Genetic and Pharmacological Identification of Ion Channels Central to the *Drosophila* Cardiac Pacemaker. *J. Neurogenet.* **1998**, *12*, 1–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Wessells, R.J.; Bodmer, R. Screening assays for heart function mutants in *Drosophila*. *BioTechniques* **2004**, *37*, 58–66. [[PubMed](#)]
46. Paternostro, G.; Vignola, C.; Bartsch, D.-U.; Omens, J.H.; McCulloch, A.D.; Reed, J.C. Age-Associated Cardiac Dysfunction in *Drosophila melanogaster*. *Circ. Res.* **2001**, *88*, 1053–1058. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. McCulloch, A.D.; Paternostro, G. Cardiac systems biology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2005**, *1047*, 283–295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Ocorr, K.; Reeves, N.L.; Wessells, R.J.; Fink, M.; Chen, H.-S.V.; Akasaka, T.; Yasuda, S.; Metzger, J.M.; Giles, W.; Posakony, J.W.; *et al.* KCNQ potassium channel mutations cause cardiac arrhythmias in *Drosophila* that mimic the effects of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 3943–3948. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Fink, M.; Callol-Massot, C.; Chu, A.; Ruiz-Lozano, P.; Belmonte, J.; Giles, W.; Bodmer, R.; Ocorr, K. A new method for detection and quantification of heartbeat parameters in *Drosophila*, zebrafish, and embryonic mouse hearts. *BioTechniques* **2009**, *46*, 101–113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Wolf, M.J.; Amrein, H.; Izatt, J.A.; Choma, M.A.; Reedy, M.C.; Rockman, H.A. *Drosophila* as a model for the identification of genes causing adult human heart disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 1394–1399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Alex, A.; Li, A.; Tanzi, R.E.; Zhou, C. Optogenetic pacing in *Drosophila melanogaster*. *Sci. Adv.* **2015**, *1*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Kaushik, G.; Zambon, A.C.; Fuhrmann, A.; Bernstein, S.I.; Bodmer, R.; Engler, A.J.; Cammarato, A. Measuring passive myocardial stiffness in *Drosophila melanogaster* to investigate diastolic dysfunction. *J. Cell. Mol. Med.* **2012**, *16*, 1656–1662. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Akasaka, T.; Klinedinst, S.; Ocorr, K.; Bustamante, E.L.; Kim, S.K.; Bodmer, R. The ATP-sensitive potassium (KATP) channel-encoded dSUR gene is required for *Drosophila* heart function and is regulated by tinman. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 11999–12004. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Frolov, R.V.; Singh, S. Inhibition of ion channels and heart beat in *Drosophila* by selective COX-2 inhibitor SC-791. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e38759. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Cammarato, A.; Dambacher, C.M.; Knowles, A.F.; Kronert, W.A.; Bodmer, R.; Ocorr, K.; Bernstein, S.I. Myosin transducer mutations differentially affect motor function, myofibril structure, and the performance of skeletal and cardiac muscles. *Mol. Biol. Cell* **2008**, *19*, 553–562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

56. Taghli-Lamalle, O.; Akasaka, T.; Hogg, G.; Nudel, U.; Yaffe, D.; Chamberlain, J.S.; Ocorr, K.; Bodmer, R. Dystrophin deficiency in *Drosophila* reduces lifespan and causes a dilated cardiomyopathy phenotype. *Aging Cell* **2008**, *7*, 237–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Yu, L.; Daniels, J.; Glaser, A.E.; Wolf, M.J. Raf-mediated cardiac hypertrophy in adult *Drosophila*. *Dis. Model. Mech.* **2013**, *6*, 964–976. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Viswanathan, M.C.; Kaushik, G.; Engler, A.J.; Lehman, W.; Cammarato, A. A *Drosophila melanogaster* Model of Diastolic Dysfunction and Cardiomyopathy Based on Impaired Troponin-T Function. *Circ. Res.* **2014**, *114*, e6–e17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Yu, L.; Daniels, J.P.; Wu, H.; Wolf, M.J. Cardiac hypertrophy induced by active Raf depends on Yorkie-mediated transcription. *Sci. Signal.* **2015**, *8*, ra13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Lee, T.E.; Yu, L.; Wolf, M.J.; Rockman, H.A. Galactokinase is a novel modifier of calcineurin-induced cardiomyopathy in *Drosophila*. *Genetics* **2014**, *198*, 591–603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Kamb, A.; Iverson, L.E.; Tanouye, M.A. Molecular characterization of Shaker, a *Drosophila* gene that encodes a potassium channel. *Cell* **1987**, *50*, 405–413. [[CrossRef](#)]
62. Papazian, D.M.; Schwarz, T.L.; Tempel, B.L.; Jan, Y.N.; Jan, L.Y. Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science* **1987**, *237*, 749–753. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Tempel, B.L.; Papazian, D.M.; Schwarz, T.L.; Jan, Y.N.; Jan, L.Y. Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of *Drosophila*. *Science* **1987**, *237*, 770–775. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Van Wagoner, D.R.; Pond, A.L.; McCarthy, P.M.; Trimmer, J.S.; Nerbonne, J.M. Outward K<sup>+</sup> current densities and *Kv1.5* expression are reduced in chronic human atrial fibrillation. *Circ. Res.* **1997**, *80*, 772–781. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Li, G.R.; Dong, M.Q. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Adv. Pharmacol.* **2010**, *59*, 93–134. [[PubMed](#)]
66. Butler, A.; Wei, A.G.; Baker, K.; Salkoff, L. A family of putative potassium channel genes in *Drosophila*. *Science* **1989**, *243*, 943–947. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Covarrubias, M.; Wei, A.A.; Salkoff, L. Shaker, Shal, Shab, and Shaw express independent K<sup>+</sup> current systems. *Neuron* **1991**, *7*, 763–773. [[CrossRef](#)]
68. Tsunoda, S.; Salkoff, L. Genetic analysis of *Drosophila* neurons: Shal, Shaw, and Shab encode most embryonic potassium currents. *J. Neurosci.* **1995**, *15*, 1741–1754. [[PubMed](#)]
69. Roberds, S.L.; Tamkun, M.M. Cloning and tissue-specific expression of five voltage-gated potassium channel cDNAs expressed in rat heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 1798–1802. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Xu, H.; Barry, D.M.; Li, H.; Brunet, S.; Guo, W.; Nerbonne, J.M. Attenuation of the slow component of delayed rectification, action potential prolongation, and triggered activity in mice expressing a dominant-negative *Kv2* alpha subunit. *Circ. Res.* **1999**, *85*, 623–633. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Ordog, B.; Brutyo, E.; Puskas, L.G.; Papp, J.G.; Varro, A.; Szabad, J.; Boldogkoi, Z. Gene expression profiling of human cardiac potassium and sodium channels. *Int. J. Cardiol.* **2006**, *111*, 386–393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Gaborit, N.; Wichter, T.; Varro, A.; Szuts, V.; Lamirault, G.; Eckardt, L.; Paul, M.; Breithardt, G.; Schulze-Bahr, E.; Escande, D.; *et al.* Transcriptional profiling of ion channel genes in Brugada syndrome and other right ventricular arrhythmogenic diseases. *Eur. Heart J.* **2009**, *30*, 487–496. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Giudicessi, J.R.; Ye, D.; Tester, D.J.; Crotti, L.; Mugione, A.; Nesterenko, V.V.; Albertson, R.M.; Antzelevitch, C.; Schwartz, P.J.; Ackerman, M.J. Transient outward current (I<sub>to</sub>) gain-of-function mutations in the KCND3-encoded *Kv4.3* potassium channel and Brugada syndrome. *Heart Rhythm* **2011**, *8*, 1024–1032. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Drysdale, R.; Warmke, J.; Kreber, R.; Ganetzky, B. Molecular characterization of eag: A gene affecting potassium channels in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **1991**, *127*, 497–505. [[PubMed](#)]
75. Warmke, J.W.; Ganetzky, B. A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 3438–3442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Titus, S.A.; Warmke, J.W.; Ganetzky, B. The *Drosophila* erg K<sup>+</sup> channel polypeptide is encoded by the seizure locus. *J. Neurosci.* **1997**, *17*, 875–881. [[PubMed](#)]
77. January, C.T.; Gong, Q.; Zhou, Z. Long QT syndrome: Cellular basis and arrhythmia mechanism in LQT2. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **2000**, *11*, 1413–1418. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

78. Atkinson, N.S.; Robertson, G.A.; Ganetzky, B. A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila* slo locus. *Science* **1991**, *253*, 551–555. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Pallanck, L.; Ganetzky, B. Cloning and characterization of human and mouse homologs of the *Drosophila* calcium-activated potassium channel gene, slowpoke. *Hum. Mol. Genet.* **1994**, *3*, 1239–1243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Brenner, R.; Perez, G.J.; Bonev, A.D.; Eckman, D.M.; Kosek, J.C.; Wiler, S.W.; Patterson, A.J.; Nelson, M.T.; Aldrich, R.W. Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature* **2000**, *407*, 870–876. [[PubMed](#)]
81. Fernandez-Fernandez, J.M.; Tomas, M.; Vazquez, E.; Orio, P.; Latorre, R.; Senti, M.; Marrugat, J.; Valverde, M.A. Gain-of-function mutation in the KCNMB1 potassium channel subunit is associated with low prevalence of diastolic hypertension. *J. Clin. Investig.* **2004**, *113*, 1032–1039. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Nerbonne, J.M. Molecular basis of functional voltage-gated K<sup>+</sup> channel diversity in the mammalian myocardium. *J. Physiol.* **2000**, *525*, Pt 2. 285–298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Nerbonne, J.M.; Kass, R.S. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol. Rev.* **2005**, *85*, 1205–1253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Vincent, G.M.; Timothy, K.; Fox, J.; Zhang, L. The inherited long QT syndrome: From ion channel to bedside. *Cardiol. Rev.* **1999**, *7*, 44–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Sanguinetti, M.C. Dysfunction of delayed rectifier potassium channels in an inherited cardiac arrhythmia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1999**, *868*, 406–413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Goldenberg, I.; Moss, A.J. Long QT syndrome. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2008**, *51*, 2291–2300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Akasaka, T.; Ocorr, K. Drug discovery through functional screening in the *Drosophila* heart. *Methods Mol. Biol.* **2009**, *577*, 235–249. [[PubMed](#)]
88. Lakatta, E.G.; Levy, D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part II: The aging heart in health: Links to heart disease. *Circulation* **2003**, *107*, 346–354. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Nishimura, M.; Ocorr, K.; Bodmer, R.; Cartry, J. *Drosophila* as a model to study cardiac aging. *Exp. Gerontol.* **2011**, *46*, 326–330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Nerbonne, J.M. Studying cardiac arrhythmias in the mouse—A reasonable model for probing mechanisms? *Trends Cardiovasc. Med.* **2004**, *14*, 83–93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Suzuki, M.; Sasaki, N.; Miki, T.; Sakamoto, N.; Ohmoto-Sekine, Y.; Tamagawa, M.; Seino, S.; Marban, E.; Nakaya, H. Role of sarcolemmal K(ATP) channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in mice. *J. Clin. Investig.* **2002**, *109*, 509–516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Zhang, D.; Ke, L.; Mackovicova, K.; Der Want, J.J.L.V.; Sibon, O.C.M.; Tanguay, R.M.; Morrow, G.; Henning, R.H.; Kampinga, H.H.; Brundel, B.J.J.M. Effects of different small HSPB members on contractile dysfunction and structural changes in a *Drosophila melanogaster* model for Atrial Fibrillation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2011**, *51*, 381–389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Brundel, B.J.; Shiroshita-Takeshita, A.; Qi, X.; Yeh, Y.H.; Chartier, D.; van Gelder, I.C.; Henning, R.H.; Kampinga, H.H.; Nattel, S. Induction of heat shock response protects the heart against atrial fibrillation. *Circ. Res.* **2006**, *99*, 1394–1402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Seidman, C.E.; Seidman, J.G. Identifying sarcomere gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy: A personal history. *Circ. Res.* **2011**, *108*, 743–750. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Marian, A.J. Hypertrophic cardiomyopathy: From genetics to treatment. *Eur. J. Clin. Investig.* **2010**, *40*, 360–369. [[CrossRef](#)]
96. Seidman, J.G.; Seidman, C. The genetic basis for cardiomyopathy: From mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell* **2001**, *104*, 557–567. [[CrossRef](#)]
97. Alcalai, R.; Seidman, J.G.; Seidman, C.E. Genetic basis of hypertrophic cardiomyopathy: From bench to the clinics. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **2008**, *19*, 104–110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Marian, A.J. Genetic determinants of cardiac hypertrophy. *Curr. Opin. Cardiol.* **2008**, *23*, 199–205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Geier, C.; Perrot, A.; Ozcelik, C.; Binner, P.; Counsell, D.; Hoffmann, K.; Pilz, B.; Martiniak, Y.; Gehmlich, K.; van der Ven, P.F.; *et al.* Mutations in the human muscle LIM protein gene in families with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* **2003**, *107*, 1390–1395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

100. Hayashi, T.; Arimura, T.; Itoh-Satoh, M.; Ueda, K.; Hohda, S.; Inagaki, N.; Takahashi, M.; Hori, H.; Yasunami, M.; Nishi, H.; *et al.* Tcap gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2004**, *44*, 2192–2201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Vasile, V.C.; Will, M.L.; Ommen, S.R.; Edwards, W.D.; Olson, T.M.; Ackerman, M.J. Identification of a metavinculin missense mutation, R975W, associated with both hypertrophic and dilated cardiomyopathy. *Mol. Genet. Metab.* **2006**, *87*, 169–174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Landstrom, A.P.; Weisleder, N.; Batalden, K.B.; Bos, J.M.; Tester, D.J.; Ommen, S.R.; Wehrens, X.H.; Claycomb, W.C.; Ko, J.K.; Hwang, M.; *et al.* Mutations in JPH2-encoded junctophilin-2 associated with hypertrophic cardiomyopathy in humans. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2007**, *42*, 1026–1035. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Richard, P.; Charron, P.; Carrier, L.; Ledeuil, C.; Cheav, T.; Pichereau, C.; Benaiche, A.; Isnard, R.; Dubourg, O.; Burban, M.; *et al.* Hypertrophic cardiomyopathy: Distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation* **2003**, *107*, 2227–2232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Van Driest, S.L.; Vasile, V.C.; Ommen, S.R.; Will, M.L.; Tajik, A.J.; Gersh, B.J.; Ackerman, M.J. Myosin binding protein C mutations and compound heterozygosity in hypertrophic cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2004**, *44*, 1903–1910. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Lowey, S. Functional consequences of mutations in the myosin heavy chain at sites implicated in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Trends Cardiovasc. Med.* **2002**, *12*, 348–354. [[CrossRef](#)]
106. Tardiff, J.C. Sarcomeric proteins and familial hypertrophic cardiomyopathy: Linking mutations in structural proteins to complex cardiovascular phenotypes. *Heart Fail. Rev.* **2005**, *10*, 237–248. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Tyska, M.J.; Hayes, E.; Giewat, M.; Seidman, C.E.; Seidman, J.G.; Warshaw, D.M. Single-molecule mechanics of R403Q cardiac myosin isolated from the mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ. Res.* **2000**, *86*, 737–744. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Debold, E.P.; Schmitt, J.P.; Patlak, J.B.; Beck, S.E.; Moore, J.R.; Seidman, J.G.; Seidman, C.; Warshaw, D.M. Hypertrophic and dilated cardiomyopathy mutations differentially affect the molecular force generation of mouse alpha-cardiac myosin in the laser trap assay. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2007**, *293*, H284–H291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Sussman, M.A.; Lim, H.W.; Gude, N.; Taigen, T.; Olson, E.N.; Robbins, J.; Colbert, M.C.; Gualberto, A.; Wieczorek, D.F.; Molkentin, J.D. Prevention of cardiac hypertrophy in mice by calcineurin inhibition. *Science* **1998**, *281*, 1690–1693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Taigen, T.; De Windt, L.J.; Lim, H.W.; Molkentin, J.D. Targeted inhibition of calcineurin prevents agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 1196–1201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Molkentin, J.D.; Lu, J.R.; Antos, C.L.; Markham, B.; Richardson, J.; Robbins, J.; Grant, S.R.; Olson, E.N. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* **1998**, *93*, 215–228. [[CrossRef](#)]
112. Schonberger, J.; Seidman, C.E. Many roads lead to a broken heart: The genetics of dilated cardiomyopathy. *Am. J. Hum. Genet.* **2001**, *69*, 249–260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Hershberger, R.E.; Morales, A.; Siegfried, J.D. Clinical and genetic issues in dilated cardiomyopathy: A review for genetics professionals. *Genet. Med.* **2010**, *12*, 655–667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Fatkin, D.; Otway, R.; Richmond, Z. Genetics of dilated cardiomyopathy. *Heart Fail. Clin.* **2010**, *6*, 129–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Jefferies, J.L.; Towbin, J.A. Dilated cardiomyopathy. *Lancet* **2010**, *375*, 752–762. [[CrossRef](#)]
116. Morimoto, S.; Lu, Q.W.; Harada, K.; Takahashi-Yanaga, F.; Minakami, R.; Ohta, M.; Sasaguri, T.; Ohtsuki, I. Ca<sup>2+</sup>-desensitizing effect of a deletion mutation Delta K210 in cardiac troponin T that causes familial dilated cardiomyopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 913–918. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Lu, Q.W.; Morimoto, S.; Harada, K.; Du, C.K.; Takahashi-Yanaga, F.; Miwa, Y.; Sasaguri, T.; Ohtsuki, I. Cardiac troponin T mutation R141W found in dilated cardiomyopathy stabilizes the troponin T-tropomyosin interaction and causes a Ca<sup>2+</sup> desensitization. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2003**, *35*, 1421–1427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Venkatraman, G.; Harada, K.; Gomes, A.V.; Kerrick, W.G.; Potter, J.D. Different functional properties of troponin T mutants that cause dilated cardiomyopathy. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 41670–41676. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Gomes, A.V.; Potter, J.D. Molecular and cellular aspects of troponin cardiomyopathies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2004**, *1015*, 214–224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



120. Melkani, G.C.; Bodmer, R.; Ocorr, K.; Bernstein, S.I. The UNC-45 chaperone is critical for establishing myosin-based myofibrillar organization and cardiac contractility in the *Drosophila* heart model. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e22579. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Chang, A.N.; Potter, J.D. Sarcomeric protein mutations in dilated cardiomyopathy. *Heart Fail. Rev.* **2005**, *10*, 225–235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Allikian, M.J.; Bhabha, G.; Dospoy, P.; Heydemann, A.; Ryder, P.; Earley, J.U.; Wolf, M.J.; Rockman, H.A.; McNally, E.M. Reduced life span with heart and muscle dysfunction in *Drosophila* sarcoglycan mutants. *Hum. Mol. Genet.* **2007**, *16*, 2933–2943. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Yu, L.; Lee, T.; Lin, N.; Wolf, M.J. Affecting Rhomboid-3 function causes a dilated heart in adult *Drosophila*. *PLoS Genet.* **2010**, *6*, e1000969. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Suter, T.M.; Procter, M.; van Veldhuisen, D.J.; Muscholl, M.; Bergh, J.; Carlomagno, C.; Perren, T.; Passalacqua, R.; Bighin, C.; Klijn, J.G.; *et al.* Trastuzumab-associated cardiac adverse effects in the herceptin adjuvant trial. *J. Clin. Oncol.* **2007**, *25*, 3859–3865. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Kim, I.M.; Wolf, M.J.; Rockman, H.A. Gene deletion screen for cardiomyopathy in adult *Drosophila* identifies a new notch ligand. *Circ. Res.* **2010**, *106*, 1233–1243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Neely, G.G.; Kuba, K.; Cammarato, A.; Isobe, K.; Amann, S.; Zhang, L.; Murata, M.; Elmen, L.; Gupta, V.; Arora, S.; *et al.* A global *in vivo* *Drosophila* RNAi screen identifies NOT3 as a conserved regulator of heart function. *Cell* **2010**, *141*, 142–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Mogensen, J.; Kubo, T.; Duque, M.; Uribe, W.; Shaw, A.; Murphy, R.; Gimeno, J.R.; Elliott, P.; McKenna, W.J. Idiopathic restrictive cardiomyopathy is part of the clinical expression of cardiac troponin I mutations. *J. Clin. Invest.* **2003**, *111*, 209–216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Kaski, J.P.; Syrris, P.; Burch, M.; Tome-Esteban, M.T.; Fenton, M.; Christiansen, M.; Andersen, P.S.; Sebire, N.; Ashworth, M.; Deanfield, J.E.; *et al.* Idiopathic restrictive cardiomyopathy in children is caused by mutations in cardiac sarcomere protein genes. *Heart* **2008**, *94*, 1478–1484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Ware, S.M.; Quinn, M.E.; Ballard, E.T.; Miller, E.; Uzark, K.; Spicer, R.L. Pediatric restrictive cardiomyopathy associated with a mutation in beta-myosin heavy chain. *Clin. Genet.* **2008**, *73*, 165–170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
130. Arbustini, E.; Pasotti, M.; Pilotto, A.; Pellegrini, C.; Grasso, M.; Previtali, S.; Repetto, A.; Bellini, O.; Azan, G.; Scaffino, M.; *et al.* Desmin accumulation restrictive cardiomyopathy and atrioventricular block associated with desmin gene defects. *Eur. J. Heart Fail.* **2006**, *8*, 477–483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
131. Yumoto, F.; Lu, Q.W.; Morimoto, S.; Tanaka, H.; Kono, N.; Nagata, K.; Ojima, T.; Takahashi-Yanaga, F.; Miwa, Y.; Sasaguri, T.; *et al.* Drastic Ca<sup>2+</sup> sensitization of myofilament associated with a small structural change in troponin I in inherited restrictive cardiomyopathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *338*, 1519–1526. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Bers, D.M. Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature* **2002**, *415*, 198–205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Balke, C.W.; Shorofsky, S.R. Alterations in calcium handling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc. Res.* **1998**, *37*, 290–299. [[CrossRef](#)]
134. Kass, D.A.; Saavedra, W.F.; Sabbah, H.N. Reverse remodeling and enhanced inotropic reserve from the cardiac support device in experimental cardiac failure. *J. Card. Fail.* **2004**, *10* (Suppl. 6), S215–S219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Sanyal, S.; Jennings, T.; Dowse, H.; Ramaswami, M. Conditional mutations in SERCA, the Sarco-endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase, alter heart rate and rhythmicity in *Drosophila*. *J. Comp. Physiol. B* **2005**, *176*, 253–263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Abraham, D.M.; Wolf, M.J. Disruption of Sarcoendoplasmic Reticulum Calcium ATPase Function in *Drosophila* Leads to Cardiac Dysfunction. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e77785. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
137. Magny, E.G.; Pueyo, J.I.; Pearl, F.M.G.; Cespedes, M.A.; Niven, J.E.; Bishop, S.A.; Couso, J.P. Conserved Regulation of Cardiac Calcium Uptake by Peptides Encoded in Small Open Reading Frames. *Science* **2013**, *341*, 1116–1120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Lin, N.; Badie, N.; Yu, L.; Abraham, D.; Cheng, H.; Bursac, N.; Rockman, H.A.; Wolf, M.J. A Method to Measure Myocardial Calcium Handling in Adult *Drosophila*. *Circ. Res.* **2011**, *108*, 1306–1315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
139. Sullivan, K.M.C.; Scott, K.; Zuker, C.S.; Rubin, G.M. The ryanodine receptor is essential for larval development in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 5942–5947. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

140. Ingwall, J.S.; Weiss, R.G. Is the Failing Heart Energy Starved? On Using Chemical Energy to Support Cardiac Function. *Circ. Res.* **2004**, *95*, 135–145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
141. Ashrafian, H.; Frenneaux, M.P.; Opie, L.H. Metabolic Mechanisms in Heart Failure. *Circulation* **2007**, *116*, 434–448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Grundy, S.M. Diagnosis and Management of the Metabolic Syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* **2005**, *112*, 2735–2752. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Birse, R.T.; Choi, J.; Reardon, K.; Rodriguez, J.; Graham, S.; Diop, S.; Ocorr, K.; Bodmer, R.; Oldham, S. High-fat-diet-induced obesity and heart dysfunction are regulated by the TOR pathway in *Drosophila*. *Cell Metab.* **2010**, *12*, 533–544. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Birse, R.T.; Bodmer, R. Lipotoxicity and cardiac dysfunction in mammals and *Drosophila*. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2011**, *46*, 376–385. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Diop, S.B.; Bodmer, R. *Drosophila* as a model to study the genetic mechanisms of obesity-associated heart dysfunction. *J. Cell. Mol. Med.* **2012**, *16*, 966–971. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
146. Na, J.; Musselman, L.P.; Pendse, J.; Baranski, T.J.; Bodmer, R.; Ocorr, K.; Cagan, R. A *Drosophila* model of high sugar diet-induced cardiomyopathy. *PLoS Genet.* **2013**, *9*, e1003175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
147. Diop, S.B.; Bisharat-Kernizan, J.; Birse, R.T.; Oldham, S.; Ocorr, K.; Bodmer, R. PGC-1/Spargel Counteracts High-Fat-Diet-Induced Obesity and Cardiac Lipotoxicity Downstream of TOR and Brummer ATGL Lipase. *Cell Rep.* **2015**, *10*, 1572–1584. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
148. Yang, W.; Kelly, T.; He, J. Genetic epidemiology of obesity. *Epidemiol. Rev.* **2007**, *29*, 49–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
149. Gill, S.; Le, H.D.; Melkani, G.C.; Panda, S. Time-restricted feeding attenuates age-related cardiac decline in *Drosophila*. *Science* **2015**, *347*, 1265–1269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
150. Hatori, M.; Vollmers, C.; Zarrinpar, A.; DiTacchio, L.; Bushong, E.A.; Gill, S.; Leblanc, M.; Chaix, A.; Joens, M.; Fitzpatrick, J.A.J.; *et al.* Time-Restricted Feeding without Reducing Caloric Intake Prevents Metabolic Diseases in Mice Fed a High-Fat Diet. *Cell Metab.* **2012**, *15*, 848–860. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
151. Wessells, R.J.; Fitzgerald, E.; Cypser, J.R.; Tatar, M.; Bodmer, R. Insulin regulation of heart function in aging fruit flies. *Nat. Genet.* **2004**, *36*, 1275–1281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
152. Wessells, R.; Fitzgerald, E.; Piazza, N.; Ocorr, K.; Morley, S.; Davies, C.; Lim, H.-Y.; Elmén, L.; Hayes, M.; Oldham, S.; *et al.* *d4eBP* acts downstream of both dTOR and dFoxo to modulate cardiac functional aging in *Drosophila*. *Aging Cell* **2009**, *8*, 542–552. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Diop, S.B.; Bodmer, R. Gaining Insights into Diabetic Cardiomyopathy from *Drosophila*. *Trends Endocrinol. Metab.* **2015**, *26*, 618–627. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Cannon, L.; Bodmer, R. Genetic manipulation of cardiac aging. *J. Physiol.* **2015**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Lim, H.-Y.; Wang, W.; Chen, J.; Ocorr, K.; Bodmer, R. ROS regulate cardiac function via a distinct paracrine mechanism. *Cell Rep.* **2014**, *7*, 35–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Melkani, G.C.; Trujillo, A.S.; Ramos, R.; Bodmer, R.; Bernstein, S.I.; Ocorr, K. Huntington's disease induced cardiac amyloidosis is reversed by modulating protein folding and oxidative stress pathways in the *Drosophila* heart. *PLoS Genet.* **2013**, *9*, e1004024. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
157. Monnier, V.; Iché-Torres, M.; Rera, M.; Contremoulins, V.; Guichard, C.; Lalevée, N.; Tricoire, H.; Perrin, L. dJun and Vri/dNFIL3 are major regulators of cardiac aging in *Drosophila*. *PLoS Genet.* **2012**, *8*, e1003081. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
158. Xie, H.B.; Cammarato, A.; Rajasekaran, N.S.; Zhang, H.; Suggs, J.A.; Lin, H.C.; Bernstein, S.I.; Benjamin, I.J.; Golic, K.G. The NADPH metabolic network regulates human alphaB-crystallin cardiomyopathy and reductive stress in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet.* **2013**, *9*, e1003544. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
159. Wojtowicz, I.; Jablonska, J.; Zmojdian, M.; Taghli-Lamalle, O.; Renaud, Y.; Junion, G.; Daczewska, M.; Huelsmann, S.; Jagla, K.; Jagla, T. *Drosophila* small heat shock protein CryAB ensures structural integrity of developing muscles, and proper muscle and heart performance. *Development* **2015**, *142*, 994–1005. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
160. Fomovsky, G.M.; Thomopoulos, S.; Holmes, J.W. Contribution of extracellular matrix to the mechanical properties of the heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2010**, *48*, 490–496. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

161. Grossman, T.R.; Gamliel, A.; Wessells, R.J.; Taghli-Lamalle, O.; Jepsen, K.; Ocorr, K.; Korenberg, J.R.; Peterson, K.L.; Rosenfeld, M.G.; Bodmer, R.; *et al.* Over-expression of DSCAM and COL6A2 cooperatively generates congenital heart defects. *PLoS Genet.* **2011**, *7*, e1002344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
162. Dulcis, D.; Levine, R.B. Glutamatergic Innervation of the Heart Initiates Retrograde Contractions in Adult *Drosophila melanogaster*. *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 271–280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Brand, A.H.; Perrimon, N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **1993**, *118*, 401–415. [[PubMed](#)]
164. Lai, S.L.; Lee, T. Genetic mosaic with dual binary transcriptional systems in *Drosophila*. *Nat. Neurosci.* **2006**, *9*, 703–709. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
165. Luan, H.; Peabody, N.C.; Vinson, C.R.; White, B.H. Refined spatial manipulation of neuronal function by combinatorial restriction of transgene expression. *Neuron* **2006**, *52*, 425–436. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
166. Ting, C.Y.; Gu, S.; Guttikonda, S.; Lin, T.Y.; White, B.H.; Lee, C.H. Focusing transgene expression in *Drosophila* by coupling Gal4 with a novel split-LexA expression system. *Genetics* **2011**, *188*, 229–233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
167. Potter, C.J.; Tasic, B.; Russler, E.V.; Liang, L.; Luo, L. The Q system: A repressible binary system for transgene expression, lineage tracing, and mosaic analysis. *Cell* **2010**, *141*, 536–548. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
168. Mestroni, L.; Taylor, M.R. Hearing the noise the challenges of human genome variation in genetic testing. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2011**, *57*, 2328–2329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
169. Landstrom, A.P.; Ackerman, M.J. The Achilles' heel of cardiovascular genetic testing: Distinguishing pathogenic mutations from background genetic noise. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2011**, *90*, 496–499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
170. Ackerman, M.J.; Marcou, C.A.; Tester, D.J. Personalized medicine: Genetic diagnosis for inherited cardiomyopathies/channelopathies. *Rev. Esp. Cardiol.* **2013**, *66*, 298–307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
171. Hoogstra-Berends, F.; Meijering, R.A.M.; Zhang, D.; Heeres, A.; Loen, L.; Seerden, J.-P.; Kuipers, I.; Kampinga, H.H.; Henning, R.H.; Brundel, B.J.J.M. Heat Shock Protein-Inducing Compounds as Therapeutics to Restore Proteostasis in Atrial Fibrillation. *Trends Cardiovasc. Med.* **2012**, *22*, 62–68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
172. Zhang, D.; Wu, C.-T.; Qi, X.; Meijering, R.A.M.; Hoogstra-Berends, F.; Tadevosyan, A.; Cubukcuoglu-Deniz, G.; Durdu, S.; Akar, A.R.; Sibon, O.C.M.; *et al.* Activation of histone deacetylase-6 induces contractile dysfunction through derailment of  $\alpha$ -tubulin proteostasis in experimental and human atrial fibrillation. *Circulation* **2014**, *129*, 346–358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
173. Warf, M.B.; Nakamori, M.; Matthys, C.M.; Thornton, C.A.; Berglund, J.A. Pentamidine reverses the splicing defects associated with myotonic dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 18551–18556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
174. Chakraborty, M.; Selma-Soriano, E.; Magny, E.; Couso, J.P.; Pérez-Alonso, M.; Charlet-Berguerand, N.; Artero, R.; Llamusi, B. Pentamidine rescues contractility and rhythmicity in a *Drosophila* model of myotonic dystrophy heart dysfunction. *Dis. Model. Mech.* **2015**, *8*, 1569–1578. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
175. Tricoire, H.; Palandri, A.; Bourdais, A.; Camadro, J.-M.; Monnier, V. Methylene blue rescues heart defects in a *Drosophila* model of Friedreich's ataxia. *Hum. Mol. Genet.* **2014**, *23*, 968–979. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
176. Heidari, R.; Monnier, V.; Martin, E.; Tricoire, H. Methylene Blue Partially Rescues Heart Defects in a *Drosophila* Model of Huntington's Disease. *J. Huntingt. Dis.* **2015**, *4*, 173–186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

