



HAL
open science

Rôle de l'inclusion de l'exon 7 de BIN1 dans la faiblesse musculaire des patients atteints de dystrophie myotonique

Michel Ney

► **To cite this version:**

Michel Ney. Rôle de l'inclusion de l'exon 7 de BIN1 dans la faiblesse musculaire des patients atteints de dystrophie myotonique. Génomique, Transcriptomique et Protéomique [q-bio.GN]. Université de Strasbourg, 2016. Français. NNT : 2016STRAJ077 . tel-02003416

HAL Id: tel-02003416

<https://theses.hal.science/tel-02003416>

Submitted on 1 Feb 2019

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

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

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ (ED 414)

Laboratoire IGBMC (CNRS UMR 7104 – Inserm U 964)

THÈSE présentée par :

Michel NEY

soutenue le : **14 Octobre 2016**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

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

**Rôle de l'inclusion de l'exon 7 de *BIN1*
dans la faiblesse musculaire des patients
atteints de dystrophie myotonique**

THÈSE dirigée par :

Monsieur Nicolas CHARLET-BERGUERAND

Docteur, IGBMC, Illkirch-Graffenstaden

RAPPORTEURS :

Madame Cécile MARTINAT

Docteur, ISTEM, Corbeil-Essonnes

Monsieur Marc BITOUN

Docteur, Institut de Myologie, Paris

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Monsieur Jocelyn LAPORTE

Docteur, IGBMC, Illkirch-Graffenstaden

Monsieur Denis FURLING

Docteur, Institut de Myologie, Paris

Monsieur Karim HNIA

Docteur, I2MC, Toulouse



Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire
1, rue Laurent Fries
67404 Illkirch-Graffenstaden, France

REMERCIEMENTS

J'adresse mes sincères remerciements aux membres de mon jury de thèse, le Dr. Cécile Martinat, le Dr. Marc Bitoun, le Dr. Jocelyn Laporte, le Dr. Denis Furling et le Dr Karim Hnia, pour avoir accepté de juger ce travail. Merci pour le temps que vous avez consacré à l'évaluation de ma thèse.

Je remercie également la région Alsace, l'ERC, l'ANR, l'INSERM et l'AFM-Téléthon pour avoir soutenu financièrement ce projet, ainsi que l'Université de Strasbourg.

Merci à mon directeur de thèse, Nicolas, pour tes conseils, ta confiance, ton enthousiasme et surtout pour toute ton aide ! J'ai eu une grande chance de travailler dans ton équipe à l'IGBMC. Grâce à toi, j'ai appris énormément lors de cette thèse.

Je remercie tous les membres de l'équipe CHARLET, passés et présents, c'est-à-dire presque exclusivement des filles ! En particulier Angéline, Camille, Chantal, Fernande, Marie-Christine, Pauline, Serena et Véronique. Merci à toutes pour votre aide, votre gentillesse et ces bons moments passés !

Merci à nos collaborateurs, pour leur contribution à ce travail. Merci Karim pour ton aide, ton soutien et ton implication dans ce projet. Merci aux plateformes, à l'animalerie et aux services communs de l'IGBMC, sans oublier les services administratifs, car peu de choses auraient été possibles en travaillant seul.

Merci à toutes les personnes que j'ai côtoyé lors de ces années passées à l'IGBMC, notamment les équipes du département de médecine translationnelle, les chercheurs du 1^{er} étage, mes voisins de labo, les membres du SPB et j'en oublie certainement...

Un grand merci à ma famille pour m'avoir encouragé et soutenu tout au long de ces années. Merci à mes parents, ma grand-mère, mes sœurs, mon frère et leurs moitiés, sans oublier ma belle-famille et mes amis, j'ai une très grande chance de vous avoir !

Enfin, je voudrais terminer en remerciant très affectueusement ma compagne, pour ta patience, ton organisation, ta gentillesse, tes encouragements.... Merci d'être là tous les jours. Merci pour tout ! Désolé d'être si souvent en retard.

Aux personnes lisant cette thèse, merci de vous intéresser à ce travail.

Abréviations

AAV	: Virus adéno-associé
ADN	: Acide désoxyribonucléique (DNA : Desoxyribonucleic Acid)
ADNc	: ADN complémentaire
ARFGAP2	: ADP-ribosylation factor GTPase activating protein 2
ARN	: Acide ribonucléique (RNA : Ribonucleic Acid)
ARNm	: ARN messenger
ASO	: Oligonucléotide antisens
ATP	: Adénosine 5' triphosphate
BIN1	: Bridging integrator 1
C	: Cytosine
Ca ²⁺	: Calcium
CAMK2B	: Calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2B
CDM1	: Dystrophie Myotonique Congénitale de type 1
CELF1	: CUG-BP and ETR-3-Like Factor 1
CLAP (BIN1)	: Domaine de liaison à la clathrine et à AP-2
CLCN1	: Chloride Channel 1
CLIP	: Immunoprecipitation après crosslinking ARN-protéines
CMV	: Cytomégalovirus (promoteur)
CNBP	: CCHC-type zinc finger, nucleic acid binding protein
CNM	: Myopathie centronucléaire
cTNT	: cardiac Troponin T
Da / kDa	: Dalton / kilodalton
Dapi	: 4',6'-diamidino-2-phénylindole
DGCR8	: DiGeorge Syndrome Critical Region 8
DKO	: souris Mbnl1 ; Mbnl2 double knock-out dans le muscle
DM1 / 2	: Dystrophie Myotonique de type 1 / de type 2
DM300	: Souris transgénique portant environ 300 répétitions CTG
DMD	: Dystrophine
DMPK	: Dystrophia Myotonica Protein Kinase
DMSXL	: Souris transgénique portant plus de 1000 répétitions CTG
DMWD	: Dystrophia Myotonica WD repeat-containing protein
DNM2	: Dynamine 2
DTNA	: Dystrobrevin
DZ	: DNAzyme

DZ mut	: DNAzyme mutée (inactive)
ECG	: Electrocardiogramme
EMG	: Electromyogramme
G	: Guanine
GTP	: Guanosine TriPhosphate
HSA ^{LR}	: Souris portant un transgène de l'actine humaine avec 250 CTG
INSR	: Insulin Receptor
KO	: Knock-out ou invalidation génétique (souris transgénique)
MAPT	: Microtubule Associated Protein Tau
MBD (BIN1)	: Domaine de liaison à Myc
MBNL	: Muscleblind-Like
MTM1	: Myotubularine 1
NMD	: Nonsense-mediated mRNA decay
NMJ	: Jonction neuromusculaire
nts	: Nucléotides
pb	: Paire de bases
PCR	: Réaction de polymérisation en chaîne
pH	: potentiel Hydrogène
PI (BIN1)	: Domaine de liaison aux phosphoinositides
PolyA	: polyadenosine / polyadénylation
PRD	: domaine riche en Proline
PROMM	: Dystrophie myotonique proximale (ancien nom de la DM2)
RISC	: RNA-induced silencing complex
RNA-seq	: Séquençage à ARN
rpm	: rotation par minute
RRM	: RNA Recognition Motif
RS	: Réticulum sarcoplasmique
RSV	: Virus sarcome de Rous (promoteur)
RT	: Transcription inverse (reverse transcription en anglais)
RYR1	: Ryanodine receptor
SH3 (BIN1)	: Domaine « Src-homology 3 »
shRNA	: ARN en épingle à cheveux (short hairpins RNA)
siRNA	: petit ARN interférent (small interfering RNA)
SIX5	: Sine oculis homeobox homolog 5

Abréviations

T	: Thymidine
TA	: Muscle tibialis anterior
Tg/WT	: Souris transgénique hétérozygote
Tg/Tg	: Souris transgénique homozygote
TTN	: Titin
U	: Uridine
UTR	: Untranslated Region (région non traduite)
WT	: Sauvage (Wild-type)
ZnF	: Domaine à doigt de zinc (Zinc Finger)

Sommaire

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	1
INTRODUCTION	4
Chapitre I. Les dystrophies myotoniques	5
I.A. Préambule sur la dystrophie myotonique de type 1.....	5
I.B. Causes génétiques	5
I.B.1) La dystrophie myotonique de type 1.....	5
I.B.2) La dystrophie myotonique de type 2.....	9
I.C. Les symptômes des dystrophies myotoniques	11
I.C.1) La myotonie	11
I.C.2) La faiblesse musculaire.....	11
I.C.3) Les anomalies cardiaques	13
I.C.4) Problèmes du système nerveux.....	15
I.C.5) Autres symptômes	15
I.D. Mécanisme moléculaire des DM.....	17
I.D.1) Généralités	17
I.D.2) MBNL1 acteur central de la maladie	17
• <i>Famille protéique.....</i>	<i>19</i>
• <i>Structure et motif de liaison à l'ARN.....</i>	<i>19</i>
• <i>Epissage alternatif.....</i>	<i>21</i>
• <i>Localisation, polyadénylation et stabilité des ARNm.....</i>	<i>23</i>
• <i>Altération des microARN.....</i>	<i>25</i>
I.D.3) Rôle de CUGBP1 / CELF1.....	29
I.D.4) Autres protéines impliquées dans la DM	30
I.E. Causes moléculaires possibles des symptômes	31
I.F. Modèles animaux de la maladie	37
I.F.1) Modèles de « première génération »	37

I.F.2) Modèles de « deuxième génération »	39
• <i>Souris HSA^{LR}</i>	39
• <i>Souris DM300 et DMSXL</i>	40
• <i>Souris inductibles pour les répétitions CTG</i>	41
• <i>Souris invalidées pour les gènes Mbnl</i>	43
• <i>Souris surexprimant CUGBP1</i>	46
I.G. Traitement et essais thérapeutiques de la DM1	46
I.G.1) Thérapie à base de molécules pharmacologiques	47
I.G.2) Thérapie utilisant des oligonucléotides antisens	51
• <i>Correction des altérations d'épissage</i>	51
• <i>Blocage de l'interaction entre MBNL1 et les répétitions</i>	51
• <i>Dégradation de l'ARN DMPK muté</i>	53
I.G.3) Autres approches	55
• <i>Déplétion de DMPK par ARN interférence</i>	55
• <i>Surexpression de MBNL1</i>	57
• <i>Diminution de CUGBP1 / CELF1</i>	57
Chapitre II. BIN1 : structure, fonction et maladies	59
II.A. Fonction et expression	59
II.B. Organisation et structure de BIN1	59
II.C. BIN1 et le muscle squelettique	65
II.D. Implication de BIN1 dans les maladies humaines	69
II.D.1) Maladies non musculaires	69
• <i>La maladie d'Alzheimer</i>	69
• <i>Cancer</i>	71
II.D.2) Mutation de <i>BIN1</i> dans les myopathies centronucléaires	71
II.D.3) Altération de l'épissage de <i>BIN1</i> dans les DM	73
OBJECTIFS	75

MATERIELS ET METHODES	77
Chapitre I. Matériels	77
I.A. Lignées de cellules COS-1, Neuro2A et de myoblastes immortalisés.....	77
I.B. Plasmides	77
I.C. Oligodésoxynucléotides.....	78
I.D. Anticorps	78
I.E. Oligodésoxynucléotides antisens (ASO).....	79
I.E.1) Dirigés contre <i>BIN1</i> humain	79
I.E.2) Dirigés contre <i>Bin1</i> murin	79
I.F. DNAzymes.....	80
I.G. Tampons et solutions d'usage courant	80
Chapitre II. Méthodes	81
II.A. Extraction d'ARN totaux.....	81
II.B. Test d'épissage par RT-PCR.....	81
II.C. PCR en temps réel (qPCR)	82
II.D. Transfection.....	83
II.E. Western-Blot.....	83
II.F. Clonages	84
RESULTATS	86
Chapitre I. Manuscrit : Splicing misregulation of <i>BIN1</i> exon 7 contributes to muscle weakness and atrophy in Myotonic Dystrophy.	86
SYNTHESE DES RESULTATS DU MANUSCRIT	87
Synthèse des résultats du manuscrit.....	87
Chapitre II. Résultats supplémentaires	92

II.A. Autres altérations de l'épissage de <i>BIN1</i>	92
II.B. Tests préliminaires du minigène de <i>BIN1</i> exon 7	92
II.B.1) Minigène, première version	92
II.B.2) Minigène, deuxième version	94
II.C. Promotion de l'expression de l'exon 7 via oligonucléotides antisens	96
II.D. Validation de l'anticorps anti-BIN1 exon 7	100
II.E. Distribution des isoformes de l'ARNm <i>DNM2</i> dans le muscle	102
II.F. Tentative de dégradation de l'ARNm <i>DMPK</i>	104
II.G. Tentative de génération de modèles murins de la DM1 et DM2	106
II.G.1) Réalisation des lignées	106
II.G.1) Etude à l'état post-natal des souris DM1	108
II.G.2) Etude à l'âge adulte	110
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	111
Chapitre I. Discussion sur <i>BIN1</i> exon 7 et son implication dans la	
DM1	111
I.A. Inclusion anormale de l'exon 7 dans le muscle DM1	111
I.B. Conséquences de l'inclusion de l'exon 7 de <i>BIN1</i>	111
I.B.1) Faiblesse musculaire	111
I.B.2) Taille des fibres musculaires	114
I.B.3) Altération des tubules-T	116
I.C. Propriétés physiques de BIN1 en présence de l'exon 7	120
I.D. Contribution de l'exon 7 par rapport à la perte de l'exon 11	121
Chapitre II. Discussion sur les autres résultats	124
II.A. Dégradation du transcrit <i>DMPK</i> par une enzyme ADN	124
II.B. Modèles murins des Dystrophies Myotoniques	125
II.B.1) Conclusion	125

II.B.2) Perspectives pour le modèle murin de la DM1.....	125
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	127
CV DU CANDIDAT	146

Liste des Figures et Tableaux

Liste des Figures

Introduction

Figure 1 : La DM1 est une maladie multisystémique	4
Figure 2 : Localisation génomique des expansions responsables de la DM1 et 2.....	8
Figure 3 : Illustration de la myotonie par électromyogramme et photographie.	10
Figure 4 : Apparence typique des patients atteints de la DM1.....	12
Figure 5 : Histologie des muscles de patients DM1 et DM2.	12
Figure 6 : Altérations de la conduction cardiaque chez les patients DM1.....	14
Figure 7 : Atrophie et agrégation de Tau dans le cerveau des patients DM1.....	14
Figure 8 : Mécanisme moléculaire de la DM1.....	16
Figure 9 : Agrégats nucléaires d'ARN CUG séquestrant la protéine MBNL1 dans des cellules en culture de patients DM1.....	16
Figure 10 : Structure exonique de la famille MBNL.	18
Figure 11 : Structure d'interaction de MBNL1 avec l'ARN et motif reconnu.	18
Figure 12 : Profil de liaison de MBNL1 sur les ARN qu'elle régule.	20
Figure 13 : MBNL1 et MBNL2 régulent la transition des isoformes fœtales à adultes des ARN messagers.....	20
Figure 14 : Rôle de MBNL1 dans la localisation intracellulaire des ARN.....	22
Figure 15 : MBNL1 régule la polyadénylation des ARN.....	22
Figure 16 : Localisation des ARN selon leur épissage dans les neurones.	24
Figure 17 : Biogenèse des microARN	26
Figure 18 : Modèle structural des domaines RRM1/2 de CUGBP en liaison avec des motifs ARN UGU adjacents.	28
Figure 19 : Mécanisme moléculaire dans la DM1 impliquant CELF1 et MBNL1.....	28
Figure 20 : L'épissage de l'ARN <i>CLCN1</i> est altéré dans la DM1 et conduit à la myotonie.....	32
Figure 21 : L'épissage d' <i>INSR</i> est dérégulé dans la DM1 et déclencherait la résistance à l'insuline des patients.	32

Figure 22 : Schéma représentant les principaux acteurs du couplage excitation / contraction musculaire qui sont altérés dans la DM1.	34
Figure 23 : Transgènes utilisés pour les souris modèles HSA ^{LR} et DM300/DMSXL.	38
Figure 24 : Structure du transgène utilisé pour les souris EpA960.	42
Figure 25 : Modèle de la déplétion des protéines MBNL par les répétitions CUG. ...	44
Figure 26 : Structures chimiques de la pentamidine et de la furamidine.	48
Figure 27 : Structure chimique de l'Actinomycine D.	48
Figure 28 : Structure chimique de composés testés pour le traitement de la DM1... ..	48
Figure 29 : Les différentes approches thérapeutiques possibles en utilisant des oligonucléotides antisens (ASO) dans la DM1.	50
Figure 30 : Correction de l'épissage de <i>Cln1</i> à l'aide d'un ASO.....	50
Figure 31 : Modifications chimiques et mécanisme des ASO « gapmères ».	52
Figure 32 : Structure du snRNA U7 modifié pour cibler les répétitions CUG.	54
Figure 33 : Mécanisme d'action des siRNA.	56
Figure 34 : Composition exonique et domaines protéiques de BIN1.	58
Figure 35 : Reconnaissance des membranes par le domaine BAR et localisation de l'insertion codée par l'exon 7.	60
Figure 36 : Proposition d'un modèle pour le rôle de tubulation du domaine BAR.....	62
Figure 37 : Organisation d'un muscle squelettique.....	64
Figure 38 : Organisation microscopique des myocytes et des sarcomères.....	66
Figure 39 : Mécanisme de contraction musculaire et rôle du calcium.	68
Figure 40 : Gènes impliqués dans les différentes formes de CNM.....	70
Figure 41 : Effets proposés des mutations de <i>BIN1</i> dans la CNM.....	70
Figure 42 : Altération de l'épissage de <i>BIN1</i> dans la DM1 et fonction proposée de l'exon 11.....	72

Résultats

Figure 43 : Altérations de l'épissage de <i>BIN1</i> dans le muscle de patients DM1 mises en évidence par le RNA-seq.....	91
Figure 44 : Structure et test d'épissage de la 1 ^{ère} version du minigène <i>BIN1</i> ex 7. ...	93
Figure 45 : Clonage des 6 différents variants de la deuxième version du minigène <i>BIN1</i> exon 7 et test d'épissage sous l'effet de répétitions CUG.	95
Figure 46 : Analyse de l'expression des ARNm <i>Mbn1</i> , <i>Mbn2</i> et <i>Celf1</i>	95
Figure 47 : Localisation et test des ASO pour l'exon keeping de <i>BIN1</i> exon 7.	97
Figure 48 : Localisation et effet des ASO sur <i>Bin1</i> murin.....	97
Figure 49 : Evaluation de la spécificité de l'anticorps anti-exon 7 de <i>BIN1</i>	99
Figure 50 : Epissage de <i>DNM2</i> et distribution des isoformes dans le muscle.	101
Figure 51 : Structure des DNAzymes, localisation et effet sur l'ARNm <i>DMPK</i>	103
Figure 52 : Transgène utilisé pour les souris modèles des DM1 et DM2, géotypage et étude de la surexpression du transgène.....	105
Figure 53 : Analyse du poids et de l'épissage des souris DM1 de 5 jours.	107
Figure 54 : Test d'épissage sur souris transgéniques DM1 adultes.	109

Discussion et Perspectives

Figure 55 : Corrélation entre faiblesse musculaire et épissage dans la DM1	112
Figure 56 : Défaut de tubulation de <i>BIN1</i> dans les myotubes DM1	118
Figure 57 : Altérations d'épissages qui contribuent aux problèmes musculaires dans la DM1.....	122
Figure 58 : Analyse de l'expression de <i>Mbn1</i> selon le fond génétique.....	126

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Comparaison des différentes formes de DM1	6
Tableau 2 : Phénotypes des différents modèles souris des DM.	36

Introduction

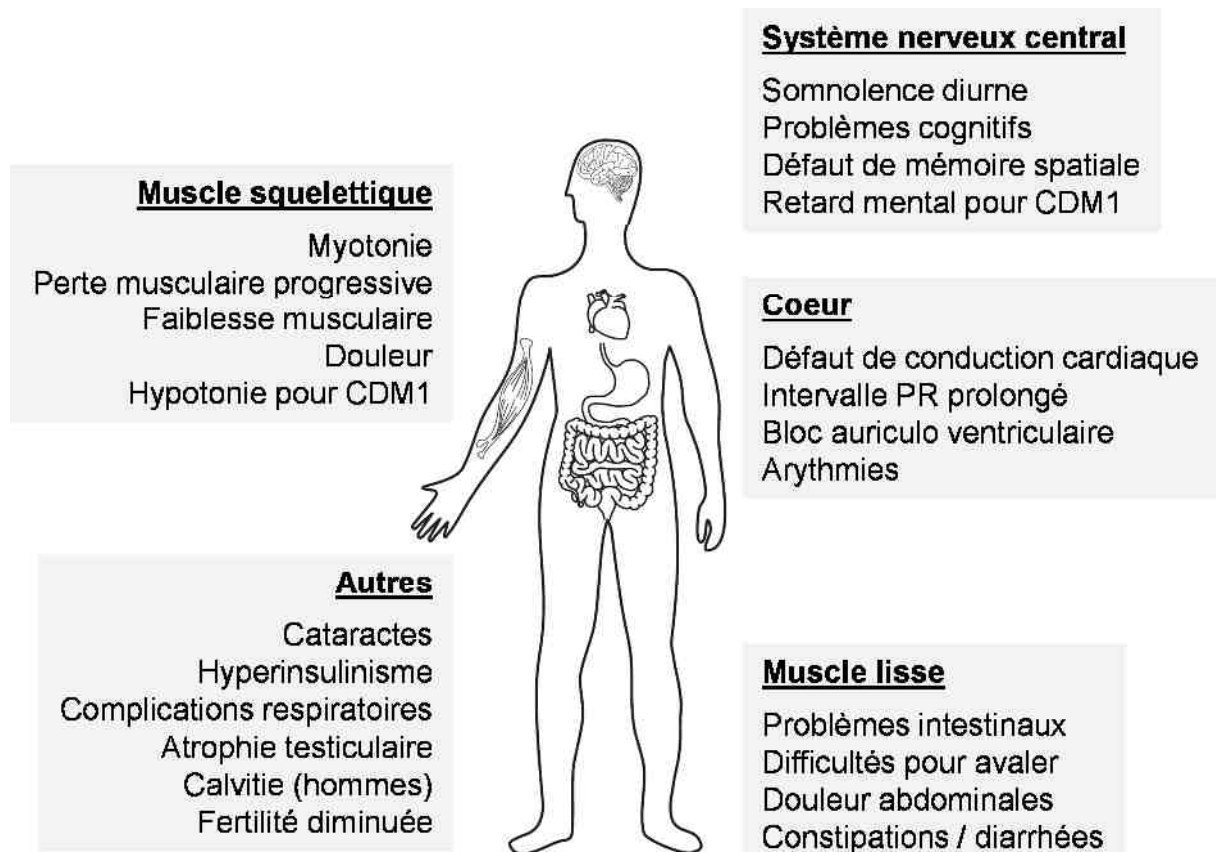


Figure 1 : La DM1 est une maladie multisystémique

La maladie touche de nombreux tissus et organes, les symptômes les plus courants sont reportés. Adapté de Gomes-Pereira et al., 2011.

Chapitre I. Les dystrophies myotoniques

I.A. Préambule sur la dystrophie myotonique de type 1

La dystrophie myotonique de type 1 (DM1) est la dystrophie musculaire la plus commune chez l'adulte, avec un individu affecté sur 8000 (Harper, 1989). Cependant, dans certaines régions, telles que le Nord de la Suède, le Québec, la Finlande ou encore le pays Basque, cette prévalence est plus élevée. A l'inverse, la DM1 est beaucoup plus rare au Japon (Harper, 2001). C'est une maladie génétique autosomale dominante qui est caractérisée par une myotonie, une faiblesse et une atrophie musculaire, des troubles de la conduction cardiaque ainsi que plusieurs autres symptômes, comme une cataracte et de l'hyperinsulinisme (**Figure 1**). Les affections musculaires de cette maladie ont été caractérisées pour la première fois en 1909 par le docteur Hans Steinert (Steinert, 1909) ainsi que de façon indépendante par les docteurs Batten et Gibb (Batten & Gibb, 1909). Par la suite, des études cliniques ont révélé le caractère multisystémique de la maladie avec l'observation d'atteinte au niveau de l'œil, du système endocrinien et nerveux (Greenfield, 1911; Curschmann, 1936; Rosman & Rebeiz, 1967).

I.B. Causes génétiques

Il existe deux différents types de dystrophies myotoniques :

I.B.1) La dystrophie myotonique de type 1

La dystrophie myotonique de type 1 (DM1) est causée par la présence d'une large expansion de tri-nucléotides CTG au niveau de la région 3' non traduite (3'UTR) du gène *DMPK* (Dystrophia Myotonica-Protein Kinase) situé sur le chromosome 19q13.3 (Brook et al., 1992; Fu et al., 1992; Harley et al., 1992). En général, plus la taille de l'expansion de répétitions CTG est grande, plus la maladie sera sévère et développée de façon précoce. Ainsi on distingue plusieurs formes de DM1 que l'on différencie selon leurs manifestations cliniques (**Tableau 1**, page suivante).

➤ **La forme adulte (DM1) :**

Il s'agit de la forme classique des dystrophies myotoniques, elle se caractérise, entre autres, par une faiblesse musculaire, une myotonie généralisée et une cataracte, qui sont les trois symptômes cardinaux de la DM1. En addition, on retrouve

Forme DM1	Symptômes cliniques	Nombre de répétitions CTG	Age de développement de la maladie
DM1 congénitale (CDM1)	Faiblesse musculaire sévère (Hypotonie) Détrousse respiratoire grave Retard mental Complications cardiorespiratoires	> 1000	Naissance
Forme infantile	Faiblesse de la face	50–1000	1–10 an
	Myotonie		
	Retard intellectuel modéré (QI bas) Défaut de conduction cardiaque		
Forme adulte "DM1 classique"	Faiblesse musculaire Myotonie des muscle distaux Cataracte Défaut de conduction cardiaque Résistance à l'insuline Détrousse respiratoire	50–1000	10–30 an
Forme tardive / asymptomatique	Myotonie légère Cataracte	50–100	20–70 an
Pré-mutation	Pas de symptômes	38–49	non applicable
Non atteint	Pas de symptômes	5-38	non applicable

Tableau 1 : Comparaison des différentes formes de DM1

Présentation des signes cliniques caractérisant chaque forme de DM1. La taille des expansions ainsi que l'âge de développement de la maladie correspondant à chaque forme apparaissent également. Adapté de Turner & Hilton-Jones, 2010.

des troubles de la conduction cardiaque, du comportement et une résistance à l'insuline. Ces symptômes sont décrits plus en détails dans le **chapitre I.C.**

➤ **La forme congénitale (CDM1) :**

Il s'agit de la forme la plus sévère de la DM1. Elle est associée à une transmission majoritairement maternelle (Harper, 1975, 2001), et se caractérise par de larges expansions de répétitions supérieures à 1000 CTG. Elle touche les nourrissons qui présentent une hypotonie généralisée, une détresse respiratoire souvent fatale, une faiblesse des muscles de la face ainsi que des difficultés à s'alimenter souvent associées à des troubles de succion et de déglutition. Le retard mental est fréquent dans cette forme. Toutefois, à la fin de l'enfance, ces patients développent la forme adulte DM1 avec l'apparition de la myotonie, de la cataracte et des troubles cardiaques (Reardon et al., 1993). Les fibres musculaires de ces nouveau-nés présentent un retard de maturation caractéristique (Furling et al., 2001).

➤ **La forme infantile (DM1) :**

Elle débute avant l'âge de 10 ans, les enfants atteints développent d'abord une faiblesse musculaire, ainsi qu'un retard intellectuel modéré. Par la suite, avec l'âge, ces patients vont développer l'ensemble des symptômes de la forme adulte.

➤ **La forme tardive (DM1) :**

Cette forme se caractérise par des symptômes plus discrets, essentiellement représentés par une cataracte et une myotonie parfois asymptomatique. L'espérance de vie de ces patients est normale. Du fait de ces symptômes modérés et tardifs, il s'agit d'une forme difficile à diagnostiquer.

Ce classement reflète partiellement la taille des répétitions CTG observée dans le sang des patients. Ainsi, les individus non-atteints possèdent de 5 à 38 répétitions CTG, les formes tardives ou asymptomatiques présentent typiquement moins de 100 répétitions, les patients atteints de la forme adulte ou infantile (DM1) présentent plusieurs centaines de répétitions CTG, enfin, les nourrissons atteints de la forme congénitale (CDM1) ont typiquement plus de 1000 répétitions (Harper, 1989; Ranum & Cooper, 2006). Toutefois, la pénétrance incomplète et la variabilité importante dans

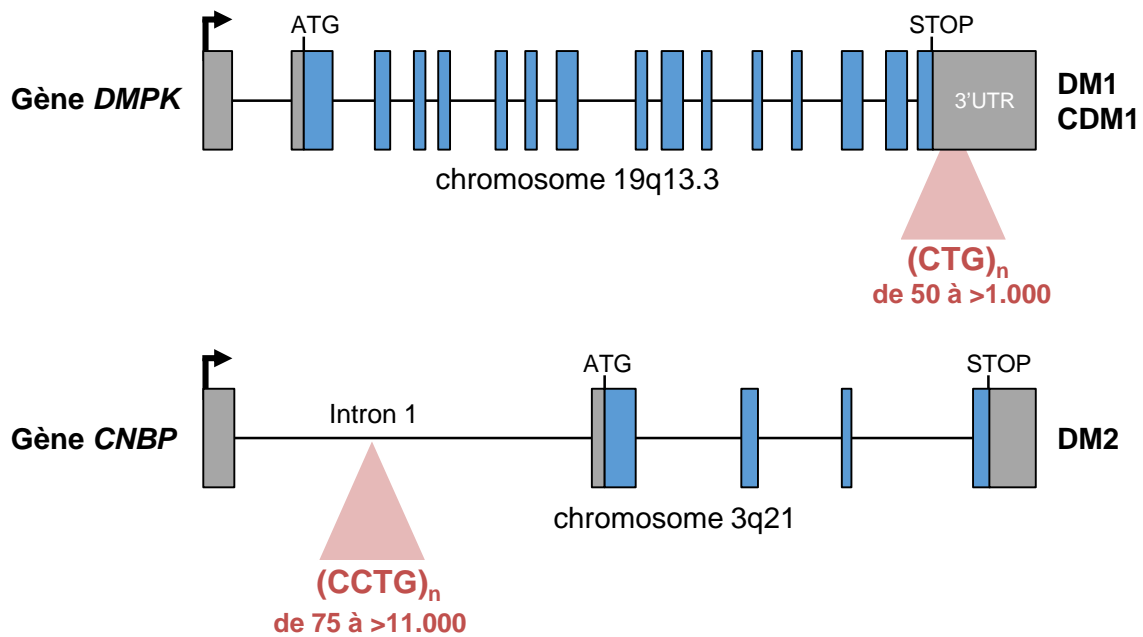


Figure 2 : Localisation génomique des expansions responsables de la DM1 et 2.

La DM1 est causée par une expansion de tri-nucléotides CTG au niveau de la région 3' non traduite du gène *DMPK* situé sur le chromosome 19q13.3. La DM2 est due à des répétitions CCTG dans le premier intron du gène *CNBP* localisé sur le chromosome 3q21. Adapté de Ranum & Cooper, 2006.

la manifestation des symptômes selon les patients, interdisent l'établissement d'une corrélation stricte et précise entre le nombre de répétitions CTG et la gravité de la maladie (Harper, 2001). De plus, la grande instabilité somatique des répétitions CTG complique ces analyses. En effet, un patient DM1 peut présenter quelques centaines de répétitions CTG dans ses cellules sanguines et plusieurs milliers dans le muscle squelettique ou cardiaque. Par conséquent, il est difficile d'établir précisément une gamme de taille de répétitions CUG pour caractériser chaque forme de la maladie (adulte DM1, enfant DM1 et nouveau-né CDM1). Les différentes catégories de DM1 sont donc plutôt considérées comme un continuum, avec un nombre de répétitions CTG plus important dans les formes les plus sévères.

Enfin, on observe également un phénomène d'anticipation, correspondant à une aggravation de la maladie au cours des générations successives qui est aussi associé à une augmentation du nombre de répétitions (Monckton et al., 1995; Martorell et al., 1998). Au contraire, le phénomène de contraction du nombre de répétitions ne surviendrait que dans de rares cas.

I.B.2) La dystrophie myotonique de type 2

Il existe aussi une dystrophie myotonique de type 2 (DM2), affectant les patients plus tardivement dans leur vie. La DM2 est due à l'expansion de répétitions des nucléotides CCTG (de 75 et jusqu'à 11000 répétitions), localisée dans le premier intron du gène *CNBP* « CCHC-type zinc finger, nucleic acid binding protein » (**Figure 2**), aussi connu sous le nom de *ZNF9* (Liquori et al., 2001). La longueur moyenne des répétitions CCUG dans le sang des patients DM2 (environ 5000) est bien supérieure à ce qui est observé chez les patients DM1. Cependant, à l'inverse de la DM1, aucun cas de forme congénitale de DM2 n'a été décrit à ce jour. De plus, aucune corrélation évidente entre la taille des répétitions CCTG et la sévérité ou l'âge d'apparition des premiers symptômes n'a pu être établie. D'autre part, l'apparition des symptômes est souvent plus tardive et moins prononcée que chez les patients DM1, c'est pourquoi la DM2 est considérée comme une dystrophie myotonique « modérée ». Enfin, les signes cliniques de la DM2 sont similaires mais pas identiques à ceux de la DM1. Par exemple, chez les patients DM2, ce sont plutôt les muscles proximaux et les fibres musculaires de type II qui sont préférentiellement altérés contrairement à la DM1 qui touche plutôt les muscles distaux et les fibres musculaires de type I (Moxley et al., 2002).

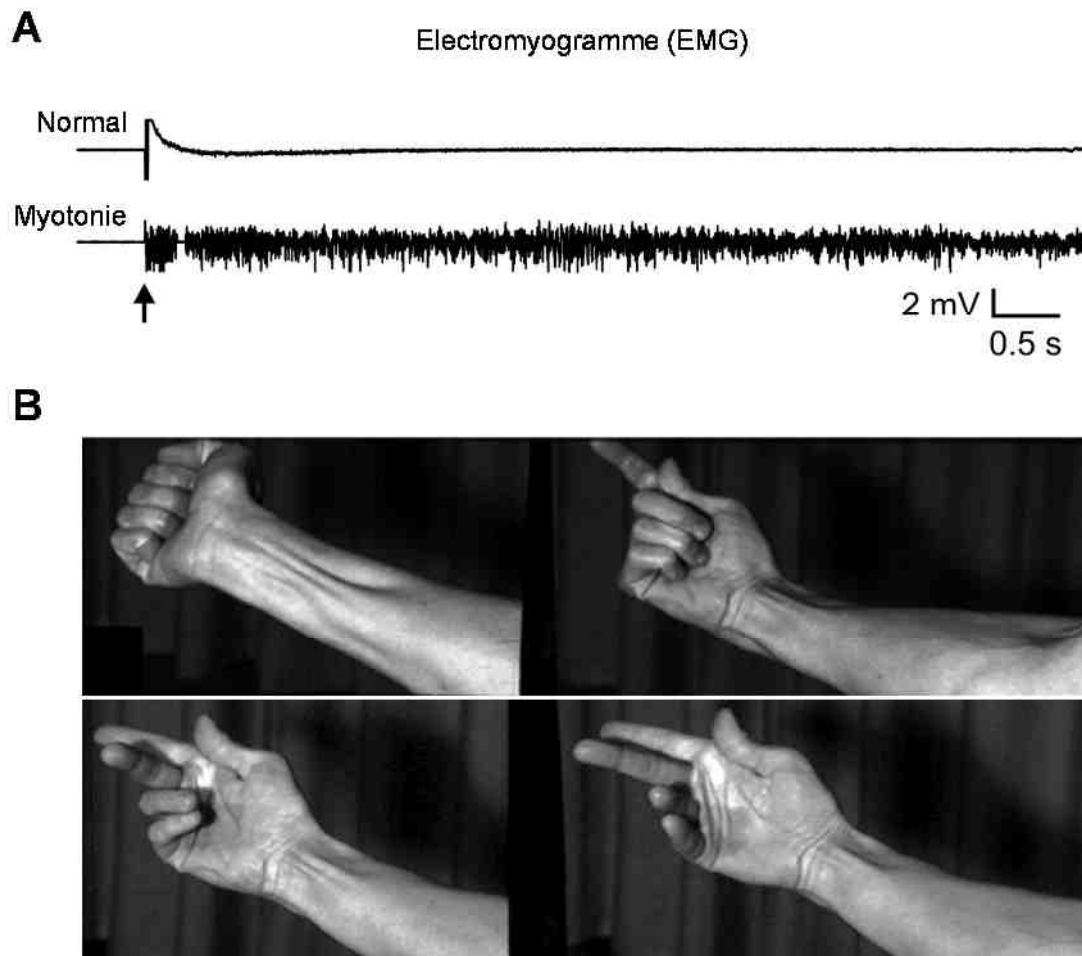


Figure 3 : Illustration de la myotonie par électromyogramme et photographie.

(**A**) Comparaison d'un électromyogramme obtenu sur des souris normales (*haut*) ou développant une myotonie après mutation d'un canal musculaire (*bas*). Adapté de Hayward et al., 2008. (**B**) Myotonie typique de la main après contraction (*1^{ère} photo*), puis relaxation (*photos suivantes*), montrant une vitesse réduite de l'ouverture du poing et une faiblesse des fléchisseurs des doigts. Adapté de Schara & Schoser, 2006.

I.C. Les symptômes des dystrophies myotoniques

Les formes adultes des DM1 et DM2 sont les formes les plus décrites dans la littérature, c'est pourquoi nous nous concentrerons plus particulièrement sur celles-ci. Les symptômes les plus courants sont un affaiblissement des muscles de la face, du cou et des membres (distaux ou proximaux selon le type de DM), une opacité de cristallin (cataracte) et une difficulté à relâcher un muscle contracté (myotonie), ce sont les trois symptômes cardinaux des dystrophies myotoniques. Les patients DM1 souffrent également de troubles cardiaques, de résistance à l'insuline, de troubles de la vigilance et de la personnalité et d'atrophie testiculaire chez les hommes. A l'inverse, les patients DM2 présentent rarement des affections non-musculaires, excepté la cataracte. Une description plus complète de ces symptômes est présentée ci-dessous (d'après le livre « Myotonic Dystrophy - Third edition », par Harper, 2001).

I.C.1) La myotonie

La majorité des patients DM présentent une myotonie, c'est-à-dire une lenteur anormale du relâchement musculaire à la suite d'une contraction volontaire ou non. Celle-ci est le plus fréquemment observée dans les muscles des mains, des bras et de la langue. La myotonie est due à une réouverture anormale des canaux sodiques musculaires et à la production de plusieurs potentiels d'action après excitation, conduisant à une contraction musculaire involontaire qui empêche le muscle de se relâcher (**Figure 3**). Il existe des maladies génétiques caractérisées par une myotonie développée dès la naissance. Ces myotonies congénitales sont classiquement dues à des mutations dans les gènes du canal chlore musculaire (*CLCN1*, pour la myotonie de Becker) ou du canal sodique musculaire (*SCN4A*). Chez les patients DM, il semble que la myotonie soit due à une altération de l'épissage et de l'expression de *CLCN1* (Charlet-B et al., 2002; Mankodi et al., 2002). La prise en charge de la myotonie se fait essentiellement par l'utilisation de drogues antiarythmiques dont l'efficacité résulte de leur effet stabilisant des membranes. Ainsi, le mexiletine, un agent antiarythmique, permet de réduire de manière significative la myotonie chez les patients DM1.

I.C.2) La faiblesse musculaire

Environ 60 à 80% des patients DM présentent aussi une faiblesse musculaire. Chez les patients DM1, les muscles les plus affectés sont les muscles faciaux,



Figure 4 : Apparence typique des patients atteints de la DM1.

Ces photographies montrent la faiblesse et l'atrophie des muscles de la face ainsi que ceux du cou et des bras que l'on peut observer chez les patients DM1.

Adapté de Batten & Gibb, 1909 et Turner & Hilton-Jones, 2010.

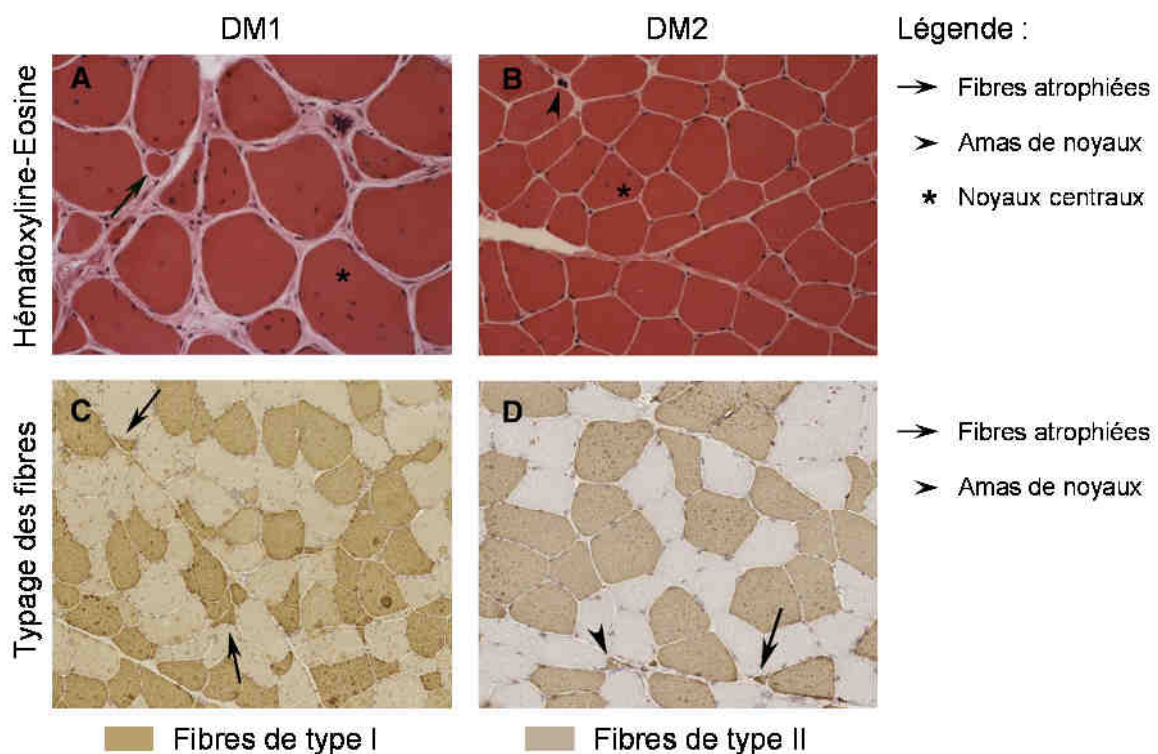


Figure 5 : Histologie des muscles de patients DM1 et DM2.

Coloration hématoxyline-éosine d'une section transversale de biopsie musculaire de patients DM1 (A) et DM2 (B). Marquage immuno-histochimique des fibres préférentiellement atrophiées de type 1 chez les patients DM1 (C) et de type 2 chez les patients DM2 (D). Adapté de Meola & Cardani, 2015.

temporaux, du cou, ainsi que les muscles distaux des bras (**Figure 4**). Avec l'âge, la dystrophie s'étend aux quadriceps, aux muscles intercostaux et au diaphragme, ce qui peut conduire à une insuffisance respiratoire fatale. A l'inverse, pour les patients DM2, les muscles proximaux sont généralement touchés en premier, ce qui explique le nom initialement donné à la DM2 : dystrophie myotonique proximale ou PROMM (Ricker et al., 1995; Meola & Sansone, 1996). Sur le plan histologique, les fibres musculaires de type I (DM1) ou de type 2 (DM2) présentent une atrophie, des noyaux anormalement centraux (**Figure 5**), une régénération modérée et une dégénérescence non spécifique des myofibrilles (Schröder & Adams, 1968). Dans la DM1, l'altération de l'épissage d'ARN pré-messagers spécifiques est associée au phénotype de faiblesse musculaire, cela est le cas des canaux calciques musculaires RYR1 (Kimura et al., 2005) et CACNA1S, aussi appelé DHPR (Tang et al., 2012), de la dystrophine DMD (Rau et al., 2015) et de l'amphiphysine 2 (BIN1) (Fugier et al., 2011). En effet, il a été démontré que l'altération de l'épissage de ces ARN corrélait avec la sévérité de la faiblesse musculaire chez les patients DM1 (Nakamori et al., 2013). Il est à noter que des mutations dans le gène *BIN1* ont été mises en évidence chez des patients souffrant de myopathies centronucléaires, qui est une maladie avec un profil histopathologique similaire à la DM1 (Nicot et al., 2007; Böhm et al., 2014), **Cf. Partie II.D.2**). Enfin, les muscles lisses sont aussi touchés dans la DM1, et peut-être même plus fréquemment que les muscles striés. Parmi eux, les muscles les plus affectés sont le pharynx, l'œsophage et le colon, ce qui participe aux problèmes gastro-intestinaux des patients (Rönneblom et al., 1996).

I.C.3) Les anomalies cardiaques

Plus de 80% des patients atteints de DM souffrent de symptômes cardiaques, ces problèmes constituent la seconde cause de mortalité dans la DM (30%), après l'atrophie et l'affaiblissement des muscles respiratoires (40%) (Mathieu et al., 1999). Les patients DM présentent essentiellement des défauts de la conduction auriculo-ventriculaire (blocs), qui peuvent conduire à l'implantation d'un pacemaker. Sur un électrocardiogramme (ECG), ce retard de la conduction cardiaque se traduit par une élongation de l'intervalle PR. De plus, 25% des patients DM présentent aussi des épisodes de tachycardie et de fibrillations auriculaires et/ou ventriculaires. Ces arythmies peuvent mener à une mort soudaine des patients, qui peut être prévenue par l'implantation d'un défibrillateur (Pelargonio et al., 2002; Groh et al., 2008).

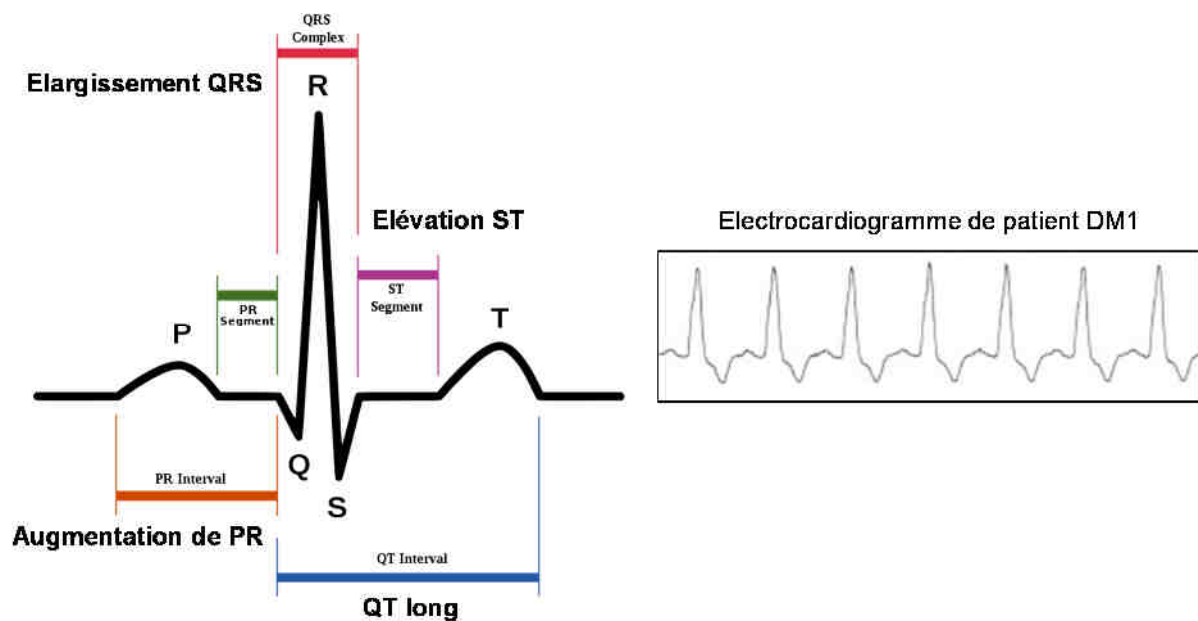


Figure 6 : Altérations de la conduction cardiaque chez les patients DM1.

Les anomalies cardiaques courantes dont souffrent les patients DM1 apparaissent sur l'électrocardiogramme à gauche. Une prolongation de PR et QRS, observée chez un patient atteint de la forme adulte de la DM1 apparaît sur l'électrocardiogramme de droite. Adapté de Lau et al., 2015.

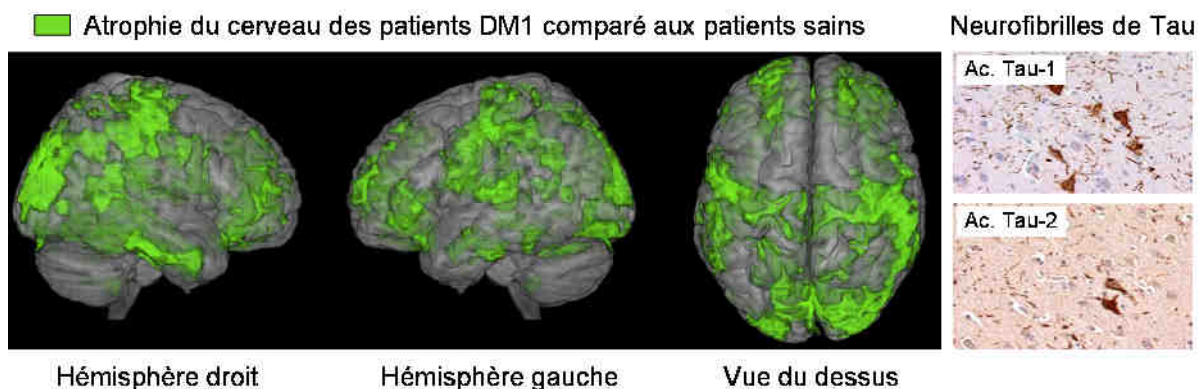


Figure 7 : Atrophie et agrégation de Tau dans le cerveau des patients DM1.

Droite - Comparaison anatomique entre le cerveau de patients DM1 et patients en bonne santé, l'atrophie identifiée au sein du cerveau de patient DM1 apparaît en vert. Adapté de Baldanzi et al., 2016. Gauche – Détection de neurofibrilles formées par l'agrégation de Tau dans les amygdales cérébrales de patient DM1 en utilisant deux anticorps différents. Adapté de Dhaenens et al., 2011.

Cette dépolarisation défailante des ventricules, est révélée sur l'ECG par un élargissement du complexe QRS, comme le montre la **Figure 6** (Phillips & Harper, 1997; Lazarus et al., 2002; Groh et al., 2008; Wahbi et al., 2012). Ces anomalies de conduction cardiaque semblent progresser avec l'âge du patient et selon le nombre de répétitions CTG (Clarke et al., 2001). Chez les patients atteints de DM2, les défauts cardiaques sont similaires, mais généralement moins marqués (Day et al., 2003). Enfin, plusieurs altérations moléculaires sont observées dans le cœur de patients DM, comme une altération de l'expression des microARN, et notamment de miR-1 (Rau et al., 2011; Kalsotra et al., 2014), ainsi que du facteur de transcription Nkx2.5 (Yadava et al., 2008). De plus, la phosphorylation et l'expression de la protéine CUGBP1 sont aussi altérées (G.-S. Wang et al., 2007; Kuyumcu-Martinez et al., 2007), de même que l'épissage de la troponine T cardiaque (Philips et al., 1998) ou du canal sodique cardiaque SCN5A (Wahbi et al., 2013; Freyermuth et al., 2016).

I.C.4) Problèmes du système nerveux

Outre les troubles musculaires, les patients DM1 développent également des troubles neurologiques, souvent traduits par des troubles du sommeil (hypersomnie, somnolence), par une altération des fonctions cognitives, y compris de la mémoire immédiate, ainsi que par des troubles de la motivation, de l'humeur, voire du comportement. Au niveau histologique, le cerveau des patients DM1 se caractérise par des lésions gliales, des pertes neuronales et la présence de corps d'inclusion et de neurofibrilles causées par l'agrégation de la protéine Tau dans les neurones (**Figure 7**; Vermersch et al., 1996). De plus, l'épissage alternatif de l'ARN *MAPT*, codant pour la protéine Tau, est altéré chez les patients DM (Sergeant et al., 2001; Leroy et al., 2006; Goodwin et al., 2015).

I.C.5) Autres symptômes

L'atteinte oculaire se traduit essentiellement par une cataracte, dite « en arbre de Noël » qui est présente chez tous les patients de plus de 40 ans. Elle se manifeste par des opacités multicolores augmentant en nombre et en taille (Harper, 1973). Une dégénérescence de la rétine peut également être présente, mais de façon beaucoup plus rare. Une calvitie frontale est souvent observée chez les hommes et des tumeurs bénignes du bulbe pileux (pilomatricarcinomes) sont courantes chez les patients DM.

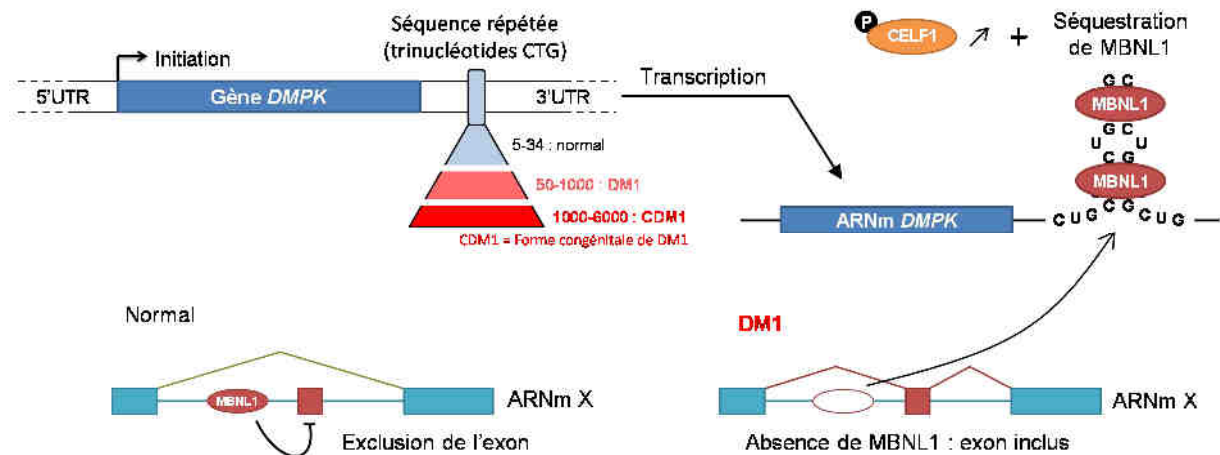


Figure 8 : Mécanisme moléculaire de la DM1.

(Gauche) La sévérité de la DM1 est corrélée avec la taille de l'expansion de répétitions CTG localisée au niveau de la région 3'UTR du gène *DMPK*. (Droite) Le gène *DMPK* est transcrit en un ARNm toxique car les répétitions CUG forment des structures « tige-boucle » qui vont séquestrer la protéine MBNL1. Au même moment, CELF1 est surexprimée à cause de la présence de ces répétitions. (Bas) Les cibles ARNm de MBNL1 subissent une dérégulation d'épissage alternatif dans la DM1 à cause de la séquestration de cette protéine.

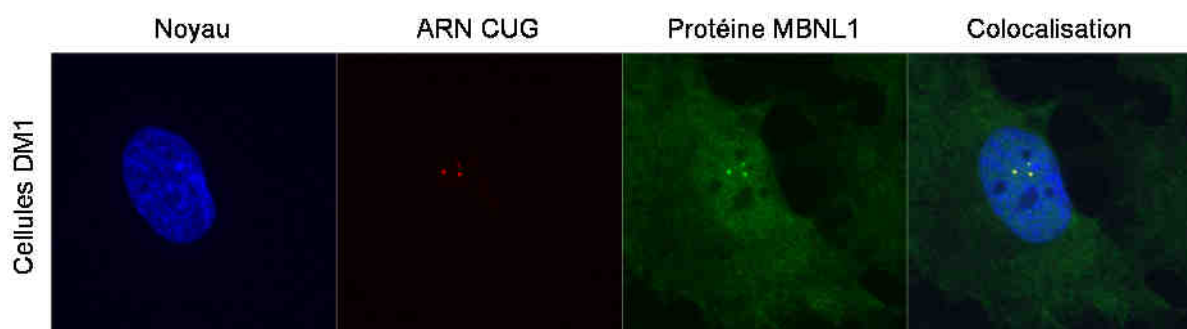


Figure 9 : Agrégats nucléaires d'ARN CUG séquestrant la protéine MBNL1 dans des cellules en culture de patients DM1.

Dans le noyau des cellules DM1, les expansions de répétitions CUG s'agrègent en foci (amas nucléaires ; point rouges) et séquestrent la protéine MBNL1 (marquage vert).

De plus, 63 à 86% des patients masculins présentent une atrophie testiculaire due à une dégénérescence des tubes séminifères, sans conséquence sur la fécondité. Chez les femmes, la ménopause peut se révéler précoce. La quantité d'IgG est diminuée chez les patients DM. Enfin, le métabolisme de l'insuline est souvent altéré chez les patients DM, et les muscles squelettiques ne répondent pas correctement à des injections d'insuline (Moxley et al., 1984).

I.D. Mécanisme moléculaire des DM

I.D.1) Généralités

Les dystrophies myotoniques de type 1 et 2 sont donc dues à des expansions de tri-nucléotides CTG ou tétra-nucléotides CCTG. Ces répétitions sont transcrites mais non traduites et produisent des ARN pathologiques qui s'agrègent au sein du noyau sous forme de foci (amas nucléaires) (Taneja et al., 1995). Cette observation a conduit à proposer un modèle selon lequel des protéines reconnaissant des motifs CUG seraient séquestrées par ces longues répétitions CUG (L. T. Timchenko et al., 1996). Parmi les protéines liant les répétitions CUG et CCUG, on retrouve celles de la famille Muscleblind-like (MBNL) et notamment la protéine MBNL1 (Miller et al., 2000; Mankodi et al., 2001). Parce qu'elle est séquestrée, la disponibilité intracellulaire de MBNL1 décroît, ce qui l'empêche de jouer son rôle de régulateur de l'épissage alternatif et mène ainsi à un épissage altéré des ARNm qu'elle régule (Goodwin et al., 2015), comme le montre le schéma en **Figure 8**.

I.D.2) MBNL1 acteur central de la maladie

C'est chez la Drosophile que la protéine Muscleblind (Mbl) a été initialement découverte et identifiée comme étant essentielle pour le développement des photorécepteurs et des muscles (Begemann et al., 1997; Artero et al., 1998). Le rôle de Muscleblind dans la dystrophie myotonique a ensuite été établi en 2000 par l'équipe du professeur Maury Swanson qui a démontré que MBNL1 était la principale protéine à se lier spécifiquement à des ARN contenant des répétitions CUG (Miller et al., 2000). Ce travail fondateur a été suivi par l'observation de la co-localisation de MBNL1, soit transfecté (Fardaei et al., 2001), soit endogène, avec les foci d'ARN *DMPK* contenant les répétitions CUG dans des cellules (**Figure 9**) et des tissus de patients DM1 (Mankodi et al., 2001; Cardani et al., 2006; Holt et al., 2009).

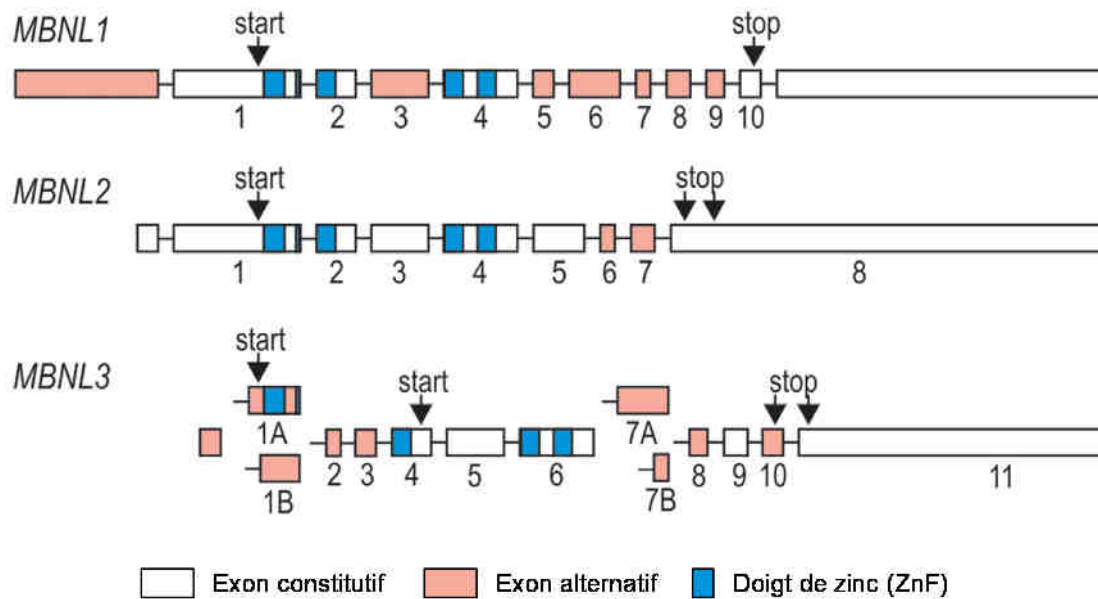


Figure 10 : Structure exonique de la famille MBNL.

Représentation schématique des trois gènes MBNL humains. Les exons constitutifs sont représentés par des rectangles blancs alors que les exons alternatifs sont en rose avec leurs numéros en dessous. Enfin, les doigts de Zinc, qui sont les domaines liant l'ARN apparaissent en bleu. Adapté de Konieczny et al., 2014.

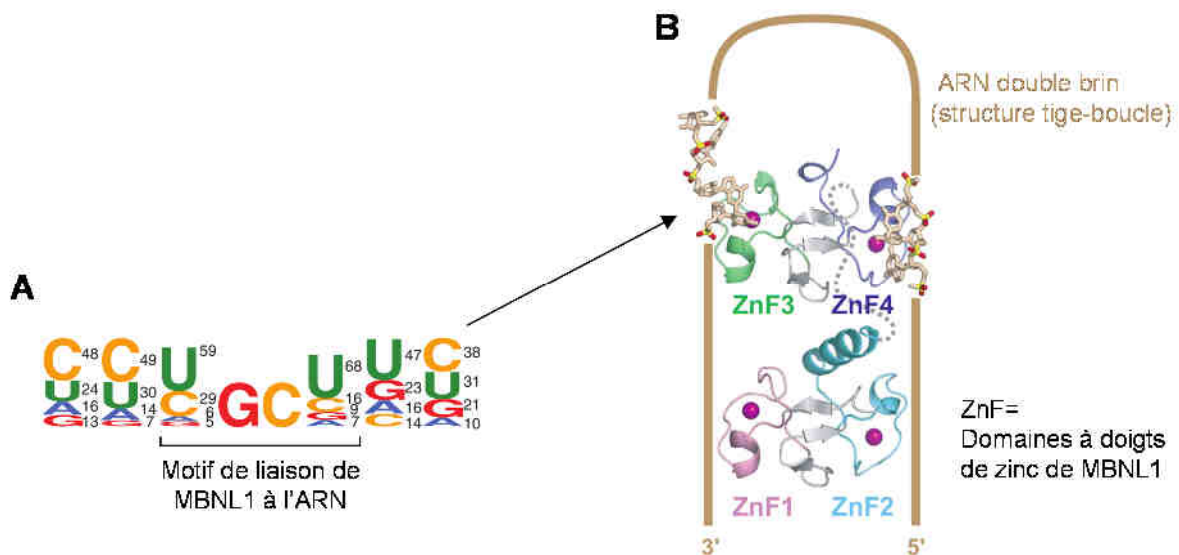


Figure 11 : Structure d'interaction de MBNL1 avec l'ARN et motif reconnu.

(A) Motif de séquence ARN prédit pour être reconnu par MBNL1. La taille des nucléotides est représentative de leur fréquence. Le motif obtenu est YGCRY (Y = C/U). (B) MBNL1 possède 4 domaines à doigt de zinc (ZnF 1 à 4) organisés en tandem et capables d'interagir avec l'ARN. Les deux tandems sont reliés par une séquence adaptatrice (pointillés). Adapté de Teplova & Patel, 2008; Goers et al., 2010.

Cette séquestration de MBNL1 dans les foci d'ARN C/CUG conduit à une perte partielle de la fonction de cette protéine dans la DM. Enfin, l'importance des protéines MBNL pour la dystrophie myotonique a été établie par l'étude de modèles murins. Ainsi, les souris invalidées (knockout ; KO) pour les gènes *Mbnl1* et *Mbnl2* reproduisent partiellement certains symptômes des DM (Kanadia, Johnstone, et al., 2003; Charizanis et al., 2012; K.-Y. Lee et al., 2013). De plus, la surexpression de MBNL1 par une stratégie virale de type AAV permet de corriger la myotonie dans un modèle murin de la DM1 qui exprime 250 répétitions CUG (Kanadia et al., 2006). Une description succincte des protéines MBNL et de leur fonction est présentée ci-dessous.

- **Famille protéique**

Il existe plusieurs membres de la famille MBNL (**Figure 10**), à savoir MBNL1, MBNL2 et MBNL3 (Fardaei et al., 2001; Kanadia, Urbinati, et al., 2003). La protéine MBNL1 est principalement exprimée dans le muscle squelettique et le cœur, alors qu'elle est minoritaire dans le cerveau par rapport à MBNL2 (Miller et al., 2000). MBNL2 est exprimée principalement dans le cerveau et dans le muscle cardiaque. Dans le muscle squelettique, MBNL2 peut jouer un rôle compensatoire lorsque MBNL1 est absente (K.-Y. Lee et al., 2013). Enfin, MBNL3 est présente essentiellement dans le placenta (Kanadia, Urbinati, et al., 2003).

- **Structure et motif de liaison à l'ARN**

Le gène MBNL1 est constitué de 12 exons dont dix sont codants et six sont régulés par épissage alternatif donnant lieu à 8 isoformes de MBNL1 (Tran et al., 2011; Kino et al., 2015). MBNL1 possède un signal de localisation nucléaire (NLS) situé à cheval sur les exons 6 et 7, et quatre domaines de liaison à l'ARN de type doigt de Zinc CCCH (3 cystéines et 1 histidine) situés dans la partie N-terminale de MBNL1. Chacun de ces doigts de Zinc reconnaît un motif ARN de séquence YGCY (avec Y = C / U) simple brin (**Figure 11A**), ainsi chaque molécule de MBNL1 a la capacité de reconnaître quatre motifs UGC au total. De plus, ces doigts de Zinc sont arrangés en tandem avec leur surface de liaison éloignée l'une de l'autre (**Figure 11B** ; arrangement miroir). Cette organisation va mener à l'orientation antiparallèle des deux chaînes d'ARN liées par le tandem (Teplova & Patel, 2008). Ces motifs ARN YGCY sont retrouvés dans les ARN régulés par MBNL1 ainsi que dans les expansions C/CUG (Miller et al., 2000; Warf & Berglund, 2007; Yuan et al., 2007; Goers et al., 2010).

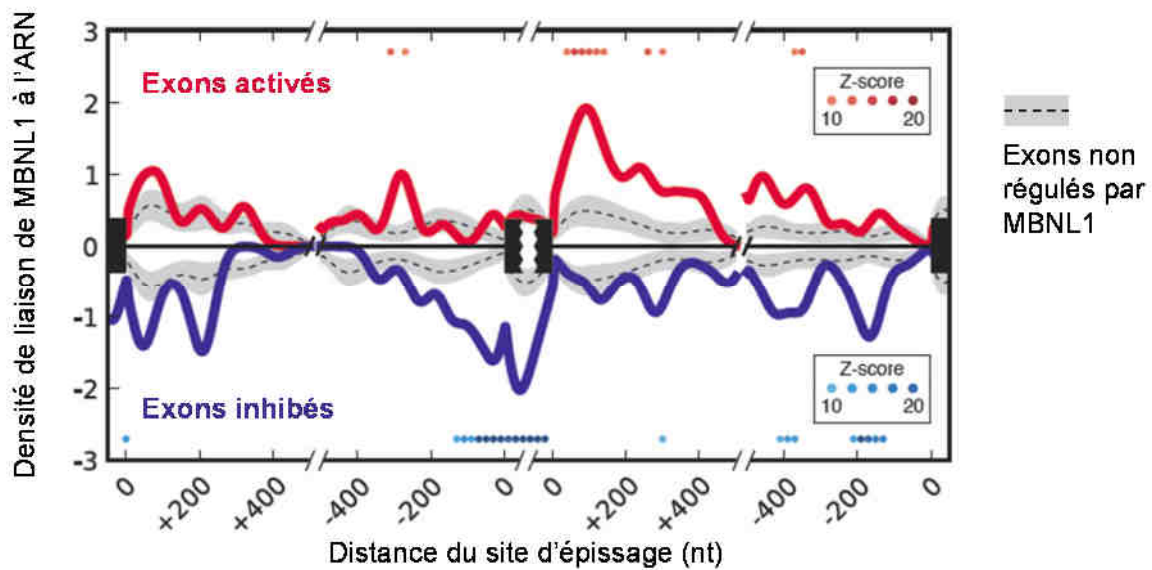


Figure 12 : Profil de liaison de MBNL1 sur les ARN qu'elle régule.

La protéine MBNL1 se lie préférentiellement en amont d'un exon qu'elle inhibe (bleu) alors qu'elle se lie en aval d'un exon qu'elle active (rouge). En comparaison, en gris apparaît le profil de liaison de MBNL1 autour d'exons non régulés par celle-ci.

Adapté de E. Wang et al., 2012.

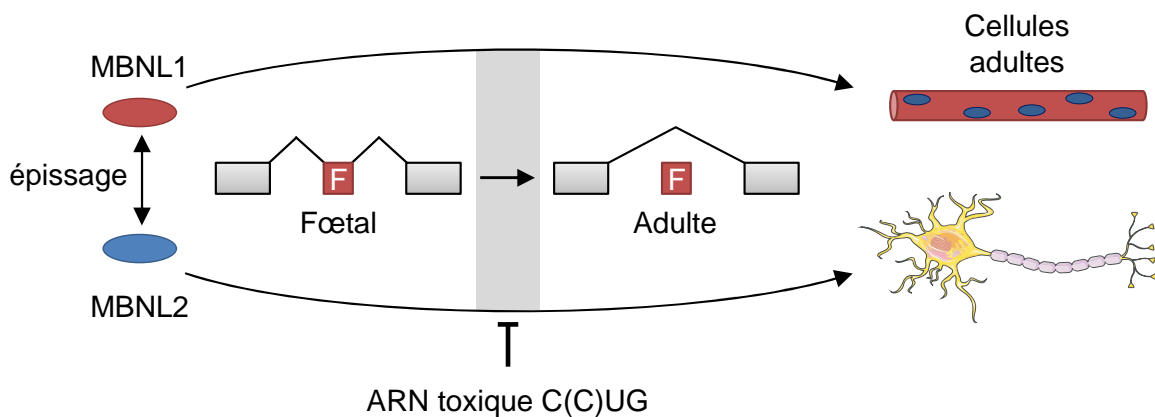


Figure 13 : MBNL1 et MBNL2 régulent la transition des isoformes fœtales à adultes des ARN messagers.

Modèle représentant l'action des protéines MBNL1, dans le muscle, et MBNL2, dans le cerveau, pour favoriser l'épissage alternatif des isoformes ARNm adultes. Cette activité est inhibée par les répétitions CUG ou CCUG dans les DM, ce qui provoque un retour vers des isoformes néonatales des ARN régulés par ces protéines. Adapté de Charizanis et al., 2012.

Ainsi, la reconnaissance et la liaison de MBNL1 aux répétitions du motif UGC, au sein des expansions CUG (DM1) ou CCUG (DM2), va conduire à une titration des protéines MBNL1 libres, et donc à une diminution de leur disponibilité, et par conséquent, à une perte de fonction partielle de MBNL1 dans la DM. Ce modèle a été confirmé de façon élégante par une étude récente de la liaison de MBNL1 à ses cibles ARN endogènes. Cette étude montre que la liaison de MBNL1 et MBNL2 à leurs ARN cibles diminue au profit de la liaison aux répétitions CUG et CCUG dans les tissus de patients DM1 ou DM2, par rapport à des tissus contrôles, démontrant ainsi la titration des protéines MBNL endogènes (Goodwin et al., 2015). Les diverses fonctions de MBNL1 sont décrites ci-dessous.

- **Epissage alternatif**

La première fonction caractérisée pour MBNL1 fut celle de régulateur de l'épissage alternatif (Ho et al., 2004; Dansithong et al., 2005; Lin et al., 2006). En effet, la liaison de MBNL1 à des motifs ARN YGC introniques régule l'exclusion ou l'inclusion d'exons alternatifs spécifiques. Il est à noter que l'activité d'épissage de MBNL1 dépend de sa position de liaison par rapport à l'exon régulé (**Figure 12**). C'est-à-dire que lorsque MBNL1 se lie en amont d'un exon, elle a tendance à réprimer l'inclusion de celui-ci. Au contraire, lorsque cette protéine se lie en aval de l'exon en question, elle activera son inclusion dans l'ARN (E. Wang et al., 2012, 2015). Lors du développement musculaire ou cardiaque, MBNL1 régule l'expression d'isoformes d'épissage néonatales ou embryonnaires afin d'effectuer la transition vers le stade adulte, comme schématisé en **Figure 13** (Lin et al., 2006; Kalsotra et al., 2008; E. Wang et al., 2015). Ainsi chez les patients DM1 il y a un retour d'expression de ces isoformes fœtales, qui ne sont pas adaptées au muscle adulte, ce qui conduit aux symptômes rencontrés dans la maladie (revue dans Konieczny et al., 2014). Cette transition physiologique, d'épissage fœtal vers adulte, serait en partie liée à la translocation de MBNL1, du cytoplasme vers le noyau. En effet, pendant le stade fœtal, MBNL1 est majoritairement cytoplasmique alors qu'elle devient nucléaire lors du développement (Lin et al., 2006). Ce changement de localisation va permettre à MBNL1 de réguler la transition des formes d'épissage néonatales à adultes de ses cibles ARN (Lin et al., 2006; Kalsotra et al., 2008; E. Wang et al., 2015). De même, il a été montré que MBNL2 régule aussi l'épissage alternatif, notamment au niveau du cerveau (Charizanis et al., 2012). Il est important de noter que la protéine MBNL2 subit

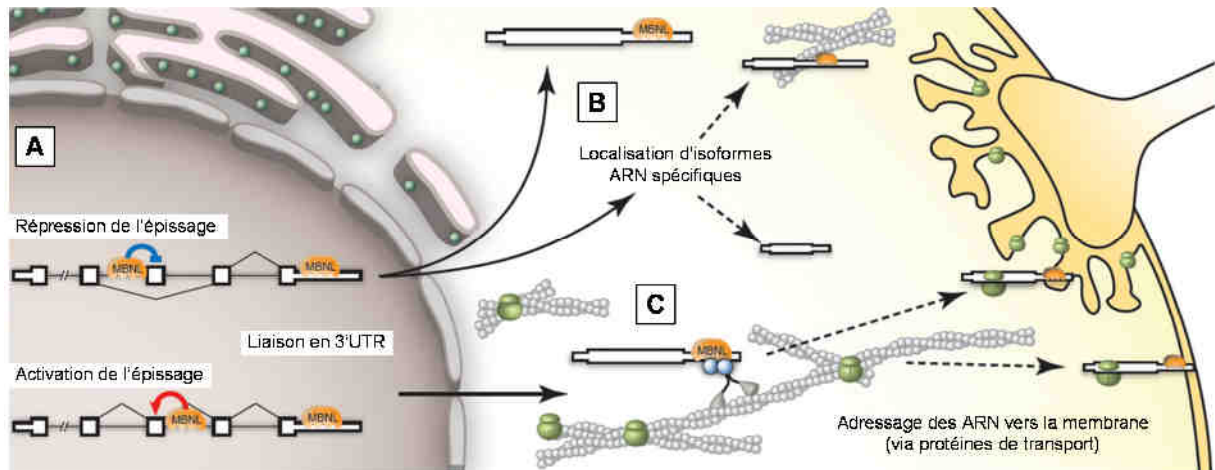


Figure 14 : Rôle de MBNL1 dans la localisation intracellulaire des ARN.

(A) Dans le noyau, MBNL1 (en orange) est un facteur d'épissage alternatif, selon sa liaison en amont ou en aval de l'exon, cette protéine permet respectivement l'inhibition ou l'activation de l'épissage. (B) En se liant à la région 3'UTR des ARN, MBNL1 permet aussi leur localisation, (C) ces ARN sont principalement adressés vers la membrane. Adapté de E. Wang et al., 2012.

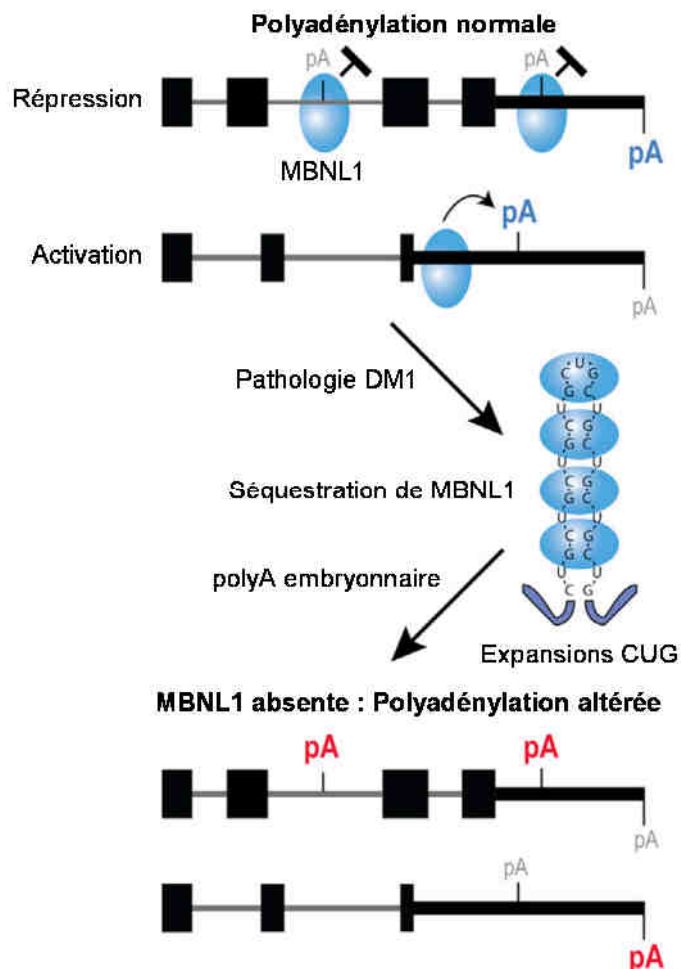


Figure 15 : MBNL1 régule la polyadénylation des ARN.

En fonction de sa liaison par rapport au signal de polyadénylation (pA), MBNL1 permet de réprimer ou d'activer le mécanisme de polyadénylation. Dans la DM1, MBNL1 est séquestrée par les répétitions CUG, ce qui l'empêche d'assurer cette fonction. La polyadénylation des ARN est alors altérée et retourne vers ce que l'on observe au stade néonatal. Adapté de Batra et al., 2014.

elle aussi une séquestration par les expansions de répétitions C/CUG. L'absence de MBNL2 va donc provoquer la dérégulation de nombreux événements d'épissage nécessaires à la fonction normale du système nerveux (Charizanis et al., 2012; Goodwin et al., 2015). Enfin, la titration combinée de MBNL1 et MBNL2 dans le cœur est aussi à l'origine de nombreuses altérations d'épissage (K.-Y. Lee et al., 2013).

- **Localisation, polyadénylation et stabilité des ARNm**

Plusieurs études ont montré que MBNL1 n'était pas seulement impliquée dans la régulation de l'épissage alternatif, mais aussi dans d'autres fonctions telles que la localisation et la polyadénylation des ARNm (Adereth et al., 2005; E. Wang et al., 2012; Batra et al., 2014; Taliaferro et al., 2016). Par exemple, lors d'une approche d'identification des ARN cibles de MBNL1 par CLIP et séquençage d'ARN (E. Wang et al., 2012), de nombreux ARN messagers ont été mis en évidence pour leur potentielle liaison de MBNL1 au niveau des régions 3' non traduites (3'UTR). Cette liaison de MBNL1 en 3'UTR se fait principalement sur des ARN codant pour des protéines membranaires et permettrait leur adressage correct vers leur localisation cellulaire (**Figure 14**). De plus, la déplétion de *Mbnl1* dans des cellules en culture engendre un défaut de localisation de ces ARN. Pour expliquer cette fonction, les auteurs ont émis l'hypothèse que MBNL1 servirait d'intermédiaire entre les ARN à transporter et les protéines de transport intracellulaire (E. Wang et al., 2012). Toutefois, il est aussi possible que MBNL1 régule le choix entre divers exons terminaux et la polyadénylation de ceux-ci, conduisant ainsi à des régions 3'UTR potentiellement différentes. Ces modifications vont permettre un adressage et une localisation des ARN messagers différents (Batra et al., 2014). En effet, la liaison de MBNL1 sur des motifs YGCY, situés en amont du signal de polyadénylation (séquence AAUAAA), active la reconnaissance de cette séquence par la machinerie de polyadénylation, comme le montre la **Figure 15** (Batra et al., 2014). Ces résultats sont renforcés par une étude récente sur l'implication de MBNL1 dans la localisation des ARN au sein des neurones (Taliaferro et al., 2016). Ce travail montre qu'un grand nombre d'ARN possèdent une région 3'UTR alternative grâce à l'utilisation d'un exon terminal, soit proximal, soit distal. Ainsi, l'utilisation de l'exon terminal proximal ou distal déterminerait si l'ARN serait localisé respectivement au niveau du corps cellulaire (soma) ou au niveau des neurites du neurone. Le rôle de MBNL1 dans cet évènement a été mis en évidence par l'identification de motifs de liaison à cette protéine présents dans les exons terminaux

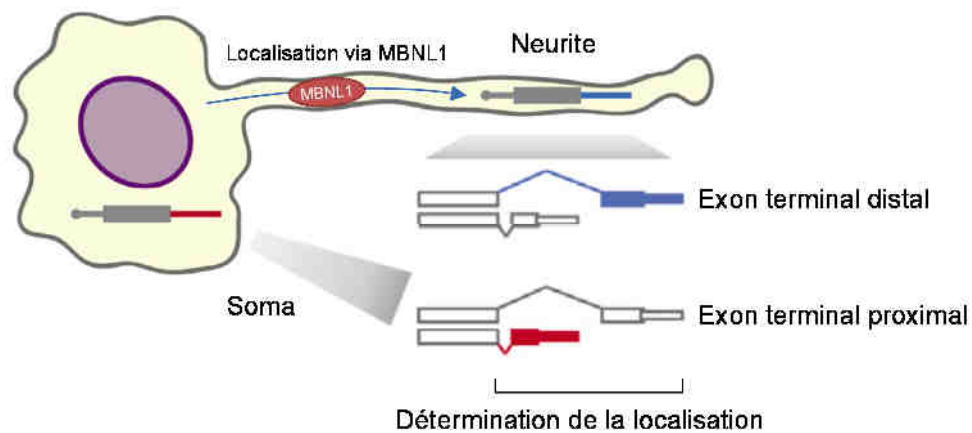


Figure 16 : Localisation des ARN selon leur épissage dans les neurones.

Selon le choix de l'exon terminal inclus dans l'ARN final, la localisation de celui-ci va être différente. L'inclusion de l'exon classique proximal (rouge), dirige l'ARN vers le corps cellulaire (soma) du neurone. En revanche l'inclusion de l'exon distal (bleu), dirige l'ARN vers les neurites, MBNL1 jouerait un rôle dans le transport de ces derniers. Adapté de Taliaferro et al., 2016.

distaux utilisés pour localiser les ARN dans les neurites (**Figure 16**). De plus, lorsque l'expression des protéines *Mbnl1* et *Mbnl2* est diminuée, la localisation des ARN possédant ces exons terminaux distaux est compromise dans les neurites (Taliaferro et al., 2016). Enfin, la régulation du choix entre exons terminaux conduit à des régions 3'UTR différentes, ce qui joue aussi sur la stabilité des ARN messagers (Fish et al., 2016). Ainsi, MBNL1 augmente la stabilité des ARN messagers DBNL (drebrin-like protein) et TACC1 (transforming acidic coiled-coil containing protein 1) qui sont des suppresseurs de tumeurs (Fish et al., 2016).

En conclusion, la maturation des ARN est donc affectée à plusieurs niveaux dans les DM. En effet, outre l'altération de l'épissage alternatif, des défauts de localisation, de stabilité et de polyadénylation des ARN messagers pourraient aussi participer aux symptômes de la maladie. Des structures cellulaires qui pourraient ainsi être particulièrement affectées sont les jonctions neuromusculaires (NMJ), puisque la formation des neurites et synapses est particulièrement dépendante d'une localisation correcte des ARN. En effet, des anomalies morphologiques des NMJ ont été identifiées précédemment dans un modèle murin de la maladie (Panaite et al., 2008). De façon intéressante, une étude sur des cellules souches embryonnaires issues d'embryons affectés par la DM1, a révélé que la diminution de deux membres de la famille de protéines SLITRK participait aussi aux anomalies morphologiques des NMJ (Marteyn et al., 2011). De ce fait, l'altération de l'épissage, de la localisation des ARN et d'autres événements moléculaires, pourraient contribuer collectivement aux différents symptômes rencontrés chez les patients DM1.

- **Altération des microARN**

Les microARN (miARN) sont de petits ARN conservés, ayant une longueur d'environ 22 nucléotides, qui régulent, de façon post-transcriptionnelle, l'expression génétique. En effet, les miARN, se lient dans la région 3'UTR de leurs ARN cibles, afin d'inhiber la traduction, ou de provoquer la dégradation de ceux-ci (**Figure 17** ; Bartel, 2009). Plusieurs familles de miARN ont été identifiées comme étant dérégulées chez les patients DM1. C'est notamment le cas de la famille miR-1, dont l'expression est diminuée dans le tissu cardiaque de patients DM1 comparé à celui de patients normaux. Il a été démontré que la protéine MBNL1 régule la maturation de ce miARN. En effet, des motifs de type UGC sont présents dans la séquence du pre-miR-1 et sont reconnus par MBNL1, qui va favoriser sa maturation. Or, dans la DM1, la quantité de

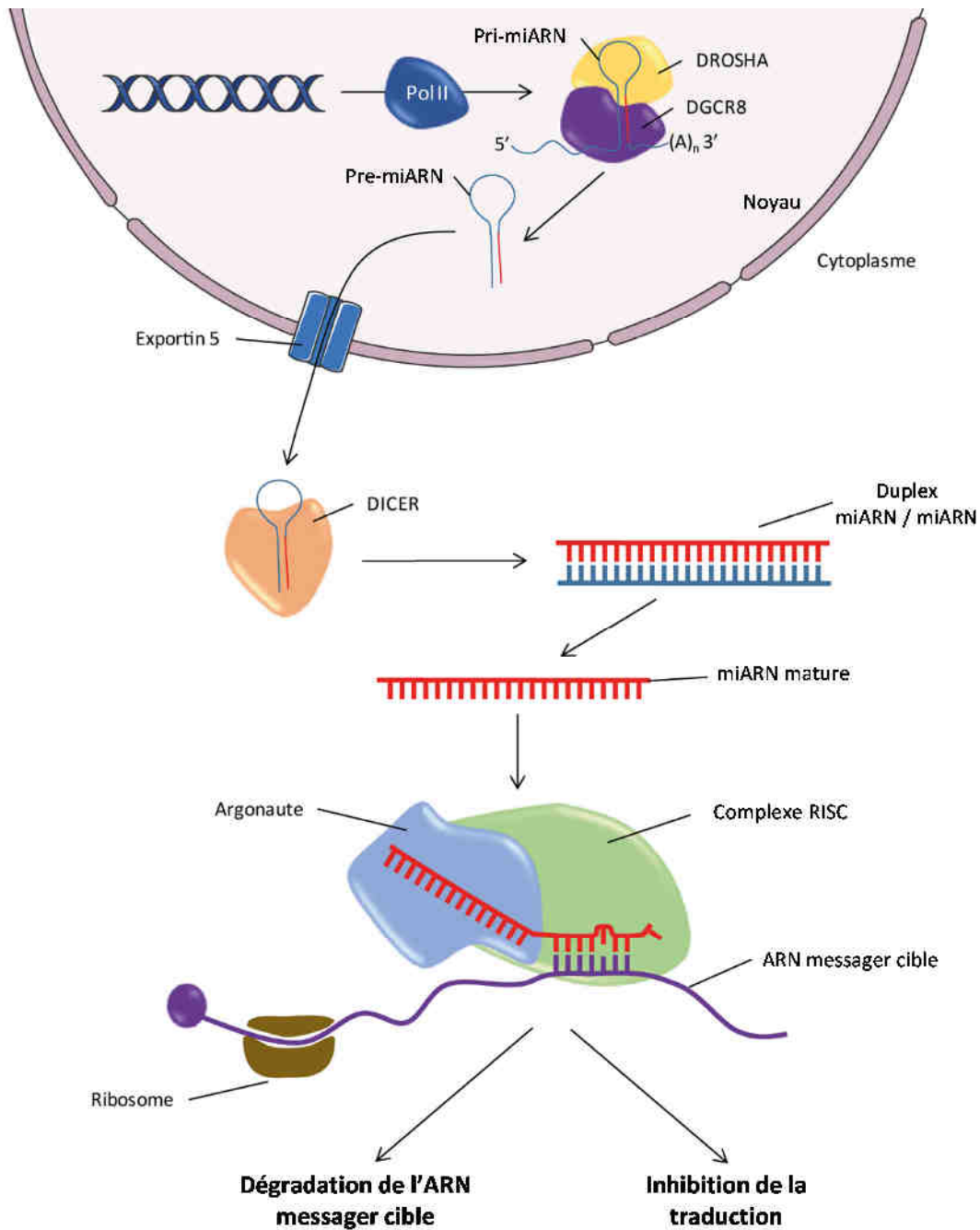


Figure 17 : Biogenèse des microARN

Le miARN primaire (pri-miARN), adoptant une structure tige-boucle, est transcrit par l'ARN Polymerase II, puis maturé en miARN précurseur (pre-miARN) par DROSHA / DGCR8. Le pre-miARN est alors exporté vers le cytoplasme et pris en charge par DICER, qui va cliver la boucle afin de produire un ARN double brin d'environ 22 pb, constituant le miARN mature. Un des brins du miARN est reconnu par le complexe RISC / Argonaute. Le miARN mature associé au complexe RISC va reconnaître sa cible ARNm afin d'induire la dégradation ou l'inhibition de la traduction de celui-ci.

Adapté de Derghal et al., 2016.

protéine MBNL1 disponible est réduite, à cause de sa séquestration, cela va donc conduire à la diminution de la maturation du pre-miR-1, et donc à la diminution d'expression de miR-1 mature. Ainsi, les transcrits ciblés normalement par ce miARN, tels que *CACNA1C* et *GJA1*, voient leur expression augmentée dans le cœur des patients DM1, ce qui pourrait participer à certains problèmes cardiaques des patients. De plus, des motifs UGC sont retrouvés dans la séquence de nombreux autres pré-miARN, soulignant la possibilité que MBNL1 soit un régulateur de la maturation de ces micro ARN (Rau et al., 2011). Une étude complémentaire a aussi montré que la diminution du régulateur transcriptionnel MEF2 dans la DM1, participait à l'altération de l'expression de certaines familles de miR dans le cœur, dont celle de miR-1 (Kalsotra et al., 2014). De plus, une approche à haut-débit a conduit à l'identification de microARN dérégulés dans un modèle drosophile de la DM1, portant 480 répétitions CUG. Ces altérations ont aussi été retrouvées chez les patients, montrant la spécificité du modèle utilisé. Encore une fois, la plupart des transcrits potentiellement ciblés par ces miRNA sont augmentés dans la pathologie (Fernandez-Costa et al., 2013).

Il a été avancé que ces miARN pouvaient servir de biomarqueurs pour détecter la DM1, ainsi que sa sévérité. En effet, les microARN sont présents en quantité significative dans le sérum et le plasma sanguin, permettant une détection non-invasive. Ainsi, plusieurs miARN sont spécifiquement augmentés dans les échantillons de sang de patients DM1 comparé aux patients contrôles (Perfetti et al., 2014; Koutsoulidou et al., 2015). De plus, une partie de ces miARN ont leur augmentation corrélée avec le degré de perte musculaire. Cela en fait de bons candidats pour être utilisés en tant que biomarqueurs de la progression de la perte musculaire dans la maladie (Koutsoulidou et al., 2015). Il a été proposé que l'augmentation de ces différents microARN dans le sang des patients DM1 soit causée par leur relargage depuis les muscles atteints de faiblesse et d'atrophie (Koutsoulidou et al., 2015). Cela pourrait donc expliquer le fait que miR-1 est diminué dans le muscle cardiaque de patients DM1 alors qu'il est retrouvé en plus grande quantité dans le sang, par rapport à des sujets sains. Cependant, une étude en contradiction avec ces résultats a montré la non pertinence de l'utilisation des miARN en tant que biomarqueurs. En effet, sur 175 microARN étudiés, aucun n'a été identifié comme étant significativement altéré dans le plasma de patients DM1 (Fernandez-Costa et al., 2016). Par conséquent, la possibilité de l'utilisation des miARN en tant que biomarqueur reste à prouver.

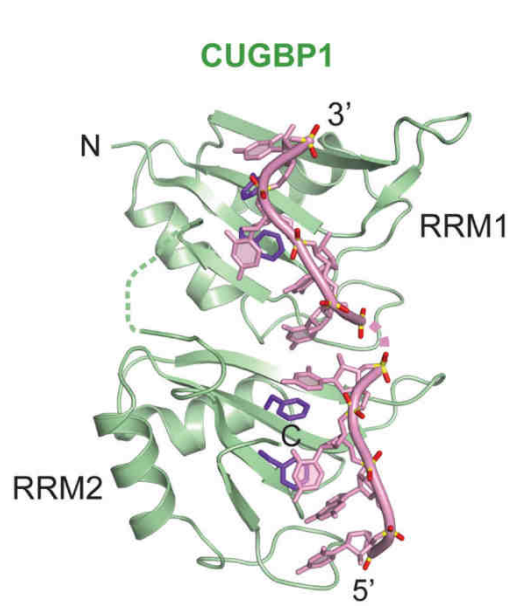


Figure 18 : Modèle structural des domaines RRM1/2 de CUGBP1 en liaison avec des motifs ARN UGU adjacents.

La protéine CUGBP1 possède trois domaines RRM, les deux premiers domaines sont adjacents l'un de l'autre et sont localisés au niveau de l'extrémité N-terminale. Le domaine RRM3 est localisé en C-terminal. Cette modélisation représente la prédiction de l'interaction entre les domaines RRM1 et 2 de CUGBP1 (en vert) et un ARN (rose) contenant des motifs UGU. D'après Teplova et al., 2010.

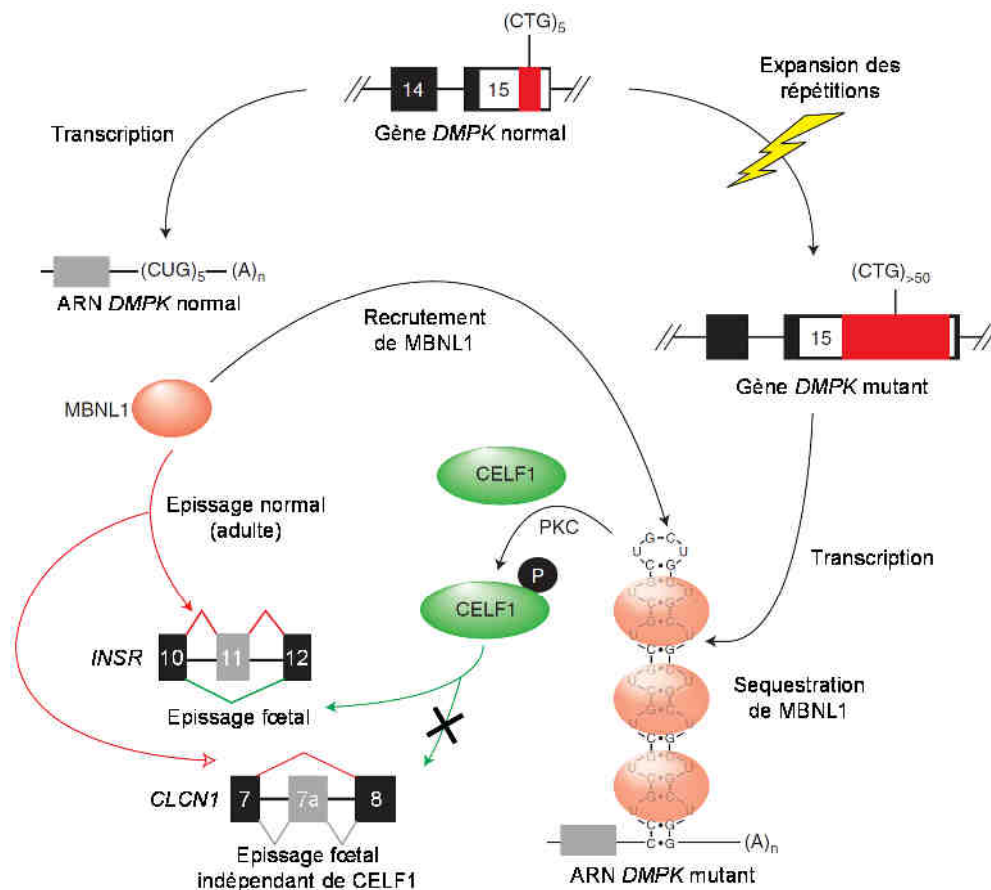


Figure 19 : Mécanisme moléculaire dans la DM1 impliquant CELF1 et MBNL1.

En présence de longues répétitions CUG, MBNL1 est séquestrée, ce qui conduit à une perte de fonction. En revanche, CELF1 (CUGBP1) est phosphorylée, ce qui augmente sa stabilité et participe au retour des isoformes d'épissage fœtales dans la DM1 pour certains ARN (e.g. *INSR* mais pas *CLCN1*). Modifié de Poulos et al., 2011.

Outre les protéines MBNL, plusieurs autres protéines de liaison à l'ARN ont été montrées comme participant à la pathologie des DM, notamment CUGBP1.

I.D.3) Rôle de CUGBP1 / CELF1

La protéine CUGBP1, codée par le gène *CELF1*, appartient à une famille de six paralogues (la famille CELF « CUGBP & ETR3-like family ») (Ladd et al., 2001). La protéine CUGBP1 est exprimée ubiquitairement et contient trois domaines de liaison à l'ARN de type RRM (« RNA Recognition Motif »), qui reconnaissent tous trois des motifs ARN simples brins de séquence UGU, comme présenté en **Figure 18** (Marquis et al., 2006; Teplova et al., 2010). Les fonctions de CUGBP1 sont multiples et dépendent de sa localisation subcellulaire. Ainsi, dans le noyau, elle agit comme facteur d'épissage (Philips et al., 1998), alors que dans le cytoplasme, elle agit comme facteur de régulation de la traduction ou de la stabilité des ARNm (Paillard et al., 2003; N. A. Timchenko et al., 2005; Vlasova & Bohjanen, 2008). A l'inverse de MBNL1, le rôle normal de CUGBP1 est de favoriser les formes d'épissage néonatales des ARN qu'elle régule. Ainsi, MBNL1 et CUGBP1 ont des effets opposés sur l'épissage (Kalsotra et al., 2008; E. Wang et al., 2015). Lors du développement, l'expression de CUGBP1 diminue, alors que la quantité de MBNL1 nucléaire augmente (Lin et al., 2006; Kalsotra et al., 2008). Par conséquent, la balance d'expression entre MBNL1 et CUGBP1 peut expliquer la transition des formes d'épissages fœtales vers adultes, pour plusieurs ARN pré-messagers (dont *INSR* et *cTNT*). De ce fait, il est intéressant de noter que le profil d'épissage alternatif des patients DM mime un retour à un épissage de type fœtal qui pourrait être expliqué par une diminution de la quantité de MBNL disponible, mais aussi par une augmentation de l'activité de CUGBP1 (**Figure 19**).

En effet, la phosphorylation et la demi-vie de la protéine CUGBP1 sont augmentées en présence d'ARN contenant de longues répétitions CUG et dans des cellules ou des échantillons de tissus de patients DM1 ainsi que dans un modèle murin de la maladie (N. A. Timchenko et al., 2001; G.-S. Wang et al., 2007). Cette hyperphosphorylation serait due à une activation de la protéine kinase C (PKC) par les répétitions CUG, selon un mécanisme encore inconnu (Kuyumcu-Martinez et al., 2007). Toutefois, il existe des données contradictoires quant à la surexpression de CUGBP1 chez les patients DM. Ainsi, une augmentation de CUGBP1 est retrouvée dans un modèle murin exprimant 960 répétitions CUG interrompues (G.-S. Wang et

al., 2007) mais pas dans le modèle HSA^{LR} exprimant 250 répétitions « pures » (Lin et al., 2006). Bien que ces données soient contradictoires, un consensus semble apparaître dans la littérature, et une augmentation modérée de CUGBP1 dans le cœur des patients DM1 est aujourd'hui admise. La situation est toutefois moins claire chez les patients DM2. En effet, une étude analysant un extrait protéique total issu de cellules DM2, ne montre pas d'augmentation de CUGBP1 (Pelletier et al., 2009), alors qu'une analyse utilisant des extraits cytoplasmiques issus de myoblastes DM2 trouve une augmentation dans la fraction cytoplasmique (Salisbury et al., 2009). Enfin, des modèles murins de surexpression de CUGBP1 reproduisent une partie seulement des symptômes observés chez les patients atteints de DM1 (Koshelev et al., 2010; Ward et al., 2010). De même, la surexpression de CUGBP1 *in cellulo* reproduit certaines des altérations de l'épissage alternatif observées chez les patients DM1, dont celle de l'exon 5 de la troponine T cardiaque *TNNT2* (appelé aussi *cTNT*) et celle de l'exon 11 du récepteur à l'insuline *INSR* (Philips et al., 1998; Savkur et al., 2001). Toutefois, plusieurs autres ARN pré-messagers (exon Foetal de *TNNT3*, exon 11 de *BIN1*, exon 20 de *SERCA / ATP2A1*, exon 7a de *CLCN1*, etc.), dont l'épissage alternatif est altéré chez les patients DM, ne sont pas régulés par CUGBP1. De plus, des motifs UGU reconnus par CUGBP1 ne sont pas spécialement retrouvés à proximité des exons altérés chez les patients DM, au contraire des motifs YGC reconnus par les protéines MBNL (Goodwin et al., 2015; Freyermuth et al., 2016). Enfin, les altérations d'épissage observées chez des souris HSA^{LR} exprimant des répétitions CUG sont comparables à plus de 80% aux altérations observées dans des souris knockout pour le gène *Mbnl1*, contrairement aux souris surexprimant CUGBP1 (Osborne et al., 2009; H. Du et al., 2010; Nakamori et al., 2013). Ces résultats suggèrent que l'altération de CUGBP1 ne contribue donc qu'à une partie seulement des altérations moléculaires dans les DM.

I.D.4) Autres protéines impliquées dans la DM

Plusieurs autres protéines de liaison à l'ARN ont été suspectées comme jouant un rôle dans les DM. Ainsi, la protéine hnRNP H1 a été décrite comme associée aux transcrits *DMPK* contenant des expansions de répétitions CUG (Kim et al., 2005). De plus, l'expression de hnRNP H1 serait deux fois plus élevée dans des myoblastes de patients DM comparés à des myoblastes contrôles et pourrait ainsi contribuer à l'altération de l'épissage de l'exon 11 du récepteur à l'insuline *INSR* (Paul et al., 2006). De même, les ARN-hélicases DDX5 (P68) et DDX6 lient les expansions CUG et

pourraient contribuer à ouvrir l'ARN double brin formé par ces répétitions afin de favoriser la liaison des protéines MBNL (Laurent et al., 2012; Pettersson et al., 2014) ou la dégradation de ces ARN (Jones et al., 2015). La protéine RBFOX1 collaborerait avec MBNL1 pour réguler certains événements d'épissage alternatif (Klinck et al., 2014). Enfin, la protéine Staufen1, impliquée dans le métabolisme des ARN, serait augmentée dans des échantillons de muscles de patients DM1 et de souris modèles de la maladie (Ravel-Chapuis et al., 2012). Staufen1 est capable de se lier aux expansions d'ARN CUG *in vitro* et *in vivo*. Cependant, cette interaction serait faible ou dynamique, car la colocalisation de Staufen1 avec les foci d'ARN CUG nucléaires n'a pas été observée (Ravel-Chapuis et al., 2012). La surexpression de Staufen1 améliore l'épissage de l'exon 11 de l'ARN *INSR*, qui est altéré dans la DM1. En effet, Staufen1 reconnaît des séquences répétées au sein de l'intron 10 d'*INSR*, s'y fixe, et empêche le recrutement d'autres facteurs responsables de l'inhibition de l'inclusion de l'exon 11. Cela mène à l'augmentation de l'inclusion de l'exon 11, de manière corrélée avec le taux de surexpression de Staufen1. Ainsi, la surexpression de Staufen1 aurait un effet positif sur l'épissage d'*INSR* et permet même d'inverser les effets négatifs de la titration de MBNL1 (Ravel-Chapuis et al., 2012). Néanmoins, une étude récente montre que la surexpression de Staufen1 peut aussi contribuer à aggraver certains épissages déjà altérés dans la DM1 (Bondy-Chorney et al., 2016). Ainsi, tout comme CUGBP1, la protéine Staufen1 apparaît plutôt comme un modulateur d'une sous-partie des événements d'épissages altérés dans la DM1.

I.E. Causes moléculaires possibles des symptômes

Comme décrit précédemment, l'épissage d'un grand nombre d'ARN est dérégulé dans les tissus de patients DM et les modèles cellulaires ou murins des DM (Philips et al., 1998; Sergeant et al., 2001; Lin et al., 2006; Osborne et al., 2009; H. Du et al., 2010; Fugier et al., 2011; E. Wang et al., 2012; K.-Y. Lee et al., 2013; Nakamori et al., 2013; Freyermuth et al., 2016). Dans la plupart des cas, les ARN affectés vont subir un retour vers une isoforme néonatale qui n'est pas adaptée au tissu adulte. Ces dérégulations d'épissage vont, au final, participer aux symptômes rencontrés dans la maladie. Ainsi, il est possible de relier certaines altérations d'épissage avec un phénotype particulier dans la DM1.

Cela est le cas pour la myotonie, qui correspond à une lenteur anormale du relâchement musculaire après une contraction volontaire ou non. Il a été montré que

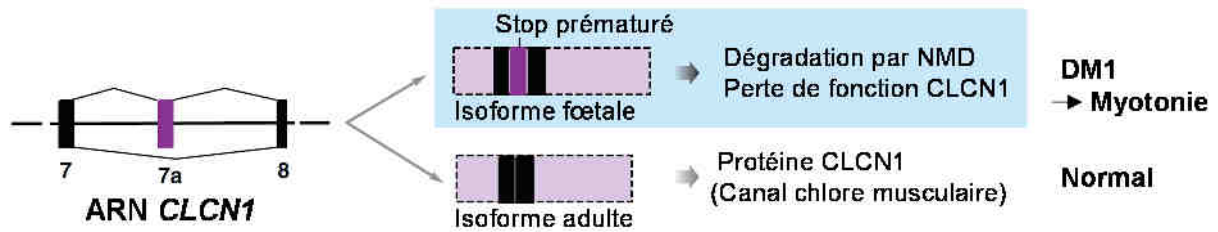


Figure 20 : L'épissage de l'ARN *CLCN1* est altéré dans la DM1 et conduit à la myotonie.

Dans la DM1, la rétention aberrante de l'exon 7a de l'ARN *CLCN1*, mène à l'apparition d'un codon de terminaison (Stop) prématuré (*fond bleu*). Cela va déclencher la dégradation de l'ARNm via le mécanisme NMD (nonsense-mediated mRNA decay) et donc mener à la perte de fonction des canaux chloriques, ce qui cause la myotonie chez les patients (Charlet-B et al., 2002; Mankodi et al., 2002).

Illustration adaptée de Ranum & Cooper, 2006.

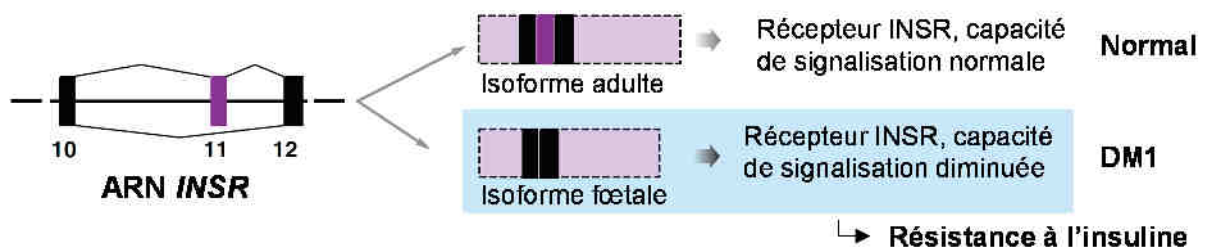


Figure 21 : L'épissage d'*INSR* est dérégulé dans la DM1 et déclencherait la résistance à l'insuline des patients.

La régulation de l'épissage alternatif de l'exon 11 de l'ARN du récepteur à l'insuline INSR est perturbée dans la DM1, menant à l'inclusion aberrante de celui-ci (*fond bleu*), ce qui correspond à un retour vers l'isoforme fœtale de ce récepteur qui possède une capacité de signalisation diminuée. Par conséquent INSR participerait au phénotype de résistance à l'insuline observé chez les patients (Savkur et al., 2001).

Illustration adaptée de Ranum & Cooper, 2006.

la myotonie dans la DM était associée à l'inclusion de l'exon 7a dans l'ARN messenger codant pour le canal chlore musculaire *CLCN1*, menant à l'apparition d'un codon de terminaison prématuré. Cela va déclencher la dégradation de l'ARNm *CLCN1* via le mécanisme NMD (nonsense-mediated mRNA decay) et donc mener à la perte de fonction des canaux chloriques, comme expliqué en **Figure 20** (Charlet-B et al., 2002; Mankodi et al., 2002). En effet, une absence de canal chlore *CLCN1* conduit à une myotonie par hypersensibilisation de la membrane musculaire vis-à-vis des potentiels d'action (Rüdel et al., 1989; Franke et al., 1991). L'épissage de l'exon 7a est directement régulé par la liaison de MBNL1 à l'ARN pré-messenger *CLCN1* (Kino et al., 2009), et cet épissage est altéré dans les souris knockout pour *Mbnl1* et *Mbnl2* (Kanadia, Johnstone, et al., 2003; K.-Y. Lee et al., 2013). De plus, l'expression de MBNL1 dans des souris transgéniques exprimant 250 répétitions CTG (souris HSA^{LR}) permet de corriger les altérations d'épissage de *Cln1* et la myotonie (Kanadia et al., 2006). Enfin, les défauts d'épissage du canal chlore sont la cause probable de la myotonie chez les patients DM car la correction des défauts d'épissage de *CLCN1* par oligonucléotides antisens chez la souris HSA^{LR}, modèle de la DM1, permet de corriger la myotonie (Wheeler et al., 2009).

Un autre exemple est celui du récepteur à l'insuline (INSR), dont l'exon 11 va être exclu dans la DM1, menant à l'expression d'une isoforme de ce récepteur ayant une capacité de signalisation diminuée (**Figure 21**), ce qui contribue probablement à la résistance à l'insuline des patients DM1 (Savkur et al., 2001). L'épissage de cet exon est régulé par MBNL1 et CUGBP1, comme illustré plus haut en **Figure 19** (Savkur et al., 2001). Toutefois d'autres études montrent qu'une dérégulation de MBNL1, et non de CUGBP, est la principale cause de l'altération de l'exon 11 d'*INSR* chez les patients DM (Ho et al., 2004; Dansithong et al., 2005). Il est à noter que la complémentation de cellules musculaires DM avec un récepteur INSR normal n'a pas été testée, il est donc possible que d'autres altérations moléculaires soient impliquées dans la résistance à l'insuline. Ainsi, une altération de l'épissage de l'ARN messenger codant pour la pyruvate kinase musculaire (PKM) pourrait contribuer aux anomalies du métabolisme du glucose dans la DM1 (Gao & Cooper, 2013b).

Concernant les troubles de la conduction et les arythmies cardiaques, ceux-ci pourraient être associés, en partie, à une altération de l'expression du facteur de transcription Nkx2.5 (Yadava et al., 2008), du microARN miR-1 (Rau et al., 2011; Kalsotra et al., 2014), ou d'altérations de l'épissage alternatif spécifiques comme

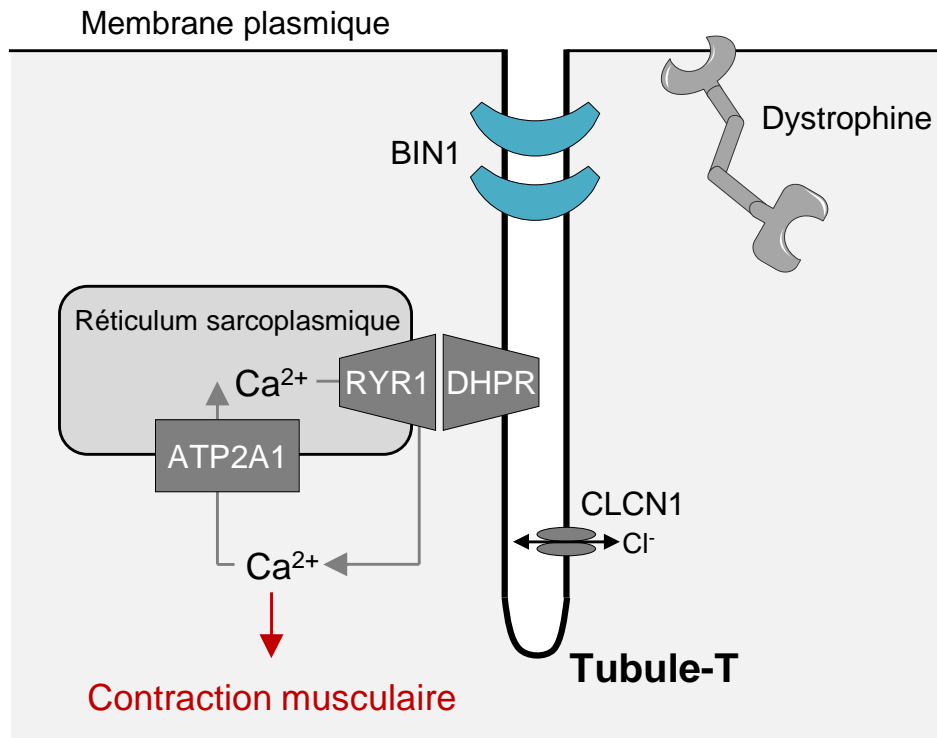


Figure 22 : Schéma représentant les principaux acteurs du couplage excitation / contraction musculaire qui sont altérés dans la DM1.

Les canaux calciques musculaires (RYR1 et DHPR), ainsi que la pompe à calcium ATP2A1, impliqués dans l'homéostasie du calcium au sein du muscle, ont leur épissage altéré dans la DM1. Il en est de même pour BIN1 (*en bleu*) qui a un rôle dans la génération et le maintien des tubules-T. De plus, l'épissage de l'ARN *DMD*, codant pour la dystrophine, une protéine de structure, est aussi dérégulé dans la DM1. Ces différents acteurs sont importants pour une contraction musculaire optimale. Par conséquent, l'altération de l'épissage de ces transcrits participe au phénotype de faiblesse musculaire observé chez les patients DM1. Sur ce schéma apparaît aussi le canal chlore CLCN1, qui est responsable de la repolarisation de la membrane après le potentiel d'action, cela permet de stabiliser l'état de repos musculaire. L'altération de l'épissage de *CLCN1* dans la DM1 conduit à la perte de fonction du canal et à des contractions involontaires du muscle (myotonie). Adapté de Fugier et al., 2011.

l'inclusion anormale de l'exon foetal 6A du canal sodique cardiaque *SCN5A* (Wahbi et al., 2013; Freyermuth et al., 2016) ou de l'exon 5 de la troponine T cardiaque (cTNT ou *TNNT2*) (Philips et al., 1998). Cet exon régule la sensibilité de la troponine T au calcium (Gomes et al., 2004). Toutefois des souris transgéniques exprimant l'exon 5 de *TNNT2* ne reproduisent pas les altérations cardiaques typiques des DM (Feng & Jin, 2010). Au contraire, la reproduction d'une altération de l'épissage du canal sodique *SCN5A* chez la souris, conduit à des retards de la conduction cardiaque similaires à ceux observés chez les patients DM (Freyermuth et al., 2016). Il est à noter que l'épissage de *SCN5A* est régulé par *MBNL1* mais pas par *CUGBP1* (Dixon et al., 2015; Freyermuth et al., 2016), renforçant l'idée que la titration des protéines *MBNL* est le déterminant majeur des altérations d'épissage chez les patients DM.

Pour les troubles cognitifs, l'observation d'agrégats de protéines Tau (*MAPT*) dans le cerveau des patients DM1 (exemple d'agrégat montré en **Figure 7**) pourrait être associée à une exclusion des exons alternatifs 2 et 3 de ce transcrit (Sergeant et al., 2001; Goodwin et al., 2015). L'inclusion de l'exon 2 de *MAPT* est régulée par les protéines *MBNL1* et *MBNL2* (Tran et al., 2011; Carpentier et al., 2014). Toutefois, on ne connaît pas exactement la fonction des exons 2 et 3 de *MAPT*, et leur rôle éventuel dans l'agrégation des protéines Tau dans le cerveau des patients DM reste à définir.

Enfin, concernant la faiblesse musculaire, celle-ci est associée aux altérations de l'épissage de la pompe calcique *SERCA1* (*ATP2A1*) et des canaux calciques musculaires *RYR1* (Kimura et al., 2005) et *CACNA1S* aussi appelé *DHPR* (Tang et al., 2012). *DHPR*, *RYR1* et *SERCA* sont tous trois impliqués dans l'homéostasie calcique et le couplage excitation-contraction (**Figure 22**), suggérant qu'une altération de ces mécanismes soit à l'origine de la faiblesse musculaire observée chez les patients DM (Osborne et al., 2009). De plus, il a récemment été démontré que l'exclusion anormale de l'exon 78 de l'ARNm *DMD*, codant pour la protéine dystrophine, participe à l'altération musculaire des patients DM1. En effet, l'exclusion de cet exon dans la DM1 va modifier la partie C-terminale de la dystrophine et ainsi perturber son activité, contribuant ainsi à l'altération de la taille et de la nature des fibres musculaires chez les patients DM (Rau et al., 2015). Cette découverte est d'un intérêt particulier car la mutation du gène *DMD* est responsable de la myopathie de Duchenne. Enfin, les patients DM présentent une exclusion anormale de l'exon 11 du transcrit de l'amphiphysine 2 (*BIN1*) (Fugier et al., 2011; Nakamori et al., 2013). Des mutations conduisant à la perte de fonction de ce gène sont responsables de myopathies

	Phénotype	Limitations	Conclusion
Modèles knockout			
<i>Dmpk</i> (DM1)	Globalement normal; les plus vieilles souris développent des problèmes d'homéostasie du calcium	Symptômes presque absents	L'haploinsuffisance de <i>Dmpk</i> n'est pas le mécanisme pathologique primaire
<i>Six5</i> (DM1)	Cataractes, fertilité des mâles réduite, problèmes cardiaques	Cataracte cliniquement différente de celle des patients DM	L'haploinsuffisance de <i>Six5</i> n'est pas le mécanisme pathologique primaire
<i>Cnbp</i> (DM2)	Myotonie, myopathie et défauts de conduction cardiaque	Pas d'altération d'épissage observée	L'haploinsuffisance de <i>Cnbp</i> provoque plusieurs symptômes majeurs de la DM2, qui sont annulés après complémentation de <i>Cnbp</i>
<i>Mbnl1</i>	Myotonie, myopathie musculaire et cardiaque, altération de l'épissage	Pas de faiblesse musculaire, niveau d'expression de CELF1 normal	La perte de <i>Mbnl1</i> mène aux aspect majeurs caractérisant la DM1, la dérégulation d'épissage est similaire à celle observée dans les souris HSA ^{LR}
<i>Mbnl2</i>	Myotonie, myopathie, altération de l'épissage	Altérations principalement dans le cerveau	La perte de <i>Mbnl2</i> est responsable de plusieurs aspects spécifiques des DM, la dérégulation d'épissage touche les ARN régulés par les protéines MBNL
<i>Mbnl1 + Mbnl2</i> (spécifique du muscle)	Retard de croissance, myotonie, atrophie musculaire, problèmes locomoteurs, forte dérégulation de l'épissage	Mortalité élevée, problèmes de reproduction	La perte à la fois de <i>Mbnl1</i> et <i>Mbnl2</i> conduit à des phénotypes sévères, caractéristiques de patients CDM1
Modèles de souris transgéniques			
HSA ^{LR}	Myotonie, myopathie, perte musculaire, foci d'ARN CUG qui séquestrent les protéines MBNL, altération de l'épissage	Pas de faiblesse musculaire	L'expression de 250 répétitions CUG mène aux aspect majeurs caractérisant la DM1, la dérégulation d'épissage touche les ARN régulés par les protéines MBNL
ApA960	Myotonie, myopathie, perte musculaire, défauts de conduction cardiaque, foci d'ARN CUG qui séquestrent MBNL1 et stabilisent CELF1, altération de l'épissage	Transgène spécifique du cœur mais présence de phénotypes cardiaques (fuite d'expression)	L'expression de 960 répétitions CUG mène aux aspect majeurs caractérisant la DM1, la dérégulation d'épissage touche les ARN régulés par les protéines MBNL et CELF
DM300 et DMSXL	Myotonie, myopathie, foci d'ARN CUG, altération de l'épissage, agrégation de Tau dans le cerveau	Les altérations d'épissage sont faibles, grande variabilité selon la souris	L'expression de répétitions CUG dans ces modèles provoque de légers phénotypes DM1
GFP-DMPK-(CTG) ⁵	Myotonie, myopathie, défauts de conduction cardiaque, altération de l'épissage	Pas de faiblesse musculaire, pas de foci ARN, nombre de CUG faible, mortalité élevée, la dérégulation d'épissage est faible	L'expression de 5 répétitions CUG cause des phénotypes DM1 sans présence de foci, CELF1 est surexprimé
CUGBP1 (CELF1) surexprimé	Myopathie musculaire et cardiaque, défauts de conduction du cœur, altération de l'épissage	Mortalité élevée, reproduction partielle des symptômes	La surexpression de CELF1 provoque quelques phénotypes de la DM1, les cibles ARN de CELF1 ont leur épissage altéré

Tableau 2 : Phénotypes des différents modèles souris des DM.

Adapté de Wansink & Wieringa, 2003; Gomes-Pereira et al., 2011.

centronucléaires (Nicot et al., 2007; Böhm et al., 2014), dont les caractéristiques histopathologiques sont proches des patients DM (Jungbluth et al., 2008). L'exon 11 de *BIN1* code pour un motif de liaison aux phosphoinositides et son absence conduit à des défauts de tubulation des membranes musculaires (E. Lee et al., 2002; Fugier et al., 2011). Ce défaut pourrait être associé aux altérations des tubules-T observées dans les muscles squelettiques des patients DM (Schröder & Adams, 1968; Mussini et al., 1970; Ueda et al., 1999). Toutefois, des souris reproduisant l'exclusion de l'exon 11 de *Bin1* ne montrent qu'une perte de force limitée et peu d'atrophie musculaire (Fugier et al., 2011). Les altérations d'épissage de *BIN1* en relation avec les DM étant le sujet de ma thèse, elles seront abordées plus en détails dans le **chapitre II.D.3**).

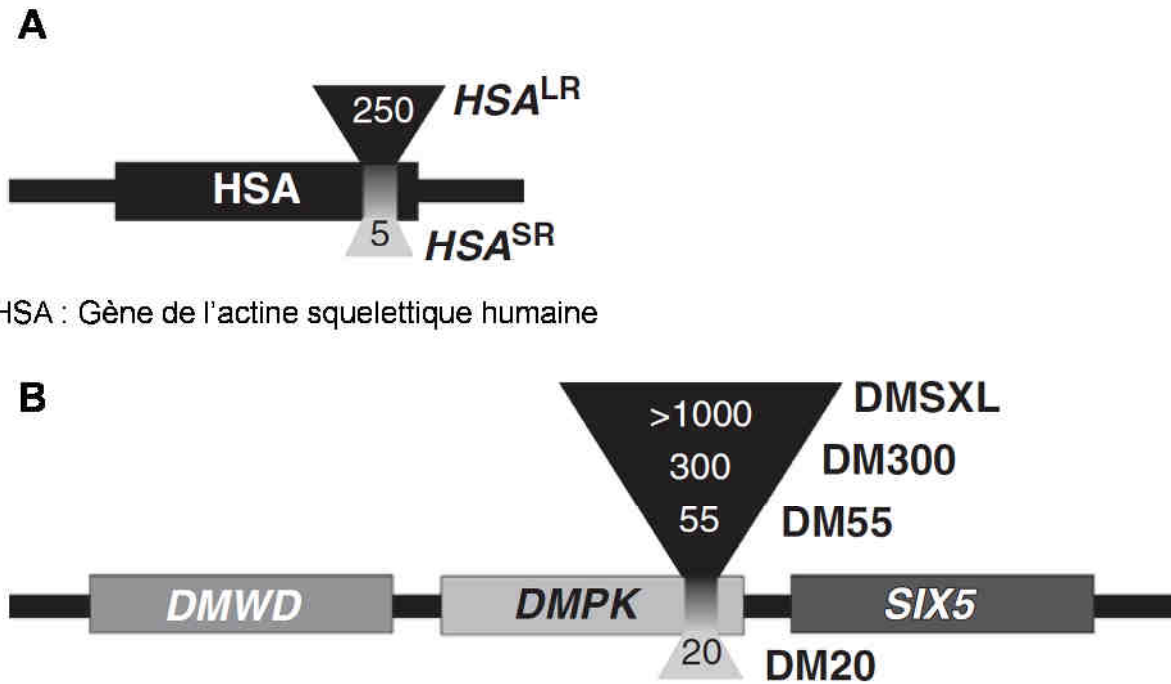
En conclusion, malgré ces avancées significatives, il reste de nombreux points à clarifier, dont les mécanismes moléculaires conduisant à la faiblesse et à l'atrophie musculaire dont souffrent les patients DM1.

I.F. Modèles animaux de la maladie

Depuis la découverte de la mutation responsable de la DM1, plusieurs modèles animaux ont été générés pour cette maladie. En effet, l'étude de tels modèles est précieuse pour la compréhension du mécanisme pathologique ainsi que, dans certains cas, la mise au point de thérapies. Comme il n'existe pas encore à ce jour de modèle pour la DM2, nous porterons donc notre attention sur les modèles DM1 (**Tableau 2**).

I.F.1) Modèles de « première génération »

Le développement de souris de première génération a été entrepris pour étudier l'implication des produits des gènes *DMPK* et *SIX5* dans la maladie. En effet, chez les patients DM1, l'ARN de l'allèle *DMPK* portant les expansions de répétitions CUG est retenu dans le noyau et n'est donc pas traduit en protéine, conduisant ainsi à une haploinsuffisance de *DMPK*. Concernant le gène *SIX5*, localisé en aval du gène *DMPK*, les répétitions CTG situées dans la région 3'UTR de *DMPK* sont proches du promoteur de *SIX5* et ont un effet négatif sur l'expression de celui-ci. Cet effet inhibiteur sur l'expression de *SIX5* dépend de la taille des répétitions CTG, conduisant à une diminution de *SIX5* plus marquée chez les patients CDM1 que DM1 adultes. Ainsi dans la maladie, on observe une diminution de l'expression des ARN messagers *SIX5* et *DMPK*. De ce fait, des souris invalidées, soit pour *Dmpk* (KO *Dmpk*), soit pour *Six5* (KO *Six5*) ont été générées. Les souris KO *Dmpk* ne développent qu'une légère



HSA : Gène de l'actine squelettique humaine

Figure 23 : Transgènes utilisés pour les souris modèles HSA^{LR} et DM300/DMSXL.

(A) Structure du transgène de la souris HSA^{LR} exprimant 250 répétitions CUG insérées au sein du gène de l'actine humaine. (B) Fragment de séquence génomique humain contenant le gène *DMPK* avec des tailles variables de répétitions ainsi que les gènes voisins *DMWD* (Dystrophia Myotonica WD repeat-containing protein) et *SIX5* (Sine oculis homeobox homolog 5). Ce fragment a été utilisé pour mettre au point les souris DM300 (300 répétitions) et DMSXL portant plus de 1000 répétitions.

Adapté de Gomes-Pereira et al., 2011.

myopathie et une faible arythmie du cœur (Jansen et al., 1996; Reddy et al., 1996). Toutefois, ces résultats sont contestés par une étude récente qui montre que la délétion de *Dmpk* chez la souris n'entraîne pas d'atteinte musculaire ou cardiaque notable. Ainsi, les différences observées entre ces études peuvent être imputées au fond génétique utilisé et/ou à la méthode d'anesthésie de ces souris (Carrell et al., 2016). De même, les souris KO *Six5*, ne montrent qu'un taux plus élevé de cataractes oculaires que les souris sauvages, et ces souris ne développent aucun phénotype musculaire. De plus, la cataracte de ces souris était de type cliniquement différent de celle observée chez les patients DM1 (Sarkar et al., 2000).

En conclusion, ces premiers modèles animaux montrent que la perte d'expression de *DMPK* et/ou de *SIX5* a peu ou pas de conséquence dans la DM1. Ainsi, le mécanisme pathologique serait majoritairement expliqué par la toxicité des répétitions CUG et la séquestration de MBNL1, comme démontré par une « deuxième » génération de modèles murins.

I.F.2) Modèles de « deuxième génération »

- **Souris *HSA^{LR}***

Plusieurs modèles de souris, avec des tailles variables de répétitions CTG ont d'abord été créés. Cependant, toutes les souris qui portaient un faible nombre de CUG ont échouées à récapituler la maladie. Le premier modèle murin à montrer des signes pathologiques similaires aux patients DM1 a été mis au point à l'aide d'un transgène exprimant 250 répétitions CUG insérées au sein du gène de l'actine humaine, qui est exprimée spécifiquement dans le muscle squelettique (*HSA^{LR}* ; **Figure 23A**; Mankodi et al., 2000). Ces souris développent une myotonie légère et une augmentation de la fréquence des noyaux centraux, ainsi que des fibres de taille variables, en l'absence de nécrose. De plus, la présence de foci d'ARN CUG dans les noyaux des fibres musculaires a été confirmée, montrant que les répétitions CTG sont transcrites et s'agrègent. Certains marqueurs moléculaires de la maladie ont leur épissage qui est altéré, tels que *Cln1*, *Atp2a1* et *Tnnt3*. Cependant, ces souris ne montrent pas de perte musculaire, ni de faiblesse importante, ce qui rend ce modèle proche mais incomplet pour récapituler la DM1 (Mankodi et al., 2000). Il est à noter que des souris portant 250 répétitions CTG, qui ne sont pas transcrites, ne développent ni phénotypes, ni altérations d'épissage, établissant ainsi que la transcription des répétitions CTG en ARN « pathogénique » est essentiel pour le développement des

DM (Mankodi et al., 2000). De façon intéressante, la réexpression de MBNL1 à l'aide de virus adéno-associé (AAV) dans le muscle tibialis anterior (TA) de ces souris HSA^{LR}, permet d'améliorer la myotonie et les altérations d'épissage. Ces résultats montrent que la DM est probablement causée par un défaut fonctionnel de MBNL1, puisque la saturation des expansions ARN en surexprimant cette protéine mène à la correction du phénotype (Kanadia et al., 2006). Cependant, cette amélioration est transitoire car la myotonie et les altérations d'épissage réapparaissent 43 semaines après l'injection. De plus, certaines anomalies morphologiques du muscle, tels que les noyaux centraux, étaient toujours présentes, même après l'injection d'AAV-MBNL1, indiquant que certaines altérations sont indépendantes de MBNL1, ou ne peuvent être rétablies.

- **Souris DM300 et DMSXL**

Une alternative plus physiologique au modèle HSA^{LR} a été élaborée en utilisant un fragment de séquence génomique contenant l'ensemble du gène *DMPK* humain avec une expansion de répétitions CTG dérivée d'un patient DM1. Cette approche a été réalisée afin d'étudier le gène *DMPK* sous le contrôle de son promoteur et de ses éléments régulateurs endogènes (**Figure 23B**, page précédente). Les premières souris générées avec cette stratégie portaient une expansion de 55 répétitions CTG clonées à partir d'un patient DM1 affecté modérément. Cependant, comme avancé précédemment, les souris avec de courtes répétitions ne développent pas ou peu de phénotype. Cela était le cas pour ces souris, même si certaines lignées possédaient jusqu'à 4 copies du transgène, démultipliant l'expression des répétitions. Il a cependant été observé une instabilité modérée des répétitions CTG au cours des générations (Gourdon et al., 1997). Par la suite, une plus grande expansion de répétitions a été clonée pour obtenir au final une lignée de souris portant plus de 300 répétitions CTG (DM300). Ces souris présentent une instabilité des répétitions entre les générations, qui est dépendante de l'âge des parents (Seznec et al., 2000). Cette lignée montre aussi des caractéristiques typiques de la DM1 telles que des anomalies histologiques du muscle (noyaux centraux) ainsi qu'une myotonie. De plus, c'était la première lignée à développer des altérations dans le cerveau (Seznec et al., 2001). L'instabilité génétique a été utilisée afin de produire des souris transgéniques qui portaient plus de 1000 répétitions CTG (DMSXL ; Gomes-Pereira et al., 2007). Au niveau du phénotype, ces souris sont plus petites que des souris sauvages du même âge, mais ne développent qu'une faible myotonie et des altérations de l'épissage

limitées. Il a été avancé que l'expression du transgène était trop faible pour avoir un effet pathologique, bien que des foci nucléaires aient été observées dans les fibres musculaires. Il est aussi possible que la longue expansion de CTG ait un effet sur l'hétérochromatinisation de l'ADN, ce qui engendrerait une inhibition de l'expression du transgène (Huguet et al., 2012). De plus, l'insertion du transgène étant aléatoire il est possible que les longues répétitions CTG dans les souris DMSXL inhibent l'expression des gènes voisins, tout comme les répétitions CTG au sein du gène *DMPK* inhibent l'expression de *SIX5* chez les patients DM.

- **Souris inductibles pour les répétitions CTG**

Les modèles HSA^{LR} et DM300 ont établi que l'apparition de certains symptômes et altérations d'épissage caractéristiques des DM est directement liée à l'expression des répétitions CUG en ARN (Mankodi et al., 2000 ; Seznec et al., 2000). Toutefois, il restait à déterminer si ces altérations pouvaient être réversibles. Ainsi, il a été généré des modèles de souris exprimant soit 5 ou 200 répétitions CUG sous un promoteur inductible à la doxycycline (Mahadevan et al., 2006). De façon surprenante, les souris avec 200 répétitions CTG présentent peu de phénotype, sans doute à cause d'une expression faible du transgène. Au contraire, les souris avec 5 répétitions CTG présentent, dès l'âge d'un mois, une myotonie, une altération des fibres musculaires, des troubles de la conduction et du rythme cardiaque, une augmentation de la protéine CUGBP1 et des altérations d'épissage (Mahadevan et al., 2006). De façon intéressante, l'arrêt de l'induction du transgène conduit à une correction de ces phénotypes et altérations moléculaires, démontrant ainsi la réversibilité des symptômes de la dystrophie myotonique (Mahadevan et al., 2006). De plus, ce modèle de souris exprimant seulement 5 répétitions CTG suggère que la taille des répétitions n'est pas primordiale si une quantité suffisante d'ARN est exprimé. Toutefois, il est à noter que le site d'insertion du transgène avec 5 répétitions n'est pas connue et qu'un effet délétère de l'insertion n'est pas exclu.

Un deuxième modèle de souris inductible, mais non réversible, a aussi été généré (souris EpA960). Ces souris expriment 960 répétitions CUG interrompues, sous le contrôle d'une cassette stop flanquée de sites de recombinaison LoxP (**Figure 24**, page suivante). Ainsi, dans des souris bigéniques 960 CTG : Cre-ERT², l'expression des répétitions CUG peut être induite par injection de tamoxifène qui va déclencher l'expression de la recombinase Cre, celle-ci va alors exciser la cassette

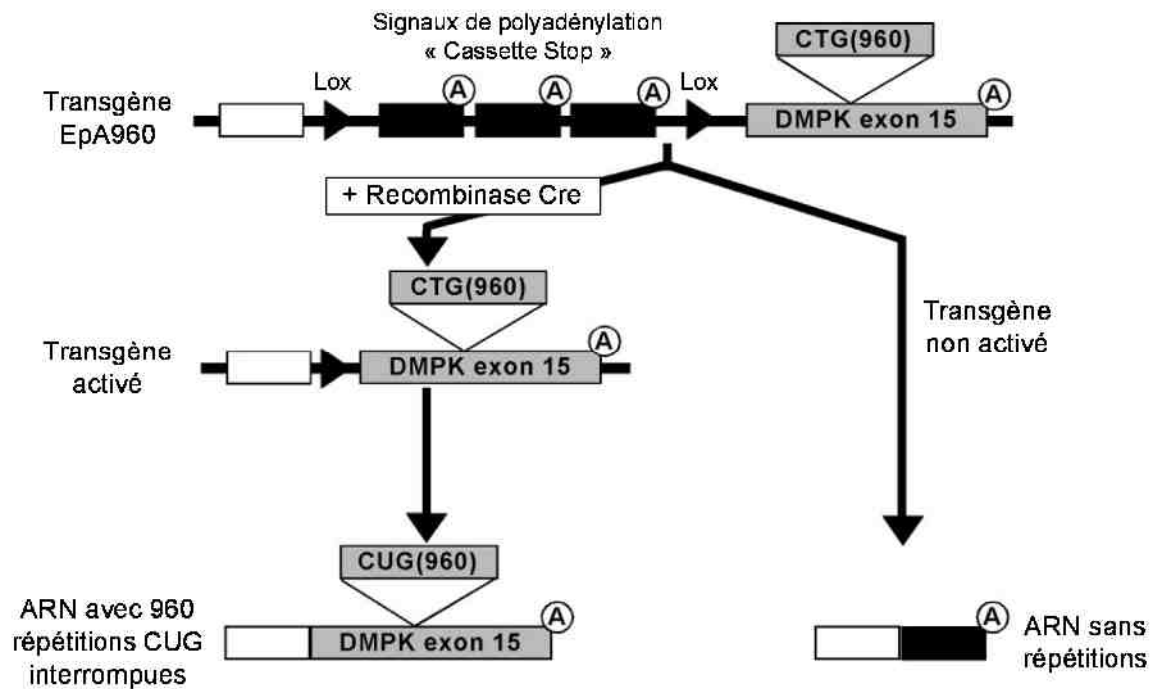


Figure 24 : Structure du transgène utilisé pour les souris EpA960.

L'expression des répétitions CTG est empêchée par la présence de trois signaux de polyadénylation successifs, constituant une « cassette stop ». Celle-ci est entourée de deux sites LoxP qui sont reconnus par la recombinaison Cre lorsqu'elle est disponible. La recombinaison permet ainsi d'enlever cette cassette Stop. De plus, l'expression de la recombinaison Cre est contrôlée par injection de tamoxifène, ce qui permet de déclencher l'expression de répétitions à un temps donné. D'après Orengo et al., 2008.

stop qui inhibait l'expression des répétitions CTG. Toutefois, dans ce modèle, l'expression des répétitions n'est pas réversible car dépendante d'une excision d'un élément régulateur négatif dans le génome. L'expression de 960 répétitions CTG interrompues conduit à une forte dystrophie musculaire, une cardiomyopathie et une dilatation sévère du cœur, une augmentation de la protéine CUGBP1, des altérations de l'épissage alternatif et une mort des animaux entre 2 et 6 semaines après injection du tamoxifène (G.-S. Wang et al., 2007; Orengo et al., 2008). Le phénotype est donc sévère dans ces souris, ce qui peut être dû au niveau élevé d'expression du transgène, mais aussi aux séquences interrompant les répétitions CTG, qui pourraient entraîner une toxicité accrue.

Ces modèles de souris exprimant des répétitions CUG ont donc permis de démontrer que la seule expression d'ARN contenant des répétitions CUG suffisait à induire un phénotype et des altérations moléculaires caractéristiques des dystrophies myotoniques. Il est important de noter que ces résultats sur des animaux transgéniques se sont trouvés confortés par des données de génétique humaine (Liquori et al., 2001). En effet, des répétitions CCTG dans le gène *CNBP* ont été découvertes comme étant responsables de la dystrophie myotonique de type 2, maladie semblable, quoique plus légère que la DM1. Cela a définitivement prouvé que les répétitions C/CTG et non le contexte génétique (*DMPK* ou *CNBP*) sont responsables des DM. Ces observations ont conduit à la création d'un troisième type de modèle murin, dirigé cette fois sur les protéines responsables de l'effet toxique des répétitions CUG, c'est-à-dire, soit les protéines de la famille MBNL, soit CUGBP1.

- ***Souris invalidées pour les gènes Mbn1***

En considérant que la protéine MBNL1 est importante pour comprendre les mécanismes à l'origine des DM, une approche pour réaliser un modèle DM1 serait donc d'invalider le gène *Mbn1* chez la souris. Cela afin de reproduire la perte de cette protéine, comme c'est le cas lorsqu'elle est titrée par les répétitions CUG. Un modèle basé sur l'élimination de l'exon 3 du gène *Mbn1*, menant à l'invalidation de celui-ci, reproduit les problèmes musculaires, tels que la myotonie et la présence de noyaux centraux, ainsi que les altérations d'épissage caractéristiques des DM (Kanadia, Johnstone, et al., 2003; Lin et al., 2006). De plus, ces souris possédaient une cataracte oculaire en « arbre de Noël », qui est un signe distinctif de la DM1. Par contre, l'atrophie et la faiblesse musculaire ne sont pas, ou très peu reproduites chez ces souris

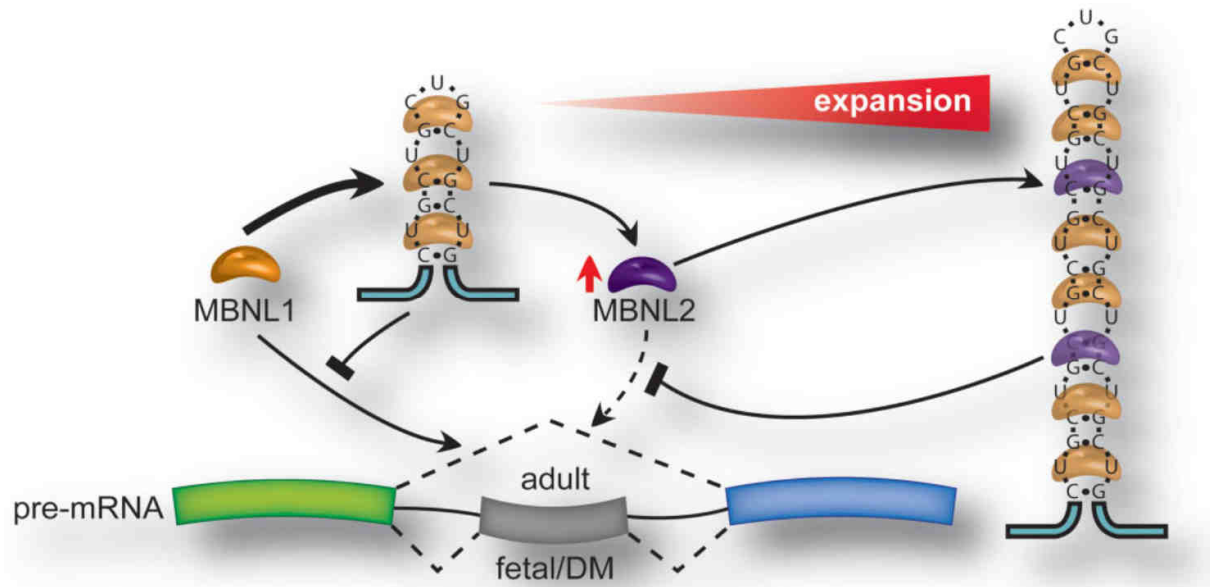


Figure 25 : Modèle de la déplétion des protéines MBNL par les répétitions CUG.

Les expansions de répétitions CUG séquestrent la protéine MBNL1 dans la DM1 et chez les souris modèles de cette maladie (qui expriment des répétitions). Dans le muscle, MBNL1 est le principal facteur qui assure la transition des épissages du stade foetal à adulte. Cependant la séquestration de cette protéine (ou sa déplétion chez la souris KO *Mbnl1*) va mener à la dérégulation de ces épissages, ainsi qu'à l'augmentation de l'expression de MBNL2 qui va avoir un effet compensatoire. Néanmoins si la longueur des répétitions CUG augmente, MBNL2 va à son tour être séquestrée, ce qui mène au retour des altérations d'épissage.

Illustration issue de K.-Y. Lee et al., 2013.

(Kanadia, Johnstone, et al., 2003). Toutefois, la famille de protéines MBNL comporte trois membres différents, MBNL1 est plus abondant dans les muscles et le cœur, MBNL2 est essentiellement exprimée dans le cœur et le cerveau, alors que MBNL3 est présent essentiellement dans le placenta et dans le muscle squelettique lors du développement (Miller et al., 2000; Kanadia, Urbinati, et al., 2003). Le knock-out du gène *Mbnl2* chez la souris entraîne des problèmes cognitifs, du sommeil et des altérations d'épissage caractéristiques des DM, ce qui est consistant avec l'expression de *Mbnl2* dans le cerveau (Charizanis et al., 2012). La perte du gène *Mbnl3* entraîne, elle, des problèmes de régénération du muscle squelettique, sans doute causés par la perte d'expression de *Mbnl3* dans les cellules satellites musculaires (Poulos et al., 2013). De plus, sachant que les protéines *Mbnl1* et 2 reconnaissent le même motif ARN de type YGC, il est possible que la protéine *Mbnl2* puisse compenser et remplacer fonctionnellement *Mbnl1*. Cela est en effet le cas chez les souris KO *Mbnl1*, où il a été observé une augmentation de *Mbnl2*, à la fois au niveau ARN et protéique (**Figure 25**; K.-Y. Lee et al., 2013). Ainsi, il a été entrepris d'invalider à la fois les deux gènes *Mbnl1* et *Mbnl2*. Cependant, la double invalidation de ces gènes entraîne la mort embryonnaire des souris (K.-Y. Lee et al., 2013). La double délétion a finalement été rendue possible grâce à l'invalidation conditionnelle de *Mbnl2* uniquement dans le muscle squelettique, à l'aide d'une recombinase Myo-Cre (souris *Mbnl1*^{-/-}; *Mbnl2*^{flox} : Myo-Cre, dite double knock-out « DKO »). Ces souris DKO sont plus petites à la naissance, développent une myotonie, des problèmes locomoteurs et une déformation de la colonne vertébrale (cyphose), en plus d'une forte atrophie musculaire ainsi que de nombreuses et importantes dérégulations de l'épissage alternatif. La perte complète des protéines *Mbnl* dans le muscle exacerbe donc le phénotype musculaire et aggrave les défauts d'épissages, notamment de *Bin1* (K.-Y. Lee et al., 2013). Ces résultats suggèrent aussi que la seule perte de *Mbnl1* reproduit une forme adulte de la DM1, alors que la perte simultanée de *Mbnl1* et *Mbnl2* mime une forme plus sévère, comme les formes infantiles ou congénitales de la maladie. Enfin, des études de transcriptomique montrent que plus de 80% des défauts d'épissage observés dans le modèle murin HSA^{LR} (250 répétitions CTG) sont présents dans la souris invalidée pour *Mbnl1* (H. Du et al., 2010; Nakamori et al., 2013). Ainsi, ces résultats supportent le modèle de la titration et séquestration de *Mbnl1* conduisant à une perte de sa fonction de régulateur d'épissage.

- **Souris surexprimant CUGBP1**

L'expression de la protéine CUGBP1 étant augmenté dans des échantillons de coeur de patients DM (Kuyumcu-Martinez et al., 2007), des modèles murins surexprimant cette protéine ont été générés. La surexpression de CUGBP1 est toxique, avec des animaux développant une dystrophie musculaire sévère et précoce, une forte cardiomyopathie dilatée, et des altérations de l'épissage alternatif (Koshelev et al., 2010; Ward et al., 2010). Toutefois, ces modèles ne reproduisent que partiellement les symptômes observés chez les patients atteints de DM1. En effet, chez ces malades DM1, la dilatation cardiaque est relativement rare et les altérations musculaires sont caractérisées par une atrophie en absence de cycle de dégradation / régénération, au contraire des souris surexprimant CUGBP1 (Koshelev et al., 2010; Ward et al., 2010). De même, les altérations d'épissage observées chez ces souris ne reproduisent que très partiellement celles observées dans les souris HSA^{LR} ou chez les patients DM (Kim et al., 2005). Enfin, la myotonie, ainsi que l'altération de l'épissage du canal chlore *Clcn1* sont absentes chez ces souris. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de CUGBP1, bien que toxique, ne pourrait contribuer qu'à une sous-partie des altérations moléculaires et phénotypiques des DM.

I.G. Traitement et essais thérapeutiques de la DM1

A ce jour, il n'existe pas de traitement curatif des DM. Seule une prise en charge symptomatique est proposée aux patients afin d'améliorer leur qualité de vie. Cependant, les efforts de compréhension des mécanismes responsables de ces maladies, ainsi que le développement de modèles cellulaires et animaux, ont permis d'envisager des stratégies thérapeutiques. En effet, il a été montré qu'il était possible d'inverser les symptômes des DM en diminuant l'expression des répétitions CTG (Mahadevan et al., 2006). De même, une correction phénotypique a été observée après surexpression de MBNL1 chez des souris HSA^{LR} exprimant des répétitions CUG (Kanadia et al., 2006). Ces observations suggèrent donc que les dystrophies myotoniques puissent être soignées, et laisse envisager plusieurs stratégies thérapeutiques possibles : la surexpression de MBNL1, la dégradation des expansions d'ARN toxiques, et la prévention d'une liaison aberrante de MBNL1 aux répétitions CUG ou CCUG (pour revue Du & Gatti, 2009; Mulders et al., 2010; Klein et al., 2015).

I.G.1) Thérapie à base de molécules pharmacologiques

Le repositionnement de molécules pharmacologiques déjà utilisées en thérapie humaine est une stratégie particulièrement attractive et rapide pour les maladies rares. Ainsi, plusieurs criblages de molécules potentiellement actives ont été réalisés, conduisant à l'identification de composés pouvant inhiber la liaison de MBNL1 aux répétitions CUG. Par exemple, la pentamidine (**Figure 26**, en page suivante), un médicament anti-parasitaire, inhibe la transcription de longues expansions CTG (Warf et al., 2009; Coonrod et al., 2013). Son effet a tout d'abord été évalué sur des cellules en culture transfectées avec un vecteur exprimant 960 répétitions CUG, et sur des minigènes de *TNNT2* ou *INSR*. Le traitement de ces cellules avec la pentamidine diminue l'expression des répétitions CUG et restaure un épissage normal des minigènes de façon dose-dépendante. Enfin, l'injection journalière de pentamidine à des souris HSA^{LR}, engendre l'amélioration des épissages endogènes de *Cln1* et *Atp2a1*, de façon dose dépendante. Néanmoins, lorsque le traitement est stoppé, l'épissage de ces souris redevient altéré, indiquant que la pentamidine n'est pas capable de corriger l'épissage alternatif de manière prolongée. De plus, la dose de pentamidine utilisée lors de ces expériences est relativement toxique pour les cellules et les souris (Warf et al., 2009; Coonrod et al., 2013). De ce fait, il est nécessaire de mettre au point des composés analogues, dérivés de la pentamidine, afin de réduire sa toxicité et de prolonger son action, comme la furamidine, dont la structure chimique est présentée en **Figure 26**, ci-après (Siboni, Bodner, et al., 2015).

De même l'actinomycine D (**Figure 27**, en page suivante) permet de diminuer l'expression des répétitions CUG et de corriger les anomalies d'épissage dans des souris HSA^{LR} traitées (Siboni, Nakamori, et al., 2015). Toutefois, là aussi se pose la question de la toxicité de l'actinomycine D, un inhibiteur général de la transcription.



Figure 26 : Structures chimiques de la pentamidine et de la furamidine.

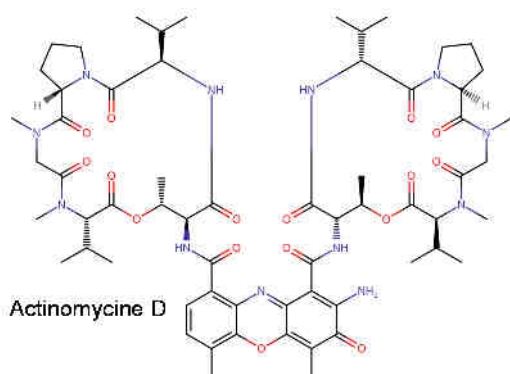


Figure 27 : Structure chimique de l'Actinomycine D.

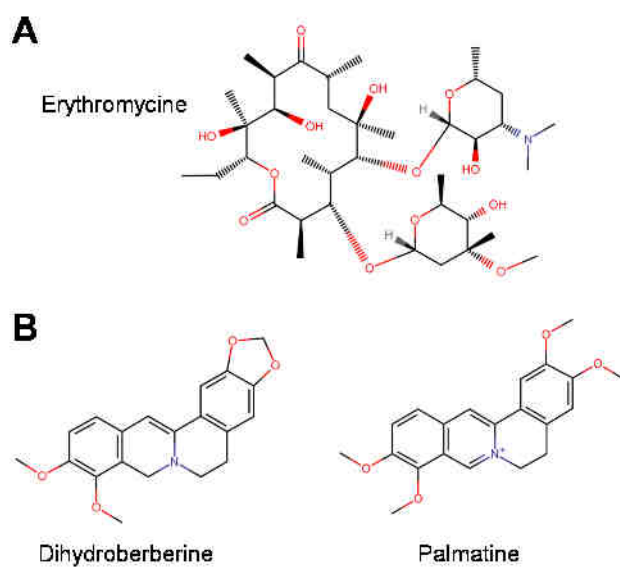


Figure 28 : Structure chimique de composés testés pour le traitement de la DM1.

Ce problème de toxicité a été surmonté pour une autre molécule, l'érythromycine (**Figure 28A**), qui est un antibiotique déjà utilisé et approuvé chez l'Homme (Nakamori et al., 2016). Ce composé est capable de reconnaître la structure particulière adoptée par les répétitions CUG, de s'y fixer, pour ainsi libérer la protéine MBNL1. Ce médicament montrait des effets positifs sur l'épissage des souris HSA^{LR} lors d'une administration par voie orale à dose standard (Nakamori et al., 2016). Ainsi l'érythromycine pourrait être utilisée seule, ou en combinaison d'une approche avec des oligonucléotides antisens afin de potentialiser son effet. Cependant, l'utilisation de ce composé pour les patients devra être faite avec précaution, car un de ses effets secondaires est l'altération de la conduction cardiaque, qui est déjà affectée chez les patients DM.

Outre les molécules pharmaceutiques déjà utilisées en thérapie, plusieurs études se sont aussi attachées à identifier des composés chimiques capables de lier spécifiquement les répétitions CUG et ainsi inhiber la liaison et la séquestration de MBNL1. Bien que ces molécules aient été testées sur des modèles cellulaires, de drosophile et / ou de souris, un important travail d'admissibilité et de toxicologie de ces diverses molécules reste à mener (Childs-Disney et al., 2012, 2013; Jahromi et al., 2013; Hoskins et al., 2014; Nguyen et al., 2015; Rzuczek et al., 2015).

Enfin, une autre approche pour la découverte d'un principe actif contre la DM1 a été de cribler des composés naturels. Cette méthode a permis d'identifier plusieurs molécules alcaloïdes nommées dihydroberberine, palmatine et harmine, qui lient les ARN double brin en s'intercalant entre les bases (**Figure 28B** ; Herrendorff et al., 2016). Le traitement de cellules DM1 en culture avec ces composés diminue le nombre de foci nucléaires et améliore les altérations d'épissage. De plus, l'épissage des souris HSA^{LR} est aussi amélioré après traitement, cependant, l'histologie des muscles reste inchangée (Herrendorff et al., 2016). Cette étude a aussi souligné des problèmes de spécificité de ces molécules, car certains composés, lors d'une utilisation à forte dose, aggravent l'épissage, déjà altéré, dans les cellules de patients DM1. Cela peut s'expliquer par la reconnaissance des sites de liaison naturels de MBNL1 sur les ARN pré-messagers, au lieu des expansions CUG toxiques. Enfin, ces composés restent toxiques et montrent de nombreux effets secondaires, ils ne peuvent donc pas être utilisés tels quels pour une thérapie. Une approche d'optimisation chimique devra donc être envisagée pour tenter de diminuer la toxicité et les effets indésirables de ces molécules (Herrendorff et al., 2016).

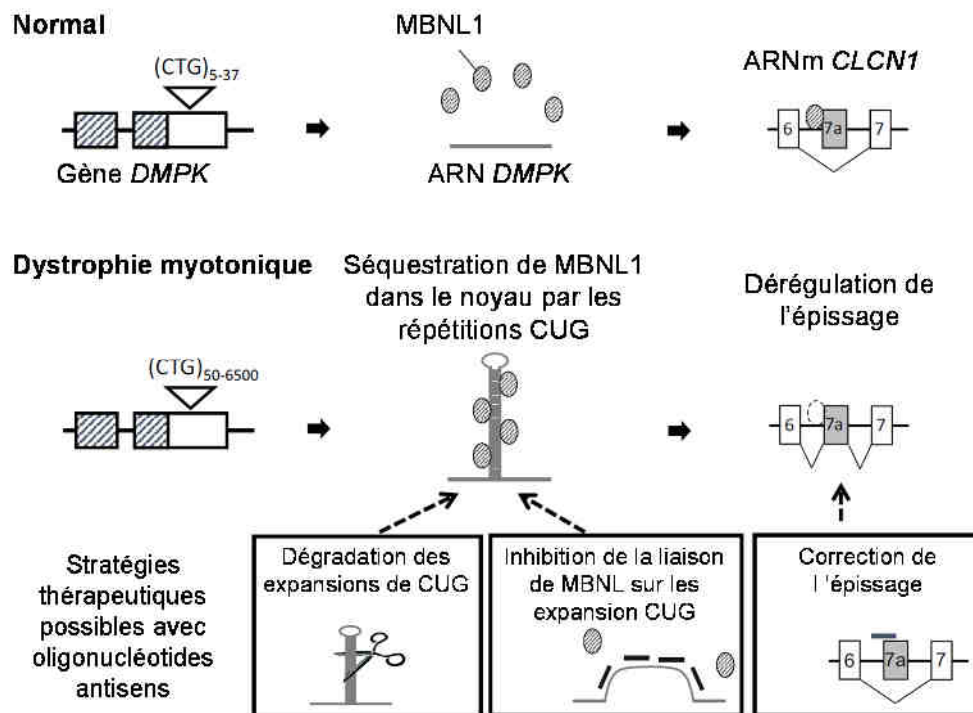


Figure 29 : Les différentes approches thérapeutiques possibles en utilisant des oligonucléotides antisens (ASO) dans la DM1.

Dans la DM1, le gène *DMPK* qui porte un grand nombre de répétitions CTG est transcrit en un ARN toxique qui va séquestrer les facteurs d'épissages tels que MBNL1 menant à la dérégulation de l'épissage de nombreux ARNm comme par exemple *CLCN1*. Pour lutter contre cette maladie à l'aide d'ASO, plusieurs approches sont possibles (voir explication dans les parties correspondantes de l'introduction).

Illustration issue de Takahashi et al., 2014.

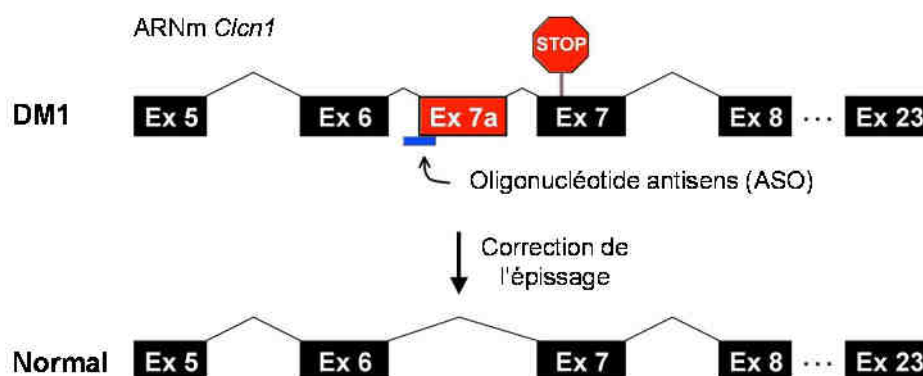


Figure 30 : Correction de l'épissage de *Clcn1* à l'aide d'un ASO.

L'utilisation d'ASO permet d'exclure l'exon 7a, rétablissant ainsi le cadre de lecture et évitant l'apparition d'un codon d'arrêt prématuré dans l'ARN *Clcn1* codant pour le canal Chlore. Adapté de Wheeler et al., 2007.

I.G.2) Thérapie utilisant des oligonucléotides antisens

Comme vu dans le paragraphe précédent, des molécules pharmacologiques ou des substances naturelles liant les ARN CUG peuvent présenter des problèmes de spécificité et de toxicité. Cette question de la spécificité vis-à-vis des répétitions CUG pourrait trouver idéalement une solution via la complémentarité naturelle entre des acides nucléiques modifiés et l'ARN *DMPK* contenant les répétitions CTG. En effet, des progrès constants lors de ces dix dernières années ont permis l'émergence de molécules d'acides nucléiques modifiés assurant une stabilité et une admissibilité suffisante pour envisager des stratégies thérapeutiques (revue dans L. Du & Gatti, 2009; Gao & Cooper, 2013; Klein et al., 2015).

Les différentes approches basées sur des oligonucléotides antisens (ASO) ont pour objectif, soit d'inhiber la fixation et la séquestration des protéines MBNL1 sur les répétitions CUG, soit de promouvoir la dégradation du transcrit *DMPK* muté, ou encore de corriger les altérations d'épissage (**Figure 29**).

- **Correction des altérations d'épissage**

Puisque la DM1 est causée par des défauts d'épissage, la correction de ces altérations permettrait d'améliorer les symptômes qui en découlent. Une preuve de concept a été réalisée chez la souris HSA^{LR}, avec l'utilisation d'un ASO qui cible l'exon 7a de l'ARN *Clcn1*, qui est anormalement inclus dans la maladie (Wheeler et al., 2007). Cet ASO s'hybride au site 3' d'épissage de cet exon et bloque l'accès aux facteurs d'épissage, ce qui va provoquer l'exclusion de celui-ci et donc la synthèse d'un ARN messager et d'une protéine *Clcn1* normale (**Figure 30**). De ce fait, les souris HSA^{LR} traitées avec cet ASO présentent une expression normale du canal chlore et une correction de leur myotonie. De plus, cette étude a montré que cette correction d'épissage était efficace et durable dans le temps (Wheeler et al., 2007). Cependant l'épissage de nombreux ARN messagers (*CLCN1*, *BIN1*, *RYR1*, *CACNA1S*, *SCN5A*, *DMD*, etc.) est altéré dans la DM, et il semble donc compliqué de rétablir chaque épissage individuellement.

- **Blocage de l'interaction entre MBNL1 et les répétitions**

Une autre approche pour contrecarrer la toxicité des expansions de CUG, est d'empêcher la fixation des protéines MBNL sur ces répétitions. Ainsi, MBNL1 et

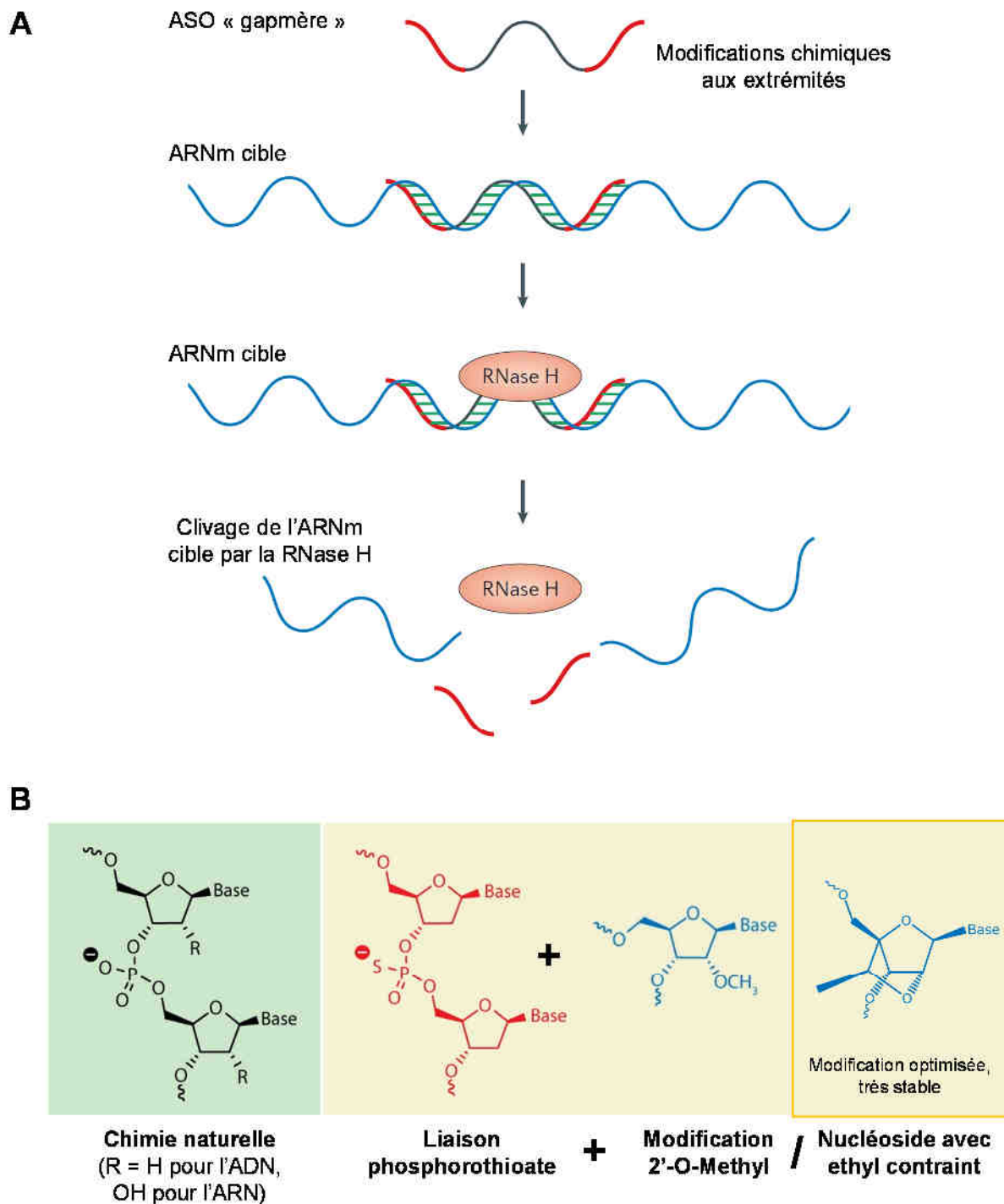


Figure 31 : Modifications chimiques et mécanisme des ASO « gapmères ».

(A) Mécanisme d'action des ASO sur un ARNm cible. (B) Présentation de la structure chimique d'un nucléotide normal ou avec liaison modifiée de type phosphorothioate et des modifications chimiques 2'-O-Methyl et ethyl contraint (constrained ethyl en Anglais). Ces modifications permettent la stabilisation des ASO. Adapté de Bennett & Swayze, 2010; Kole et al., 2012.

MBNL2 seront libérées et seront donc à nouveau disponibles pour effectuer leur activité biologique normale. Dans ce cas précis, les ASO ne vont pas induire le clivage de l'ARN ciblé et peuvent porter des modifications chimiques sur toute leur longueur, afin d'augmenter leur stabilité et potentiellement leur pénétration dans la cellule. L'effet d'un tel ASO ciblant directement les répétitions CUG a été évalué en utilisant le modèle de souris HSA^{LR} (Wheeler et al., 2009). L'injection de cet ASO conduit à une diminution des foci d'ARN CUG, à une redistribution de MBNL1 et à une normalisation des altérations de l'épissage. Enfin, la myotonie de ces souris HSA^{LR} injectées est grandement diminuée (Wheeler et al., 2009). Cette preuve de concept a, par la suite, été confortée par d'autres études utilisant des modifications chimiques différentes mais basées sur le même principe d'inhibition de la fixation de MBNL1 sur les répétitions CUG (Mulders et al., 2009; Leger et al., 2013; Wojtkowiak-Szlachcic et al., 2015).

- **Dégradation de l'ARN DMPK muté**

Les ASO peuvent aussi provoquer la dégradation de leur ARN cible, à condition qu'ils contiennent un cœur central non modifié, qui va pouvoir être reconnu par la RNase H. Ces oligonucléotides, aussi appelés « gapmères » vont former un duplex ASO/ARN cible, où l'ARN sera clivé par la RNase H pour ensuite être dégradé par les exonucléases de la cellule (**Figure 31A**). Cette stratégie a été utilisée avec succès sur deux modèles de souris (HSA^{LR} et EpA960) et a permis de corriger les altérations d'épissage, ainsi que d'améliorer la plupart des phénotypes de ces animaux (Wheeler et al., 2009; J. E. Lee et al., 2012). Il est à noter que les meilleurs résultats ont été obtenus à l'aide de gapmères qui ne s'hybrident pas directement aux répétitions CUG mais qui ciblent des séquences en amont ou en aval de celles-ci. De plus, il a été démontré que cette approche était particulièrement intéressante dans le cas de la dystrophie myotonique où les transcrits contenant les expansions de répétitions CUG sont retenus dans le noyau, où est aussi située la RNase H. Il est à noter qu'une étude récente a optimisé les modifications chimiques de ces gapmères (**Figure 31B**). Cela a eu pour conséquence d'améliorer la tolérance, la durabilité ainsi que l'efficacité du traitement par cet ASO chez le modèle murin HSA^{LR}, mais aussi chez des primates non-humains. Par conséquent, ces résultats suggèrent la possibilité d'une stratégie thérapeutique pour les patients DM (Pandey et al., 2015).

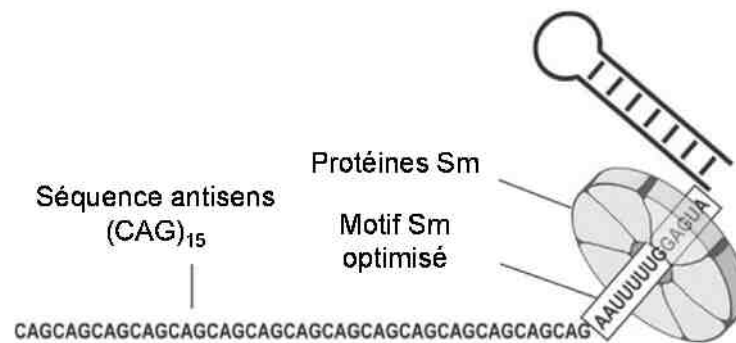


Figure 32 : Structure du snRNA U7 modifié pour cibler les répétitions CUG.

A l'origine, le snRNA U7 est requis pour la maturation des ARN pré-messager des histones. Son assemblage avec les protéines Sm lui permet d'être accumulé dans le noyau des cellules. Pour son application dans la DM1, les modifications suivantes ont été réalisées : changement de la séquence d'hybridation en une séquence poly-CAG pour se lier aux répétitions CUG et changement du motif normal d'assemblage avec les protéines Sm par un motif optimisé. Adapté de François et al., 2011.

Enfin, une alternative à l'utilisation d'ASO chimiquement modifiés, dont les effets secondaires chez les humains sont totalement inconnus, est le couplage d'un oligonucléotide d'intérêt à une particule ARN-protéine, permettant ainsi une expression stable et nucléaire de l'oligonucléotide antisens. Ainsi, une séquence antisens de type poly-CAG a été fusionnée au petit ARN nucléaire, le snRNA-U7, optimisé et cloné dans un vecteur lentiviral pour assurer un transfert de gène efficace et durable dans les cellules humaines (**Figure 32**; François et al., 2011). La transduction de cellules musculaires issues de patients DM1 a montré qu'il y avait une dégradation sélective de l'ARN *DMPK* muté conduisant à la disparition des foci d'ARN CUG, menant au rétablissement d'un épissage normal ainsi qu'à une amélioration du potentiel de fusion des myoblastes en myotubes. De plus, ces effets provoqués par le snRNA modifié sont durables, ce qui est un avantage important pour une thérapie, car un traitement répétitif serait ainsi évité (François et al., 2011). En conclusion, compte tenu des récentes avancées sur les oligonucléotides antisens, cette approche de dégradation de l'ARN *DMPK* porteur des répétitions CUG est des plus prometteuses et pourrait permettre l'émergence de stratégies thérapeutiques.

I.G.3) Autres approches

- **Déplétion de *DMPK* par ARN interférence**

Une stratégie alternative pour diminuer le taux d'ARNm *DMPK* muté consiste à utiliser la voie des petits ARN interférents (siRNA ; small interfering RNA). Ces siRNA sont produits par l'enzyme Dicer à partir d'ARN double brin, qu'ils soient d'origine cellulaire ou exogène. Le complexe RISC (RNA-induced silencing complex) va ensuite sélectionner le brin antisens (ou brin « guide ») du siRNA, qui va s'hybrider à l'ARN cible par complémentarité et conduire à la dégradation de celui-ci (**Figure 33**, page suivante). Ainsi, des premières expériences utilisant des siRNA dirigés contre *DMPK* et réalisées sur des myoblastes issus de patients DM1 ont montré que le taux d'ARN *DMPK* muté était diminué de façon significative (Langlois et al., 2005). La possibilité de cette application a été confirmée chez la souris HSA^{LR}, cette fois par électroporation des siRNA dans le muscle squelettique. Cette stratégie a permis de réduire le nombre de foci d'ARN CUG nucléaires, d'augmenter la quantité de MBNL1 libre et donc de corriger les épissages alternatifs altérés, notamment celui de *Cln1*, ce qui a conduit à améliorer la myotonie chez ces souris (Sobczak et al., 2013). Cependant, ces siRNA présentent plusieurs limitations par rapport aux oligonucléotides gapmères.

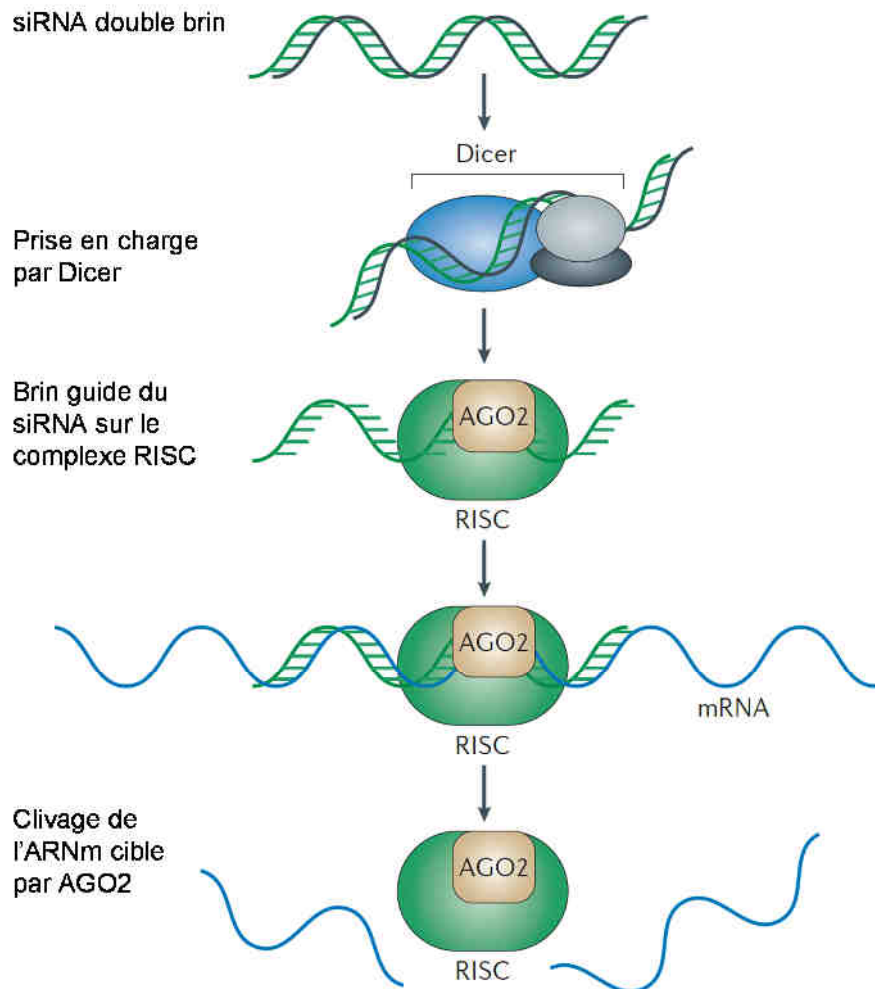


Figure 33 : Mécanisme d'action des siRNA.

Les longs ARN double brin sont pris en charge par l'enzyme Dicer qui va les couper en fragment de 21-22 nucléotides. Le siRNA est transféré sur le complexe RISC (RNA-induced silencing complex) qui va sélectionner le brin guide et permettre son hybridation à l'ARN à cliver. L'activité endonucléase est portée par le membre AGO2 du complexe. Adapté de Kole et al., 2012.

En effet, les siRNA ne tolèrent qu'un nombre limité de modifications chimiques, au risque de perdre leur efficacité. De plus, la vaste majorité des transcrits *DMPK* mutés contenant les expansions de répétitions CUG sont nucléaires et donc, par définition, résistants aux siRNA associés au complexe RISC, qui lui est cytoplasmique.

- ***Surexpression de MBNL1***

La protéine MBNL1 est titrée et séquestrée par les répétitions CUG, ce qui diminue son activité de régulation d'épissage et conduit ainsi à de nombreuses dérégulations d'épissage associées aux symptômes des DM. Une stratégie thérapeutique serait donc de surexprimer MBNL1 afin d'augmenter la fraction libre de cette protéine, lui permettant ainsi de réaliser son activité biologique. Une preuve de concept d'une telle approche a été apportée par l'injection de virus recombinants de type AAV2.6 exprimant MBNL1 dans le muscle squelettique de souris HSA^{LR} (Kanadia et al., 2006). Toutefois, se pose la question d'une stratégie à l'échelle d'un organisme humain, avec notamment des questions sur la quantité d'AAV à utiliser.

- ***Diminution de CUGBP1 / CELF1***

La protéine CUGBP1 est augmentée chez les patients DM via son hyperphosphorylation et sa stabilisation par la protéine kinase C (PKC) (Kuyumcu-Martinez et al., 2007). Il a donc été proposé d'utiliser des inhibiteurs de l'activité PKC afin de diminuer la quantité de Cugbp1 dans un modèle murin de la maladie. Ainsi, le traitement avec ces inhibiteurs, de souris EpA960, exprimant 960 répétitions CUG dans le cœur et le muscle, a permis de corriger les épissages altérés par l'augmentation de Cugbp1 conduisant à l'amélioration de leur phénotype cardiaque (G.-S. Wang et al., 2009). Toutefois, l'augmentation de CUGBP1 n'étant responsable que d'une sous-partie des épissages altérés chez les patients DM, il est probable qu'il soit nécessaire de combiner la diminution de CUGBP1 avec la surexpression de MBNL1 pour une thérapie efficace.

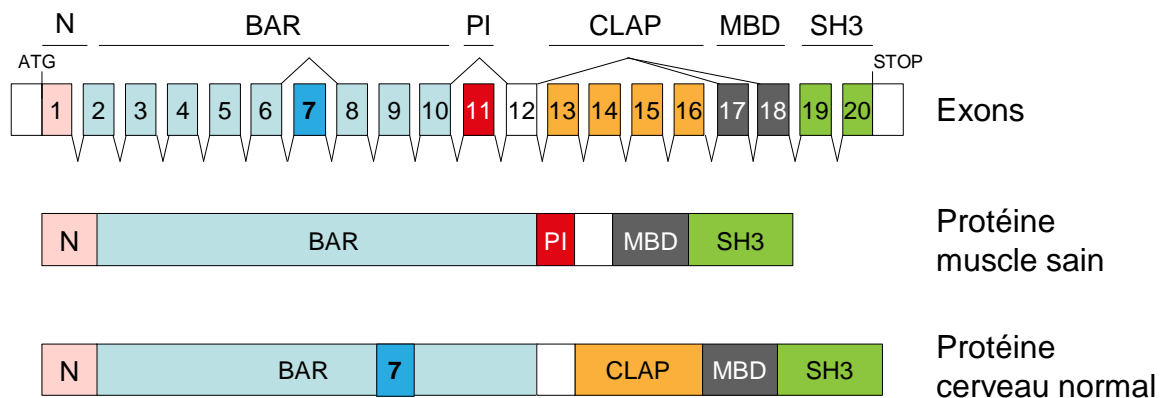


Figure 34 : Composition exonique et domaines protéiques de BIN1.

Composition exonique et événements d'épissage alternatif de l'ARNm *BIN1* (**haut**). Domaines protéiques de l'isoforme de BIN1 exprimée dans le muscle et le cerveau à l'état normal (**bas**). N, hélice amphipathique N-terminale; BAR, domaine BIN1-amphiphysin-Rvs167; PI, domaine de liaison aux phosphoinositide encodé par l'exon 11; CLAP, clathrin-associated protein-binding domain; MBD, Myc-binding domain; SH3, Src homology 3. Adapté de Fugier et al., 2011.

Chapitre II. BIN1 : structure, fonction et maladies

II.A. Fonction et expression

BIN1 (aussi appelé amphiphysine-2) appartient à la superfamille des protéines à domaine BAR (Bin, Amphiphysin, RVS167), dont les membres sont capables de détecter et générer des courbures membranaires. Chez les mammifères, il existe deux membres de la famille des amphiphysines, l'amphiphysine-1 et BIN1. L'amphiphysine 1 est exprimée dans les cellules neuro-endocrines et dans les neurones, où elle participe au mécanisme d'endocytose dans les terminaisons nerveuses (David et al., 1996). L'absence d'amphiphysine-1 chez la souris provoque des défauts dans le recyclage des vésicules synaptiques (Di Paolo et al., 2002). De plus, l'amphiphysine 1 est surexprimée dans le cancer du sein et définie comme un auto-antigène du syndrome paranéoplasique de l'homme raide (Floyd et al., 1998). Mes travaux ayant porté sur l'étude de l'épissage de *BIN1* dans la dystrophie myotonique, je me concentrerai dans les paragraphes suivants, sur la description de l'amphiphysine-2.

BIN1, qui possède 49% d'homologie de séquence avec l'amphiphysine-1 au niveau protéique, est exprimée dans de nombreux tissus, avec toutefois une expression plus forte dans le muscle squelettique et le cerveau (Butler et al., 1997; Tsutsui et al., 1997; Wechsler-Reya et al., 1998). Le gène *BIN1*, localisé sur le chromosome 2q14, contient 20 exons (**Figure 34**), dont six sont régulés par épissage alternatif, conduisant à plusieurs isoformes de BIN1, portant des fonctions différentes et exprimées de façon tissu-spécifique. Le domaine BAR en N-terminal ainsi que le domaine SH3 en C-terminal sont conservés dans toutes les isoformes. La partie centrale de BIN1 est donc variable, lui conférant de multiples fonctions. Ainsi, dans le cerveau, BIN1 est impliqué dans l'endocytose des vésicules synaptiques, tout comme l'amphiphysine-1. Alors que dans le muscle, BIN1 est impliqué dans la génération des tubules-T, qui sont des structures membranaires importantes pour la fonction musculaire. Les différentes isoformes et fonctions de BIN1 sont décrites ci-dessous.

II.B. Organisation et structure de BIN1

Le domaine N-BAR de BIN1 est codé par les exons 1 à 10 et est formé d'une hélice amphipathique, appelée hélice 0, et d'un domaine BAR formé de trois autres hélices. L'hélice 0 est formée par les 33 premiers acides aminés de BIN1 qui s'insèrent dans la bicouche lipidique de la membrane pour y appliquer une courbure

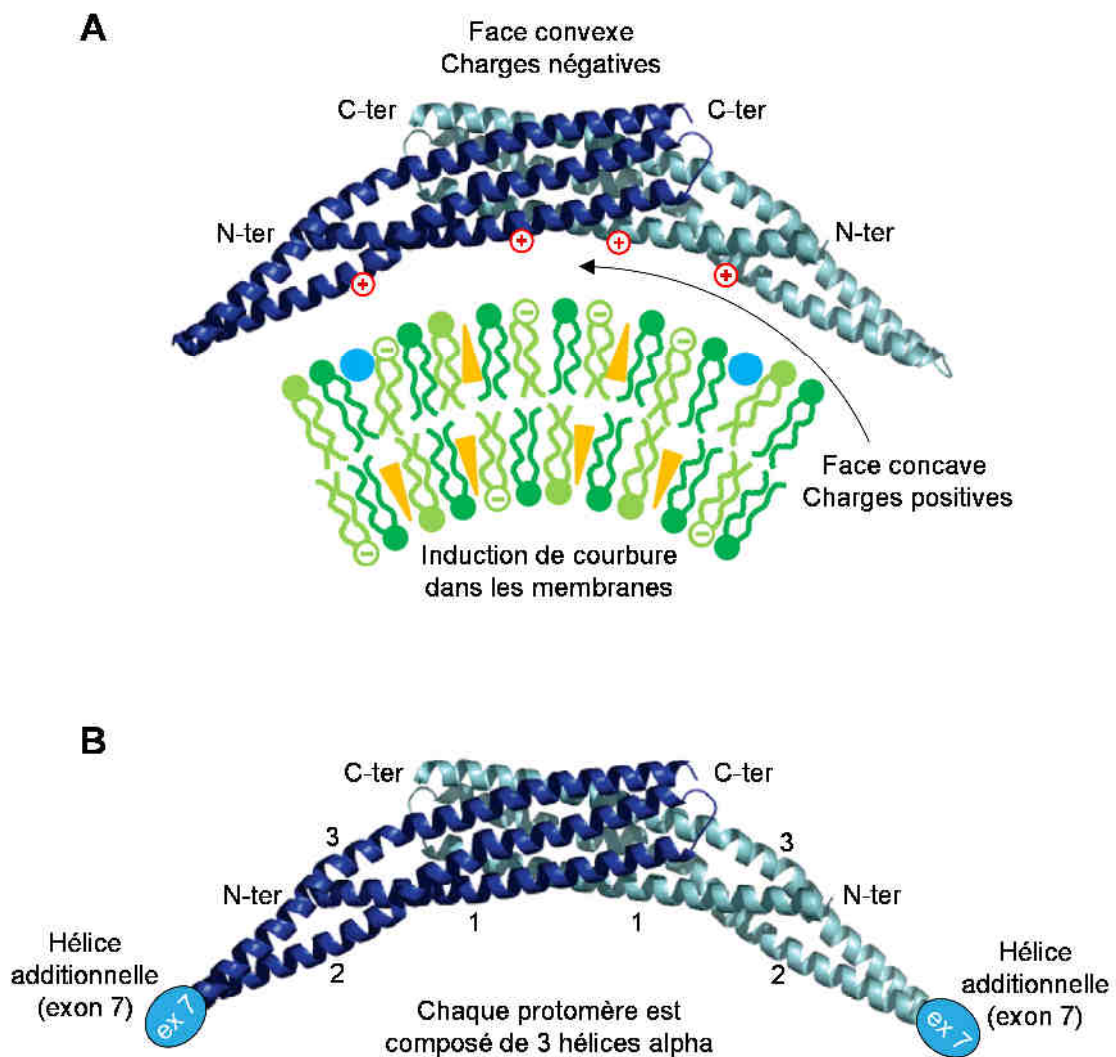


Figure 35 : Reconnaissance des membranes par le domaine BAR et localisation de l'insertion codée par l'exon 7.

(A) Structure de l'homodimère du domaine BAR qui adopte une forme de croissant de lune. Ce domaine est amphipathique, la face concave, chargée positivement est capable d'attirer les membranes pour induire leur courbure. (B) Chaque protomère est composé de 3 hélices alpha (numérotées de 1 à 3). L'exon 7 de l'ARN *BIN1* code pour une insertion de 31 acides aminés (bleu clair) qui s'organisent en une hélice retrouvée à l'extrémité de chaque protomère. Adapté de Casal et al., 2006.

(Löw et al., 2008). Le domaine BAR possède lui une architecture de type tri-superhélice voutée (Peter et al., 2004; Casal et al., 2006). Ce domaine permet à deux molécules de BIN1 de s'homodimériser de façon antiparallèle, formant ainsi une structure en forme de croissant de lune alors capable de percevoir l'incurvation de la membrane et de la stabiliser (Ramjaun et al., 1999). Ce croissant formé par les domaines BAR est amphipathique, c'est-à-dire qu'il possède deux faces ayant des propriétés différentes. En effet, la face concave est chargée positivement et peut se lier aux phosphoinositides chargés négativement des membranes pour induire leur courbure. La face convexe quant-à-elle est chargée négativement ce qui permet d'améliorer l'alignement du domaine sur les membranes (**Figure 35A**).

De manière intéressante, l'exon 7, codant pour une insertion de 31 acides aminés, est un exon alternatif présent dans les isoformes d'épissage de BIN1 cérébrales (Butler et al., 1997). Cet exon est situé entre les hélices 2 et 3 du domaine BAR et s'organise lui-même en une hélice localisée à l'extrémité de chaque protomère, formant ainsi deux petits domaines extrudés et situés aux extrémités du croissant de lune (**Figure 35B**; Casal et al., 2006). Il a été proposé que cette insertion pourrait favoriser les interactions protéine-protéine (Casal et al., 2006), ce qui a été confirmé par des études d'interactome (Ellis et al., 2012).

L'exon 11 de *BIN1* est alternatif, celui-ci est présent uniquement dans l'isoforme de BIN1 exprimée dans le muscle squelettique. Cet exon code pour un domaine PI, d'interaction aux phosphoinositides PtdIns(4,5)P₂ (E. Lee et al., 2002; Picas et al., 2014) et PtdIns(3)P et PtdIns(5)P (Fugier et al., 2011). La présence de cet exon 11 contribue au recrutement de BIN1 à la membrane, notamment celle des tubules-T. De plus, ce domaine PI est aussi capable d'interagir avec le domaine SH3 de BIN1 de façon intramoléculaire. Cette interaction permettrait un mécanisme d'auto-inhibition de BIN1 qui serait levé par l'interaction du domaine PI avec les membranes et / ou lors de l'interaction de BIN1 avec la DNM2 (Kojima et al., 2004; T. Wu & Baumgart, 2014).

Les exons 13 à 16 sont eux aussi alternatifs mais ne sont présents que dans les isoformes neuronales de BIN1. Ces exons codent pour un domaine dit CLAP, d'interaction avec la clathrine et le complexe AP2, essentiel pour la fonction de BIN1 dans l'endocytose (LePrince et al., 1997; Ramjaun & McPherson, 1998).

Les exons 17 et 18 forment le domaine MBD, de liaison à Myc (Sakamuro et al., 1996). Il est à noter que l'exon 17 est alternatif, avec environ 50% des isoformes de BIN1 qui ne possèdent pas cet exon, alors que l'exon 18 est constitutif.

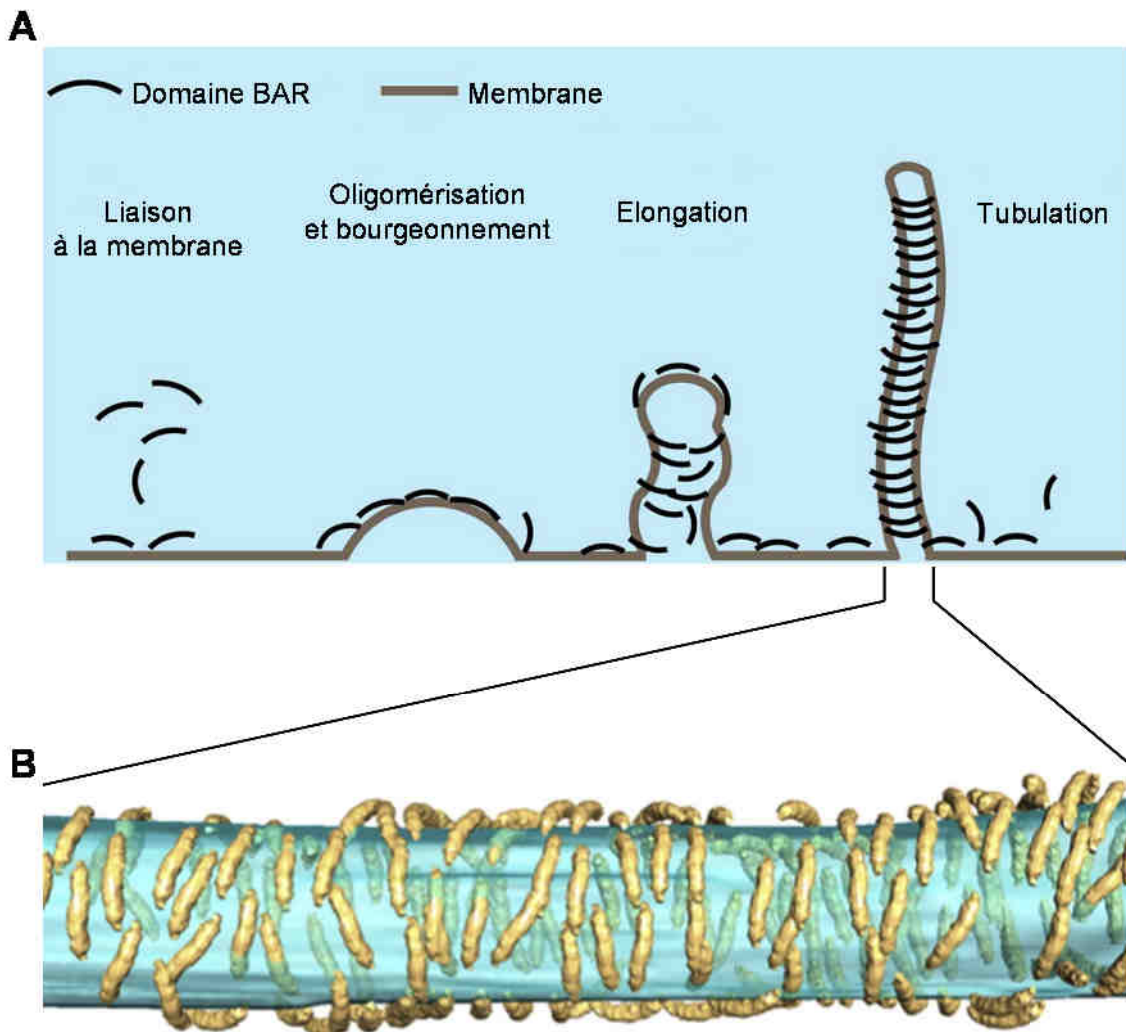


Figure 36 : Proposition d'un modèle pour le rôle de tubulation du domaine BAR.

(A) Modèle proposé pour la tubulation des membranes par le domaine BAR de BIN1.
 (B) Modèle d'interaction moléculaire entre le domaine BAR (en jaune) et les membranes (bleu) conduisant à la tubulation de ces membranes. Adapté de T. Wu & Baumgart, 2014; Daum et al., 2016.

Le domaine SH3 (Src homology 3) quant à lui, est codé par les deux derniers exons 19 et 20. Ce domaine est responsable de l'interaction de BIN1 avec de nombreuses protéines partenaires contenant des motifs riches en proline (domaines PRD) telle que la protéine dynamine 2 (DNM2) (Owen et al., 1998).

En conclusion, BIN1, via son domaine N-BAR, génère des courbures dans les membranes (**Figure 36**). Toutefois, grâce à une structure modulaire régulée par épissage alternatif, BIN1 peut intervenir dans au moins deux mécanismes (revue dans Prokic et al., 2014 ; Hohendahl et al., 2016). En effet, dans les neurones, l'inclusion des exons 13 à 16 codant pour le domaine CLAP permet à BIN1 de participer à l'endocytose en interagissant avec la clathrine et le complexe AP2. Au contraire, dans le muscle squelettique, l'inclusion de l'exon 11, codant pour un domaine de liaison aux phosphoinositides, conduit BIN1 à façonner les tubules-T. Il reste cependant à éclaircir comment, et si ces différentes formes d'épissage régulent la liaison du domaine SH3 de BIN1 avec des protéines comme la dynamine 2, dont la fonction est de couper les tubules de membrane. Une hypothèse serait que l'interaction de BIN1 avec la dynamine 2 soit renforcée par une autre région régulée elle aussi par épissage alternatif, l'exon 7 de *BIN1* (Ellis et al., 2012).

Enfin, compte tenu des fonctions de BIN1 dans l'endocytose et la génération des tubules-T musculaires, il serait attendu que la perte d'expression de BIN1 conduise à un phénotype neuronal et / ou musculaire. Toutefois, une étude montre que le knockout de *Bin1* chez la souris conduit à une létalité périnatale potentiellement due à une cardiomyopathie (Muller et al., 2003). Ces résultats sont contradictoires avec une deuxième étude chez la souris où l'expression de *Bin1* est diminuée par shRNA conduisant à des altérations musculaires, notamment des tubules-T (Tjondrokoesoemo et al., 2011). De même, chez la drosophile, le zebrafish et le chien, la diminution d'expression de *Bin1* conduit aussi à des altérations au niveau des muscles et des tubules-T (Razzaq, 2001; Böhm et al., 2013; Smith et al., 2014). Enfin, un argument définitif en faveur d'un rôle de BIN1 dans le muscle squelettique est la découverte que des mutations de type perte de fonction de *BIN1* sont responsables de myopathies centronucléaires (Nicot et al., 2007; Böhm et al., 2013, 2014). Il est à noter que dans le cerveau, la fonction d'endocytose de BIN1 est probablement compensée par l'amphiphysine 1.

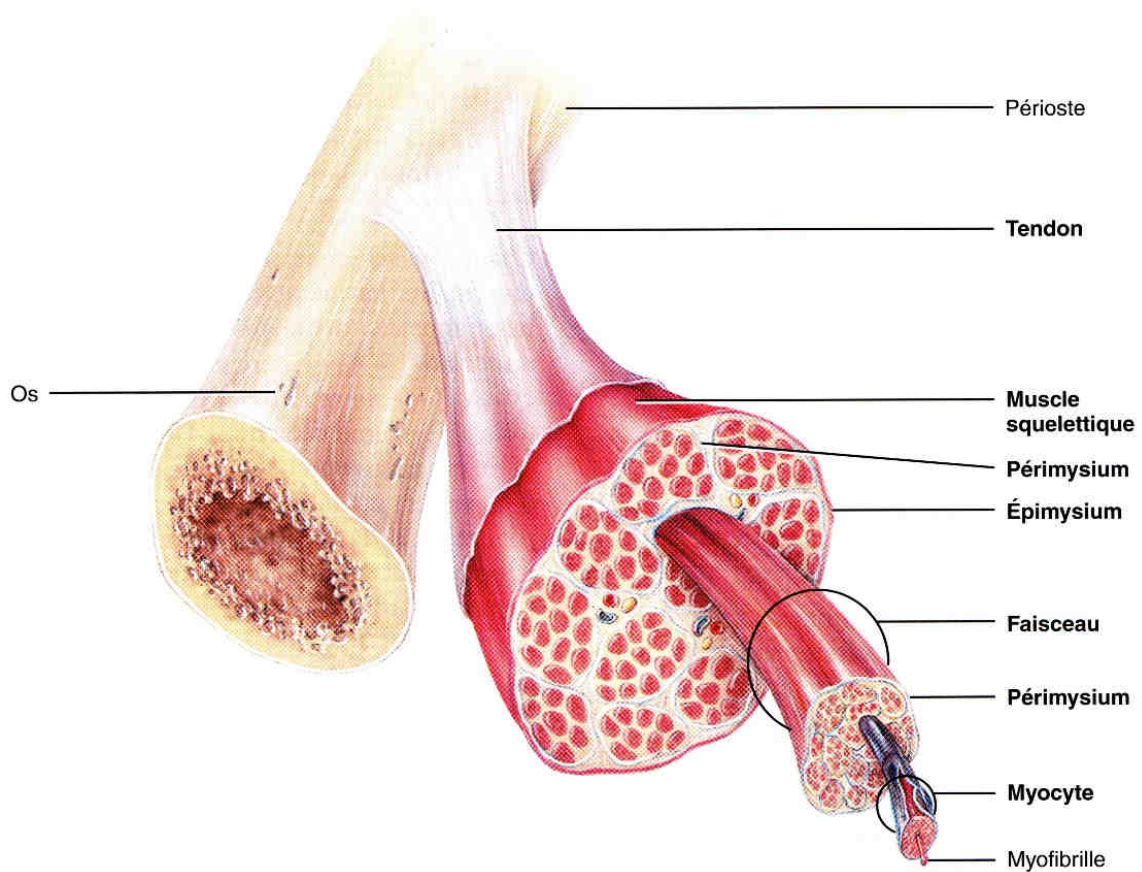


Figure 37 : Organisation d'un muscle squelettique.

Au sein du muscle squelettique, les myocytes individuels (ou fibres musculaires) sont regroupés en faisceau de fibres. L'assemblage de plusieurs faisceaux forme alors le muscle squelettique. Adapté de Tortora & Derrickson, 2007.

Compte tenu de son importance pour le muscle squelettique, la fonction de BIN1 dans la génération des tubules-T et l'implication de BIN1 dans les maladies sont décrites dans les chapitres ci-dessous.

II.C. BIN1 et le muscle squelettique

Les muscles squelettiques sont responsables du mouvement des membres ainsi que du maintien de la position et de la posture du corps. Un muscle squelettique est typiquement formé d'une large population de fibres musculaires (ou myocytes) ayant un diamètre compris entre 10 et 100 μ m (Tortora & Derrickson, 2007).

Les fibres musculaires sont entourées individuellement, mais aussi maintenues ensemble, par une enveloppe protectrice de tissu conjonctif qui contient aussi les vaisseaux sanguins et les nerfs. A l'extrémité du muscle, le tissu conjonctif s'étend pour former un tendon qui va permettre d'attacher le muscle au squelette (**Figure 37**).

Entre les fibres musculaires, se trouvent des cellules satellites. Celles-ci sont de petites cellules progénitrices mono-nucléées comportant peu de cytoplasme et qui sont situées entre la membrane basale et la membrane plasmique des fibres musculaires. Dans le muscle adulte, les cellules satellites sont quiescentes mais peuvent être réactivées en cas de lésion accidentelle ou pathologique de la fibre musculaire. Elles se remettent alors à proliférer en tant que myoblastes, se différencient et fusionnent pour permettre une régénération du muscle (Tortora & Derrickson, 2007).

Les fibres musculaires sont des cellules allongées, multi-nucléées et striées dont les noyaux sont repoussés vers la périphérie. La membrane plasmique qui entoure les fibres musculaires est appelée sarcolemme. Cette membrane possède des milliers d'invaginations, les tubules-T, qui permettent de relier la surface de la fibre avec son centre afin de propager le potentiel d'action de façon efficace et rapide dans toute la fibre (Tortora & Derrickson, 2007). Au niveau de son ultrastructure, une fibre musculaire est composée de nombreuses myofibrilles, d'environ 2 μ m de diamètre, elles-mêmes composées d'une succession d'unités contractiles, appelées sarcomères (**Figure 38A**, page suivante). L'aspect strié des muscles est causé par l'arrangement des myofilaments d'actine et de myosine qui se superposent au sein de ces sarcomères. La contraction est causée par le glissement de ces myofilaments les uns sur les autres. Les différentes régions du sarcomère sont nommées en fonction de leur apparence en microscopie électronique. Ainsi, les sarcomères sont délimités de

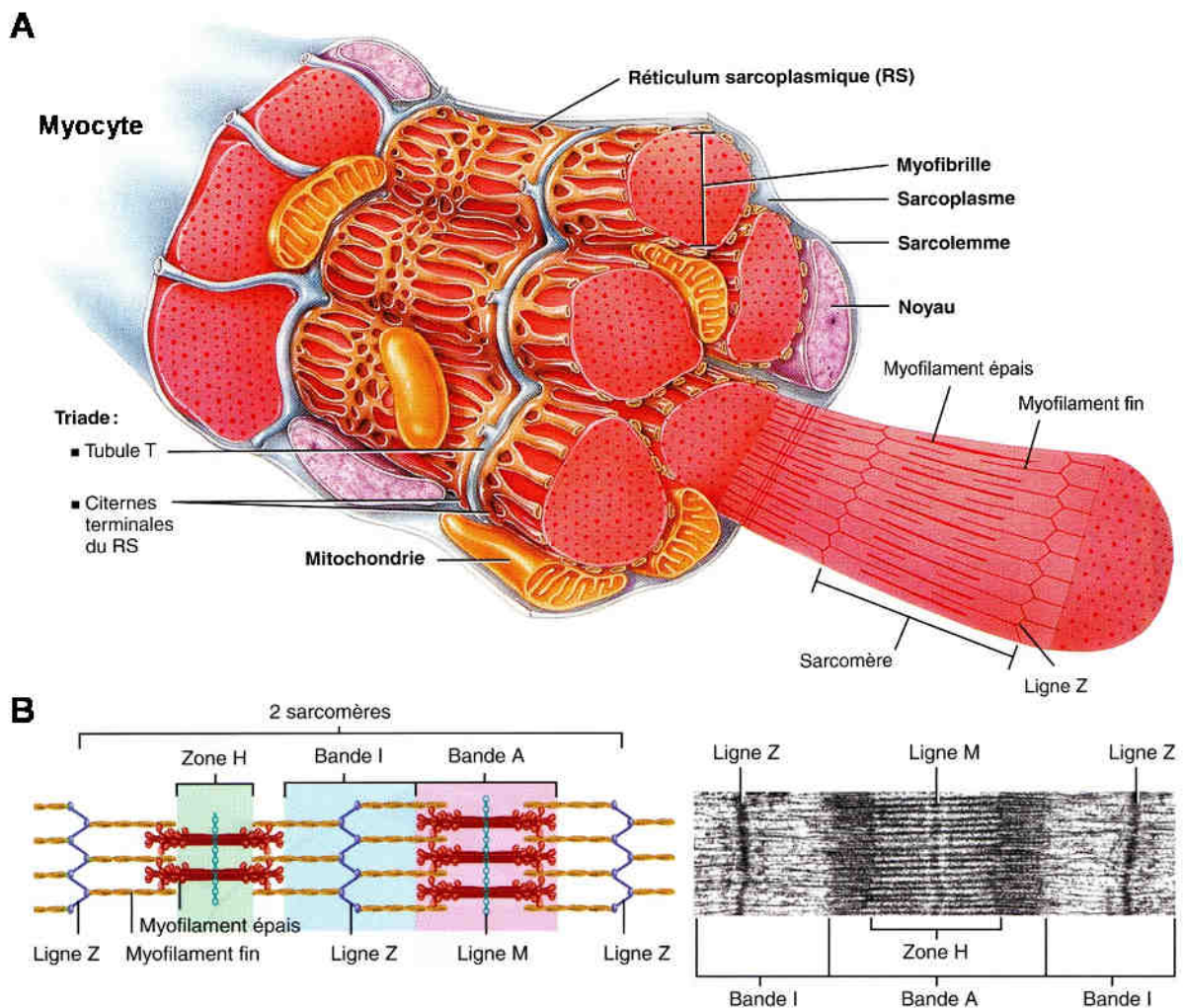


Figure 38 : Organisation microscopique des myocytes et des sarcomères.

(A) Une fibre musculaire (ou myocyte) est entourée du sarcolemme et comprend de nombreuses myofibrilles. Le réticulum sarcoplasmique (RS) entoure chaque myofibrille. Les invaginations du sarcolemme vers le centre de la fibre, les tubules-T, s'associent avec deux extrémités du SR (cisternes terminales) pour former une triade.

(B) Arrangement des myofilaments d'actine et de myosine au sein des sarcomères et nom des régions, présenté sous forme de schéma (à gauche), ou observé en microscopie électronique (à droite). Adapté de Tortora & Derrickson, 2007.

part et d'autre par la ligne Z (ou disque Z) et leur centre est appelé ligne M. La zone comprenant toute la longueur des filaments de myosine épais correspond à la bande A. La région où les filaments fins d'actine ne sont pas superposés aux filaments épais correspond à la bande I. Enfin, la région autour du centre du sarcomère (ligne M) où seuls les filaments épais se trouvent est appelée zone H (**Figure 38B**). Les myofibrilles composant une fibre musculaire sont chacune entourées par un système de sacs membraneux, appelé réticulum sarcoplasmique (RS). Les extrémités du RS, ou citernes terminales, enserrant un tubule-T de part et d'autre pour former une triade qui est alignée sur la jonction des bandes A et I. Ces citernes sont des réservoirs à ions calcium (Ca^{2+}) dont la libération déclenche la contraction musculaire (Tortora & Derrickson, 2007).

En effet, la contraction musculaire est initiée par un potentiel d'action acheminé par le neurone moteur à la plaque motrice constituée de synapses neuromusculaires. A ce niveau, le potentiel d'action du neurone est propagé dans la cellule musculaire par le biais de neurotransmetteurs sous la forme d'un potentiel post-synaptique. Si ce dernier est excitateur, il donne lieu à un potentiel d'action musculaire qui se manifeste par une dépolarisation de la membrane musculaire, y compris des tubules-T. Très schématiquement, ces tubules-T portent les canaux calciques CACNA1S / DHPR (récepteur de la dihydropyridine) dépendants du voltage et qui sont donc activés et changent de conformation suite à la dépolarisation du tubule-T. Ces canaux DHPR activent alors l'ouverture des canaux calciques RyR1 (récepteurs de la ryanodine) placés en regard des canaux DHPR et qui sont portés par une citerne terminale du réticulum sarcoplasmique (RS). Il s'ensuit un relargage d'ions calcium du RS vers le cytoplasme qui se fixent sur la troponine (**Figure 39**, page suivante). Cette protéine hétérotrimérique, formée des troponines C, I et T, interagit en temps normal avec la tropomyosine, ce qui inhibe l'interaction de l'actine et de la myosine au repos. En revanche, la liaison du calcium par la troponine provoque son changement de conformation, conduisant au déplacement de la tropomyosine ce qui va permettre l'interaction entre l'actine et la myosine. Les molécules de myosine vont alors contacter l'actine et initier un mouvement de glissement des filaments épais le long des filaments fins, provoquant le raccourcissement du sarcomère et donc la contraction musculaire. A la fin de la contraction, le calcium est recyclé dans la composante longitudinale du réticulum par le biais d'une pompe à calcium, l'ATPase SERCA / ATP2A1 (Tortora & Derrickson, 2007).

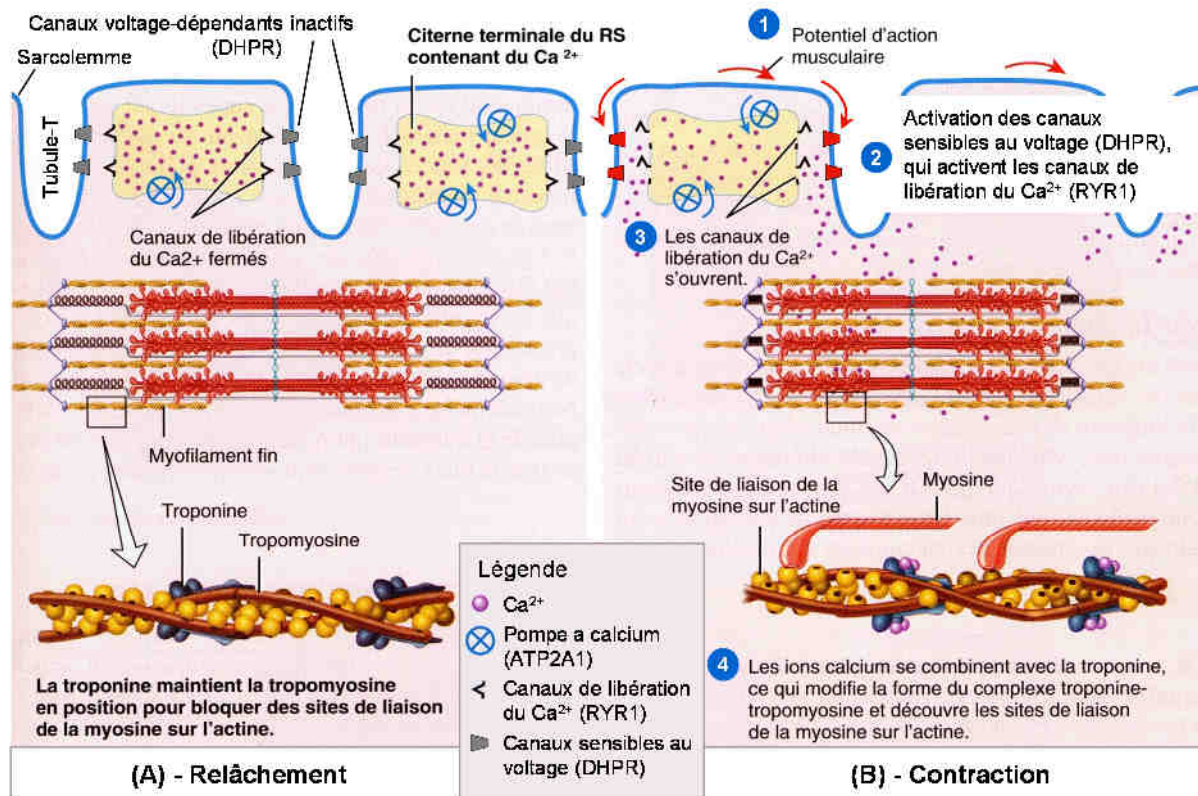


Figure 39 : Mécanisme de contraction musculaire et rôle du calcium.

(A) Lorsque le muscle est relâché, les ions Ca^{2+} sont contenus dans le réticulum sarcoplasmique (RS). En effet, les canaux calciques (RYR1) sont inactifs et fermés et les pompes à calcium ATP2A1 (appelées aussi SERCA) situées dans la membrane du RS aspirent le calcium. **(B)** La contraction musculaire est initiée par un potentiel d'action qui va se propager le long du sarcolemme, jusqu'aux tubules-T (1), pour activer les canaux DHPR sensibles au voltage (2), ceux-ci activent à leur tour les canaux calciques RYR1 qui vont s'ouvrir pour libérer le calcium dans le cytoplasme (3). Ensuite, le calcium va se fixer sur la troponine pour déclencher un changement de conformation et permettre à la myosine de contacter l'actine pour démarrer la contraction (4). D'après Tortora & Derrickson, 2007.

Comme décrit précédemment, dans le muscle, BIN1 est localisé au niveau des tubules-T (Butler et al., 1997). Cette localisation particulière apparaît comme une double bande transversale lors de l'immunomarquage de BIN1 sur une coupe longitudinale de muscle (Royer et al., 2013). L'importance de BIN1 pour la genèse et le maintien des tubules-T est démontré par la défaillance de ces structures dans des modèles de drosophile, de zebrafish, de chien et de souris sous-exprimant BIN1 (Razzaq, 2001; Tjondrokoesoemo et al., 2011; Böhm et al., 2013; Smith et al., 2014), mais aussi chez des patients atteints de myopathie centronucléaire due à des mutations perte de fonction de *BIN1* (Nicot et al., 2007; Toussaint et al., 2011; Royer et al., 2013; Böhm et al., 2014). En effet, les tubules-T sont nécessaires au mécanisme de couplage excitation / contraction musculaire, et leur altération mène à l'inefficacité de ce couplage et donc à des problèmes de faiblesse et d'atrophie musculaire.

De plus, BIN1 est aussi impliqué dans le positionnement des noyaux dans les fibres musculaires. Pour rappel, les noyaux des myocytes sont localisés à la périphérie de la cellule et non au centre, comme c'est généralement le cas pour les autres types cellulaires. Des résultats ont montré l'implication de BIN1 dans le positionnement des noyaux grâce à son interaction avec des protéines adaptatrices du réseau d'actine et des microtubules. Cependant, le mécanisme précis de cet évènement reste à élucider (Falcone et al., 2014; D'Alessandro et al., 2015). Toutefois, on peut faire le lien entre cette fonction de BIN1 et la présence de noyaux anormalement centraux dans les fibres musculaires de patients atteints de myopathie centronucléaire.

En conclusion, BIN1 est impliqué dans diverses fonctions essentielles pour le muscle squelettique, comme la localisation périphérique des noyaux, ou le maintien de la structure des tubules-T, qui est essentielle à l'initiation du couplage excitation / contraction. D'où l'importance de BIN1 dans le muscle et son implication possible dans des maladies humaines telles que la dystrophie myotonique et la myopathie centronucléaire (voir chapitre suivant).

II.D. Implication de BIN1 dans les maladies humaines

II.D.1) Maladies non musculaires

- ***La maladie d'Alzheimer***

BIN1 a été identifié dans des études d'association génétique pangénomiques (GWAS) comme un gène modificateur de la susceptibilité de développer la maladie d'Alzheimer dans sa forme tardive (Seshadri et al., 2010; Lambert et al., 2011).

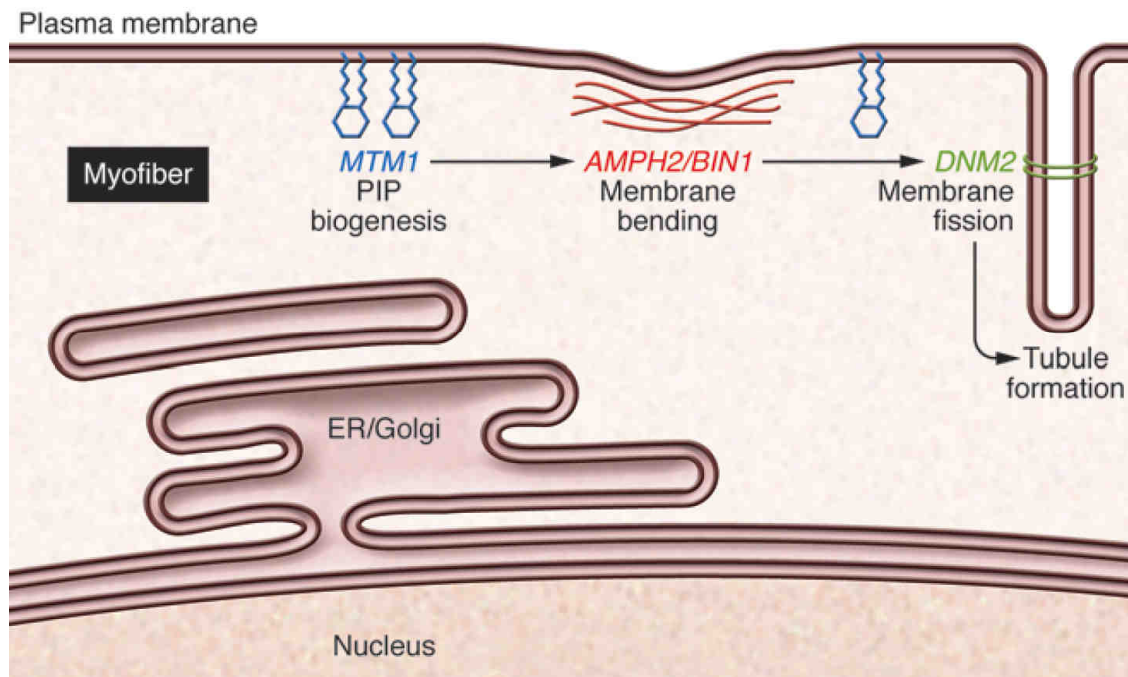


Figure 40 : Gènes impliqués dans les différentes formes de CNM.

Les gènes causant la CNM sont impliqués dans un processus biologique commun, correspondant certainement à la biogenèse et la maintenance des tubules-T. MTM1, en bleu, est une phosphatase lipidique mutée dans la forme de CNM liée à l'X. BIN1 (amphiphysine 2), en rouge, est responsable de la courbure des membranes, la mutation de ce gène mène à la forme autosomale récessive de la CNM. La DNM2, en vert, a pour fonction de couper les membranes (fission) et est mutée dans la forme autosomale dominante de la CNM. Illustration issue de Demonbreun & McNally, 2014.

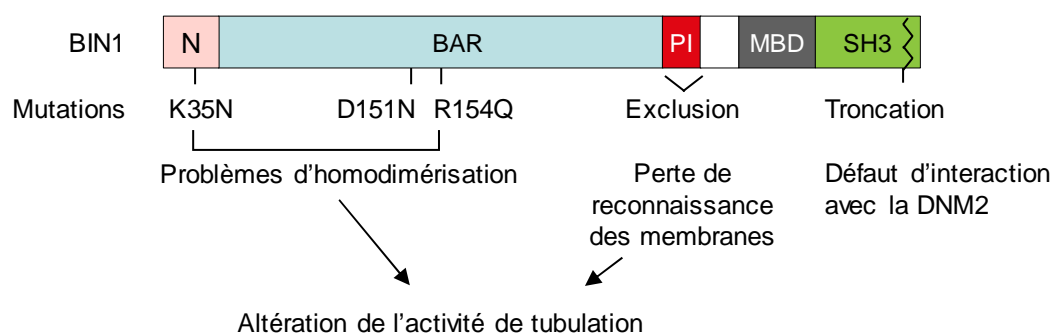


Figure 41 : Effets proposés des mutations de BIN1 dans la CNM.

Les différentes mutations de BIN1 connues pour causer la CNM apparaissent sur ce schéma. Basé sur Böhm et al., 2013.

En effet, des variations génétiques au sein du gène *BIN1* ont été identifiées comme étant responsables de l'augmentation du risque de développer cette maladie. De plus, des études pangénomiques de méthylation de l'ADN montrent que la méthylation d'îlots CpG proches de *BIN1* est modifiée chez les patients Alzheimer (De Jager et al., 2014; Yu et al., 2015). Il a aussi été montré que le taux d'expression de *BIN1* était augmenté dans le cerveau de patients atteints de la maladie, ce qui favorisait la toxicité de Tau, qui est connue pour s'accumuler et former des amas de protéines dans les neurones de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Chapuis et al., 2013). Enfin, la protéine *BIN1*, en régulant l'endocytose dans les neurones, pourrait modifier la quantité de peptide β -amyloïde (Miyagawa et al., 2016). Cependant, des résultats contradictoires ont été obtenus dans des souris où l'expression de *BIN1* diminue avec l'âge. De façon intéressante, la *DNM1*, qui est un paralogue de la *DNM2*, observe le même profil de diminution d'expression que *BIN1* dans ces souris (Yang et al., 2008). Ainsi, le rôle précis de *BIN1* dans la maladie d'Alzheimer reste encore mal compris.

- **Cancer**

L'expression de *BIN1* est diminuée dans de nombreux types de cancer, de plus, son expression est abolie dans une grande partie des lignées cellulaires tumorales. Il a été proposé que *BIN1* joue un rôle de suppresseur de tumeurs (Sakamuro & Prendergast, 1999; Pan et al., 2012). Toutefois, il est à noter que des modèles animaux avec une diminution d'expression de *BIN1* ne sont pas connus comme développant des tumeurs ou des cancers (Tjondrokoesoemo et al., 2011; Smith et al., 2014). De plus, des mutations perte de fonction de *BIN1* chez l'homme ne conduisent pas à des cancers, mais à une pathologie musculaire, la myopathie centronucléaire (cf. ci-dessous). Il est donc probable que *BIN1* ne soit pas un supresseur fort de tumeurs, mais que son absence puisse faciliter le développement et la progression tumorale dans certaines conditions (Chang et al., 2007).

II.D.2) Mutation de *BIN1* dans les myopathies centronucléaires

Les myopathies centronucléaires (CNM) sont caractérisées par une atrophie et une faiblesse musculaire des patients, ainsi que par la présence de noyaux localisés anormalement au centre des fibres musculaires en absence de régénération. Ces maladies sont causées par des mutations génétiques dans divers gènes (**Figure 40**), et on distingue principalement 3 formes de CNM.

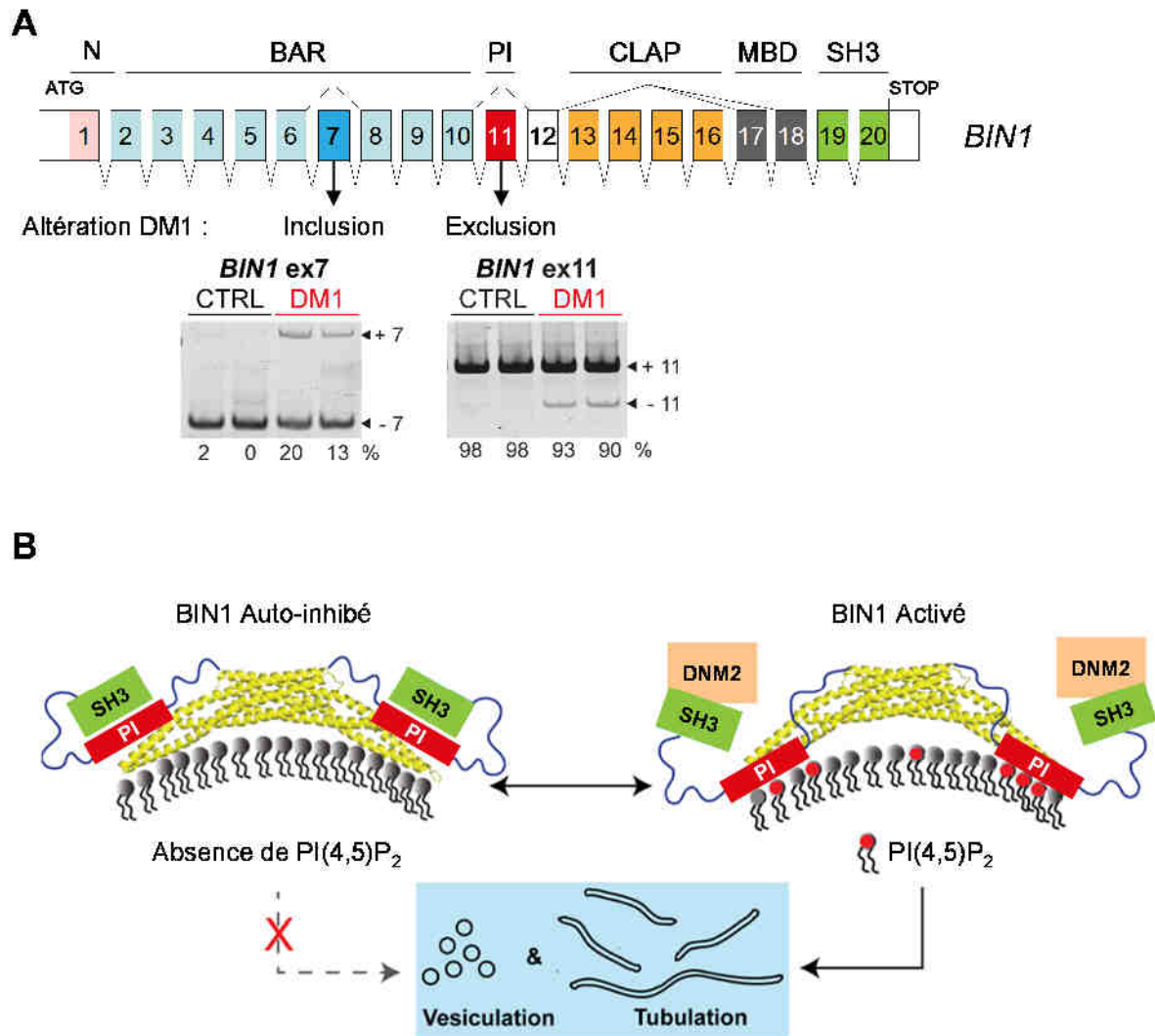


Figure 42 : Altération de l'épissage de *BIN1* dans la DM1 et fonction proposée de l'exon 11.

(A) L'épissage des exons 7 et 11 de *BIN1* est altéré dans la DM1, comme le montrent les gels d'électrophorèses. (B) Le domaine PI (en rouge), encodé par l'exon 11, permet à la protéine *BIN1* d'adopter un état d'auto-inhibition, où le domaine PI est en interaction avec le domaine SH3 (en vert) afin de masquer ce dernier et d'éviter son interaction avec d'autres protéines. Lorsque *BIN1* est en présence d'un type de phosphoinositides particulier, ils sont reconnus par le domaine PI, ce qui va libérer le domaine SH3, le rendant accessible pour l'interaction avec les protéines partenaires de *BIN1*, dont la DNM2. Toutefois, ce modèle est remis en cause par le travail de Ellis et al., en 2012, qui suggère que l'interaction de *BIN1* avec la DNM2 nécessite obligatoirement la présence de l'exon 7 alternatif. Le domaine SH3 seul ne serait donc pas suffisant pour contacter la DNM2. Adapté de T. Wu & Baumgart, 2014.

La première forme de CNM est la forme néonatale liée au chromosome X, due à des mutations perte de fonction dans le gène de la myotubularine (MTM1) (Laporte et al., 2003). La deuxième forme autosomale dominante est causée par des mutations gain de fonction dans le gène de la DNM2 (Bitoun et al., 2005). Enfin, la troisième forme, qui est autosomale récessive, est causée par des mutations perte de fonction de *BIN1* (Nicot et al., 2007; Böhm et al., 2013, 2014). Les mutations de *BIN1* conduisent à des altérations de la structure des tubules-T et des triades, comme présenté en **Figure 41**, plus haut (Nicot et al., 2007; Toussaint et al., 2011). De plus, des anomalies des tubules-T et des triades sont aussi retrouvées dans des modèles de drosophile, de zébrafish, de chien et de souris où l'expression de *BIN1* est diminuée (Razzaq, 2001; Tjondrokoesoemo et al., 2011; Böhm et al., 2013; Smith et al., 2014). Il est aussi à noter que *BIN1* interagit à la fois avec les protéines DNM2 et MTM1, dont les gènes sont aussi mutés dans les CNM, suggérant ainsi l'existence d'un complexe moléculaire et / ou d'un mécanisme commun à l'origine des CNM (Owen et al., 1998; Royer et al., 2013). Enfin, pour expliquer le défaut de positionnement des noyaux dans les muscles de patients CNM, des études récentes ont montré l'implication de N-WASP, qui a été identifié comme étant un partenaire de *BIN1* et dont la fonction serait perturbée lorsque les gènes *BIN1* ou *DNM2* sont mutés (Falcone et al., 2014; D'Alessandro et al., 2015). Enfin, il est remarquable de noter que les CNM et les DM présentent des caractéristiques histopathologiques similaires (atrophie musculaire, noyaux centraux en absence de régénération, altérations des tubules-T et des triades) et la découverte de mutations du gène *BIN1* causant la CNM et d'altération d'épissage dans l'ARN messager *BIN1* dans les DM en est d'autant plus frappante.

II.D.3) Altération de l'épissage de *BIN1* dans les DM

Il a été montré que l'épissage alternatif des exons 7 et 11 de *BIN1* était dérégulé dans des échantillons de muscle squelettique de patients DM (Fugier et al., 2011; Nakamori et al., 2013) (**Figure 42A**). Ainsi, l'exon 11, spécifique au muscle squelettique, voit son inclusion diminuée chez les patients DM1. Cet exon code pour une séquence polybasique (le domaine PI) qui interagit avec les phosphoinositides PtdIns(4,5)P₂, PtdIns(3)P et PtdIns(5)P, renforçant ainsi la liaison de *BIN1* aux tubules-T, comme schématisé en **Figure 42B** (E. Lee et al., 2002; Fugier et al., 2011).

De plus, le domaine PI est capable d'interagir avec le domaine SH3 de BIN1, conduisant à une auto-inhibition de la fonction de BIN1, qui est levée en présence de phosphoinositides ou de la DNM2 (Kojima et al., 2004; T. Wu & Baumgart, 2014).

L'exon 7 de *BIN1* est lui un exon strictement neuronal, et donc normalement absent du muscle squelettique. Toutefois, son inclusion augmente dans des échantillons de muscle squelettique de patients DM (Fugier et al., 2011). Cet exon 7 forme un petit domaine situé à l'extrémité de la structure en croissant de lune formée par le domaine N-BAR de BIN1 (Casal et al., 2006), et renforcerait l'interaction de BIN1 avec la DNM2 (Ellis et al., 2012). Ainsi, la perturbation de l'épissage alternatif de *BIN1* va conduire à une altération de ses fonctions normales.

Une étude portant sur le défaut de l'épissage de l'exon 11 et sur son implication dans la DM1 a déjà été réalisée précédemment dans l'équipe où j'ai réalisé ma thèse. Toutefois, l'exclusion forcée de l'exon 11 de *Bin1* dans des souris ne conduit qu'à un phénotype léger. En effet, ces souris ne montrent qu'une perte de force limitée et peu d'atrophie musculaire (Fugier et al., 2011). De même, la reproduction, chez la souris, d'autres épissages altérés dans la DM1, tels que ceux de *DHPR (CACNA1S)*, *RYR1*, *SERCA (ATP2A1)* et *DMD* n'engendrait qu'une faiblesse ou une atrophie musculaire partielle (Kimura et al., 2009; Fugier et al., 2011; Tang et al., 2012; Rau et al., 2015; Sultana et al., 2016). Par conséquent, les causes moléculaires responsables de la faiblesse et de l'atrophie des muscles dans les DM, ne sont pas encore complètement identifiées. C'est pourquoi je me suis intéressé à l'étude de l'épissage alternatif de l'exon 7 de *BIN1* et plus particulièrement à son inclusion anormale dans la DM1. Ce choix a été fait en regard du rôle de BIN1 dans le muscle et dans les maladies humaines : (i) Tout d'abord, la faiblesse musculaire des patients DM1 est corrélée avec l'altération de l'exon 7 (Nakamori et al., 2013). (ii) Ensuite, des mutations dans le gène *BIN1* sont responsables de la myopathie centronucléaire (CNM), qui est une pathologie dont les signes cliniques et histopathologiques sont similaires à la DM1. (iii) De plus, la présence de la séquence peptidique encodée par l'exon 7 permet à la protéine BIN1 d'interagir avec la DNM2 (Ellis et al., 2012), qui est aussi mutée dans certaines formes de CNM. (iv) Enfin, BIN1 est impliqué dans la maintenance des tubules-T musculaires, qui sont altérées à la fois dans la DM1 et la CNM. Par conséquent, l'exon 7 de *BIN1* est une cible particulièrement intéressante pour expliquer les problèmes de faiblesse et d'atrophie des muscles dans la DM1.

Objectifs

Objectifs de la thèse :

Les dystrophies myotoniques sont des maladies génétiques affectant 1 patient sur 8000 et qui sont caractérisées principalement par une atrophie et une faiblesse musculaire, une myotonie, des troubles de la conduction cardiaque et des problèmes cognitifs. Il est désormais établi qu'une partie de ces symptômes est reliée à des altérations de l'épissage alternatif d'ARN messagers spécifiques. Ainsi une altération de l'épissage du canal chlore musculaire *CLCN1* peut expliquer la myotonie des patients DM. Toutefois, de nombreux points restent à élucider. Ainsi, les causes de la faiblesse et de l'atrophie musculaire sont potentiellement reliées à des altérations de l'épissage de *DHPR (CACNA1S)*, *RYR1*, *SERCA (ATP2A1)*, *DMD* et *BIN1* (Nakamori et al., 2013). Toutefois, ces altérations d'épissage chez la souris peuvent expliquer des anomalies structurelles du muscle, mais ne reproduisent pas, ou que très partiellement, une faiblesse ou une atrophie musculaire (Kimura et al., 2009; Fugier et al., 2011; Tang et al., 2012; Rau et al., 2015; Sultana et al., 2016). Les causes et les mécanismes moléculaires conduisant à l'atrophie et la faiblesse musculaire chez les patients DM restent donc à clarifier. Ceci est d'autant plus important que cette atrophie musculaire est la première cause de décès chez ces patients.

Durant ma thèse je me suis donc intéressé à identifier, par séquençage ARN à haut débit, de nouvelles altérations de l'épissage alternatif dans des échantillons de muscle squelettique de patients DM1 comparés à des échantillons contrôles. Cette approche m'a permis de déterminer de façon précise et globale les altérations d'épissage se produisant dans les muscles de patients DM.

Parmi ces altérations, je me suis ensuite plus particulièrement intéressé aux conséquences pathologiques d'une dérégulation de l'épissage de l'exon 7 de *BIN1*. En effet, cette protéine est indispensable pour le muscle squelettique, où elle maintient la structure correcte des tubules-T, qui sont des invaginations membranaires, essentielles au couplage entre l'excitation et la contraction musculaire. L'étude de *BIN1* est d'autant plus pertinente du fait que des mutations du gène *BIN1* sont responsables d'une pathologie humaine, la myopathie centronucléaires (Nicot et al., 2007), dont les caractéristiques sont similaires aux dystrophies myotoniques (faiblesse et atrophie musculaire, présence de noyaux centraux en l'absence de régénération,

altération des tubules-T, etc.). De plus, la dérégulation de l'épissage des exons 7 et 11 de *BIN1* corrèle avec la faiblesse musculaire chez les patients DM (Nakamori et al., 2013), suggérant que ces épissages altérés puissent être de bons candidats pour expliquer la faiblesse musculaire des patients DM. Toutefois, la perte de l'exon 11 de *Bin1* chez la souris ne conduit qu'à une faiblesse musculaire modérée, sans atrophie musculaire et sans présence notable de noyaux centraux (Fugier et al., 2011). De même, chez l'Homme, si une perte complète de l'exon 11 de *BIN1* conduit à une CNM, une diminution de 50%, qui est plus proche des niveaux observés chez les patients DM, ne semble pas avoir d'effet délétère notable (Böhm et al., 2013). Les exons 7 et 11 de *BIN1* étant altérés chez les patients DM, nous nous sommes donc demandés si, outre l'exon 11, l'altération de l'épissage de l'exon 7 de *BIN1* pouvait aussi contribuer à l'atrophie et la faiblesse musculaire observées chez les patients DM1. Cette hypothèse est renforcée par une étude d'interactomique à haute échelle suggérant que la présence de l'exon 7 de *BIN1* renforce l'interaction de la protéine BIN1 avec la dynamine 2 (Ellis et al., 2012), une protéine partenaire importante pour la scission des tubules membranaires et dont le gène est aussi muté dans les CNM (Bitoun et al., 2005). Mes travaux ont donc consisté, grâce à la combinaison de techniques *in vitro* et *in vivo*, à clarifier l'importance de l'inclusion de l'exon 7 de *BIN1* pour la faiblesse et l'atrophie musculaire dans les dystrophies myotoniques.

Enfin, nous avons établi des lignées de souris transgéniques exprimant des répétitions CUG ou CCUG dans le but d'obtenir de nouveaux modèles murins des DM1 et DM2.

Matériels et Méthodes

Cette partie décrit succinctement les techniques qui n'apparaissent pas dans la publication.

Chapitre I. Matériels

I.A. Lignées de cellules COS-1, Neuro2A et de myoblastes immortalisés.

Les cellules sont maintenues à une température de 37°C, sous atmosphère humide avec 5% de CO₂, elles sont réensemencées avant confluence. La lignée cellulaire COS-1 (ATCC) est cultivée en flasque de 75 cm² dans le milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) avec 1 g/L de glucose et 5% de sérum de veau foetal supplémenté de 40 µg/mL de gentamycine. La lignée de cellules Neuro2A (ATCC) est cultivée en flasque de 75 cm² avec surface CellBIND (Corning) dans le milieu MEM (Minimum Essential Medium) avec sels de Earle supplémenté de 10% de sérum de veau foetal, d'acides aminés non essentiels, d'1 mM de pyruvate de sodium et de 40 µg/mL de gentamycine. Les myoblastes immortalisés issus d'un patient contrôle (MbCTL-48) ou d'un patient DM1 portant plus de 2000 répétitions CTG (MbDM1-6) nous ont été fournis par le Dr. Furling (Institut de myologie, Paris). Ces cellules sont cultivées en flasques de 75 cm² dans un milieu spécifique pour les myoblastes appelé « Skeletal Muscle Cell Growth Medium » (Promocell) dilué moitié/moitié avec du milieu Ham F10, supplémenté avec un mélange de 2,5% de sérum de veau foetal « Promocell » et 17,5% de sérum classique, des suppléments (Promocell) et enfin 40 µg/mL de gentamycine.

I.B. Plasmides

Les plasmides CUG⁹⁶⁰, et v5-CUGBP1 nous ont été fournis par Tom Cooper (Baylor College of Medicine, Houston). Les plasmides CCUG¹²⁰⁰ et v5-MBNL1 40kDa nous ont été fournis respectivement par Partha S. Sarkar (UTMB Neurology, Texas) et Nicolas Sergeant (UMR 837, Lille). Le plasmide GFP-BIN1 +/- exon 7 a été cloné à partir d'ADN complémentaire de *BIN1* humain contenant ou non l'exon 7 dans le plasmide pEGFP-C1 (Clontech).

I.C. Oligodésoxynucléotides

Gene	Amorce sens	Amorce anti-sens
<i>BIN1</i> ex7 humain	ACTATGAGTCTCTCAAACCGCC	TCCACGTTTCATCTCTCGAACACC
<i>BIN1</i> ex11 humain	TCAATGATGTCTGGTCAGC	GTCATGGTTCACCTGTGATC
<i>SERCA1</i> ex22 humain	GCTCATGGTCTCAAGATCTCAC	GGGTCAGTGCCTCAGCTTTG
<i>Bin1</i> ex7 souris	ACTACGAGTCCCTTCAAACCTGCC	TCCACATTCATCTCTCAAACACC
<i>Sorbs1</i> ex27 souris	CCAGCTGATTACTTGGAGTCCACAGAAG	GTTACACCTTCATACCAGTTCTGGTCAATC
<i>Serca1</i> ex22 souris	GCTCATGGTCTCAAGATCTCAC	AGCTCTGCCTGAAGATGTGTAC
<i>DNM2</i> ex 10 / 10bis humain	CGAGAAGGACTTACGACGGG	AGTGGTGACGATTCTGCTCTG
<i>DNM2</i> ex 13bis humain	GCACGCAGCTGAACAAGAAG	TTGTTGATGGTCAGCCAGCC
Minigène <i>BIN1</i> v.1	CATTCACCACATTGGTGTGC	AAGTGATCCTAGACTAGCCGCC
Minigène <i>BIN1</i> v.2	AGAGAACCCACTGCTTACTGGC	AGATGGCTGGCAACTAGAAGGC
<i>BIN1</i> domaine CLAP (ex 13-16)	ATCAGAGTCAACCACGAGCC	TTCACCTGCCGCCGCTCTC
Génotypage LOX (transgène)	GGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACC	GGCCGGCCGAATTTCGATCTAGCTTGGG
Génotypage <i>Rosa26</i>	TGTTATCAGTAAGGGAGCTGCAG	ACACACCAGGTTAGCCTTTAAGCC
qPCR <i>DMPK</i> humain (exon 9)	GGCTCGAGACTTCATTCAGC	TTCGAAATCCGGTGTAAAGG
qPCR transgène souris DM1	GACCGCGTTACTCCACA	GAAGTTATATTTCCCGCGGTATC
qPCR <i>Mbn1</i> souris	CGGGACACAAAATGGCTAAC	TTGCAGTCTCTCTGGAGCA
qPCR <i>Mbn2</i> souris	TTTTCCACATCCTCCAAAG	GAATGTGTGAGCAAGCAGGA
qPCR <i>Celf1</i> souris	GTAAGTTTGCCGACACCCA	CAAGTGTGTTCCAGACCAGCC
qPCR <i>Rlp0</i> souris	GAAGTCACTGTGCCAGCCCA	GAAGGTGTAATCCGCTCCA

I.D. Anticorps

L'anticorps monoclonal de souris anti-GFP (Abcam, ab1218) a été utilisé à une dilution de 1/4000 pour les western-blots. L'anticorps monoclonal de souris anti-BIN1 [99D] (Abcam, ab10532) reconnaît l'exon 17 de BIN1 et a été utilisé à une dilution de 1/2000 pour les western-blots. Les anticorps monoclonaux de souris (clones 4A9-1 et 1H1-2) dirigés contre l'exon 7 de *BIN1* ont été produits par la plateforme de production d'anticorps monoclonaux de l'IGBMC et ont été utilisés à une dilution de 1/1000 pour les western-blots. L'anticorps secondaire anti-souris couplé à la peroxydase (Jackson ImmunoResearch) a été utilisé à une dilution de 1/4000.

I.E. Oligodésoxynucléotides antisens (ASO)

I.E.1) Dirigés contre *BIN1* humain

Ces ASO ont été utilisés afin de favoriser l'inclusion de l'exon 7 (exon-keeping) dans le transcrit *BIN1*, en masquant les sites introniques de fixation de MBNL1, qui est un répresseur de l'épissage de cet exon. Ces ASO ont été synthétisés par Eurogentec et portent un squelette de type phosphorothioate ainsi que des groupements 2'-O-Methyl sur toute leur longueur.

ASO 1 :	5'- GCAGCACAGGGGGCCCAGCAAGCA -3'	24nt
ASO 2 :	5'- GAACUCCAACUGCAGAGGCAAAG -3'	24nt
ASO 3 :	5'- CAGAGACACACAGAUUAAAUGCA -3'	23nt
ASO 4 :	5'- GACCAGGGAGGUGGGGAGAGA -3'	21nt
ASO 5 :	5'- CAGACCGGAAGGCGCCAGCA -3'	20nt
ASO 6 :	5'- GCAUUCACCGCAGGGCGAGAGGA -3'	24nt

I.E.2) Dirigés contre *Bin1* murin

Ces ASO dirigés contre la séquence de *Bin1* murin ont été testés sur des cellules C2C12, dans l'optique d'une utilisation *in vivo* chez la souris. Ils sont modifiés chimiquement de la même manière que les ASO humain ci-dessus.

ASOmmu 1	5'- AAGCAGGAUAGAGGGGUUUAGCACA -3'	25nt
ASOmmu 2	5'- GGUGUCGAACUGCACAACAGCUA -3'	23nt
ASOmmu 3	5'- GACUCCCACCCAAGUGGGUGUGGA -3'	24nt
ASOmmu 4	5'- CCAACCCCCAAGGCUGAGAAAA -3'	22nt
ASOmmu 5	5'- GGAGGCAGGCCUGCAGCAGGUG -3'	22nt
ASOmmu 5A	5'- UGCAGCAGGUGUGGCCUCUC -3'	20nt
ASOmmu 5B	5'- AGCCCCCAUCUGGAGGCAGGCC -3'	22nt
ASOmmu 6	5'- CACACUCCCAUGCAGAGAAAGACA -3'	24nt

I.F. DNAzymes

Trois DNAzymes ont été utilisées pour cliver l'ARN *DMPK* endogène dans les myoblastes immortalisés issus de patients DM1, elles ont été synthétisées par Eurogentec. Ces molécules portent un groupement 2'-O-Methyl sur les 4 bases en 5' et les 4 bases en 3' afin d'augmenter leur stabilité.

Upstream DNAzyme (DZ1, située en 5' des répétitions CTG) :

5' - CAGCAGCAGCAGCAGT CCGAGCCGGACGAGGCATTCCCGGCTACAA - 3'

CUG DNAzyme (DZ2, située à l'intérieur des répétitions CTG) :

5' - CAGCAGCAGCAGCAGT CCGAGCCGGACGAGCAGCAGCAGCAGCAG - 3'

Downstream DNAzyme (DZ3, située en 3' des répétitions CTG) :

5' - GGTCTGTGATCCCCCT CCGAGCCGGACGAGCAGCAGCAGCAGCAG - 3'

Ces DNAzymes portent une boucle catalytique conservée (entourée en noir) qui a été choisie en accord avec la publication de Santoro & Joyce, 1997. De plus, la base T en appariement « flottant » avec une base G de l'ARN cible apparaît en rouge. Les séquences de chaque côté de la boucle catalytique s'apparient à l'ARN cible. Pour obtenir les DNAzymes mutées, la base T (en rouge ci-dessus) a été mutée en C (mutation T→C), ce qui suffit à annuler l'activité catalytique de ces DNAzymes, d'après la publication de Y. Wu et al., 1999.

I.G. Tampons et solutions d'usage courant

TBE : 89 mM Tris-HCl pH 8,3 - 89 mM acide borique - 2 mM EDTA.

Bleu de charge ADN (6x) : 30% Glycérol - 0,025 % bleu de bromophénol - 0,025 % bleu de xylène cyanol.

Bleu de charge protéines (4x) : 200 mM Tris-HCl pH 6,8 - 8% SDS - 40% Glycerol - 400 mM DTT- 0,1% bleu de bromophénol.

Tampon d'extraction des protéines (RIPA) : 50 mM Tris-HCl pH 7,5 – 150 mM NaCl - 0,5% NP40 - Cocktail d'inhibiteur de protéases ajouté extemporanément (Complete EDTA-free, Roche) à raison d'une tablette pour 10 ml de tampon.

Tampon de migration western-blot : 50 mM MOPS - 50 mM Tris-HCl pH 7,7 - 0,1% SDS - 1 mM EDTA.

Tampon de transfert western-blot : 25 mM Tris - 190 mM Glycine - 20% Ethanol.

TBS : 24,8 mM Tris - 137 mM NaCl - 2,7 mM KCl.

TBS-T : TBS supplémenté avec 0,1% de Tween-20.

PBS : 137 mM NaCl - 2,7 mM KCl - 10 mM Na₂HPO₄ - 1,76 mM KH₂PO₄.

Milieu LB (Luria Bertani) : peptone pancréatique animale 5 g/l - peptone tryptique de caséine 5 g/l - extrait de levure 5 g/l - NaCl 10 g/l. Le pH est ajusté à 7,5, puis le milieu est autoclavé.

Chapitre II. Méthodes

II.A. Extraction d'ARN totaux

Les tissus ou cellules sont mis en présence de TRI-Reagent (MRC) à raison d'1 ml pour 50 mg de tissu ou 5×10^6 cellules (un puits de plaque 6 puits) et sont broyés mécaniquement. On prélève le lysat et on y ajoute 200 µl de chloroforme. Les tubes sont centrifugés 10 minutes à 4°C à 12000 rpm. Le surnageant contenant les ARN totaux est prélevé dans un nouveau tube, auquel on ajoute 500 µl d'isopropanol. La précipitation des ARN est réalisée par une centrifugation de 15 minutes à 4°C à 12000 rpm. Le surnageant est éliminé pour ne garder que le culot qui correspond aux ARN. Le culot est lavé avec de l'éthanol 80% puis séché avant d'être resuspendu dans de l'eau ultra pure. Le dosage des ARN est effectué avec un spectrophotomètre ND-1000 (Nanodrop).

II.B. Test d'épissage par RT-PCR

La transcription inverse (RT) est effectuée en utilisant comme matrice 500 ng d'ARN totaux. Il est ajouté 100 ng d'amorces aléatoires (Random hexaprimer, Invitrogen). L'hybridation des ARN avec les amorces est effectuée par une incubation à 65°C pendant 10 min puis les échantillons sont laissés 5 min dans la glace. Par la suite on ajoute les composants nécessaires à la RT : les quatres dNTP à 1 mM chacun, 0,5 unité/µl de la Reverse Transcriptase « Transcriptor » (Roche) et le tampon de l'enzyme dans un volume final de 20µl. On incube ensuite les échantillons dans un thermocycleur pendant 10 min à 25°C, puis la synthèse d'ADN complémentaire est réalisée à 55°C pendant 30 min et enfin l'enzyme est dénaturée par une incubation de 5 min à 85°C.

La PCR qui suit est réalisée en utilisant 1/10^{ème} du volume de la réaction RT, on ajoute ensuite 0,4 µM de chacun des deux oligodésoxynucléotides (sens et anti-sens), ainsi que les 4 dNTP à 0,2 mM chacun, 0,05 unités/µl de l'ADN polymérase « Taq » (Roche) et le tampon de l'enzyme (formule propriétaire). Le cycle PCR est effectué comme suit : 3 min à 94°C suivi de 26 cycles de [30 sec à 94°C, 30 sec à 60°C et 30 sec à 72°C] ainsi qu'une étape finale de 5 min à 72°C.

Les échantillons issus de la PCR sont fractionnés sur un gel à 8% d'acrylamide non dénaturant (acrylamide bis-acrylamide 29:1 8%, TBE, TEMED 0,06%, APS 0,1%). La migration est effectuée à 150 V dans un tampon de migration TBE. Le gel est ensuite coloré dans un bain de bromure d'éthidium (BEt) dilué à 1/10000. Après trois rinçages à l'eau distillée pour éliminer l'excès de BEt, la révélation est réalisée à l'aide du scanner à fluorescence Typhoon 8600 (GE Healthcare). La quantification des bandes est effectuée à l'aide du logiciel ImageQuant. Le pourcentage d'épissage est déduit grâce à la formule suivante :

$$\% \text{ exon} = \frac{\text{intensité bande exon inclus}}{\text{somme de l'intensité des bandes exon inclus + exon exclu}} \times 100.$$

II.C. PCR en temps réel (qPCR)

Les qPCR ont été réalisées en plaques 96 puits où chaque puits est composé de 10 ng d'ADNc, de 0,3 µM d'amorce sens et anti-sens et de 10 µl de Lightcycler 480 SYBR green master mix (Roche) pour un volume final de 20 µl. Le programme PCR appliqué est le suivant : 10 min à 95°C suivi de 50 cycles de [10 sec à 95°C, 15 sec à 58°C et 20 sec à 72°C]. Les amorces ont été choisies de manière à respecter une longueur comprise entre 18 et 20 pb, une taille d'amplicon de 100 à 200 pb et un pourcentage en GC compris entre 40 et 60%.

Les résultats obtenus sont des courbes de fluorescence ou « d'amplification » sur lesquelles on applique la méthode des « Delta Ct ». La valeur Ct est définie comme le nombre de cycle auquel la courbe d'amplification atteint le seuil de fluorescence qui se situe dans la phase exponentielle. Cette valeur est d'autant plus basse que le gène amplifié est exprimé. Ces valeurs sont ensuite normalisées par rapport au gène de référence *Rlp0*, dont l'expression reste constitutive. On obtient la valeur ΔCt qui est utilisée pour comparer les conditions entre elles.

II.D. Transfection

Les transfections sont réalisées sur environ 5×10^5 cellulesensemencées en plaques 6 puits. Lorsque les cellules atteignent environ 80% de confluence, le milieu de culture est remplacé par un milieu avec sérum réduit à 0,1% et sans antibiotique. Après 1h d'incubation, la transfection est réalisée à l'aide de lipofectamine 2000 (Thermofischer) selon le protocole qui suit. D'un côté, les ADN et/ou les siRNA sont ajoutés à 150 μ L d'opti-MEM (Gibco), et, d'un autre côté, 10 μ L de lipofectamine est ajouté à 150 μ L d'opti-MEM. Les deux préparations sont ensuite combinées, après 5 min d'incubation à température ambiante, le mélange est ajouté goutte à goutte sur les cellules en culture. Après 24h de transfection, les cellules sont rincées au PBS puis récupérées pour préparer les ARN totaux ou les extraits protéiques selon les protocoles correspondants.

II.E. Western-Blot

Pour les tests préliminaires de l'anticorps anti-exon 7 de BIN1, des cellules COS-1 ont été transfectées avec 1 μ g de plasmide GFP-BIN1 contenant ou non l'exon 7. Par la suite, un tampon d'extraction des protéines (RIPA) a été ajouté aux cellules préalablement rincées au PBS. Après 30 min d'incubation sur glace pour lyser les cellules, les échantillons sont centrifugés à 13000 rpm pendant 10 min afin de culoter les débris membranaires. Enfin, le surnageant contenant les protéines est réservé dans un nouveau tube et la concentration en protéines est évaluée par la méthode de Bradford. Après ajout de bleu de charge à une quantité de 10 μ g de protéines, les échantillons sont dénaturés à 95°C pendant 3 min, incubés dans la glace 5 min puis centrifugés à 13000 rpm pendant 5 min. Les protéines sont ensuite séparées sur un gel à gradient de concentration 4-12% bis-Tris (NuPAGE), dans un tampon de migration MOPS SDS (NuPAGE), avec en parallèle un marqueur de poids moléculaire (PageRuler, MBI Fermentas). La migration est effectuée à 180 V pendant environ 1h30. Les protéines sont alors transférées sur une membrane de nitrocellulose de 0,45 μ m (Whatman Protan) à 100 V constant pendant 1h dans du tampon de transfert western-blot. Le chargement équivalent est vérifié par coloration de la membrane au rouge Ponceau, après lavage à l'eau distillée, les sites aspécifiques sont bloqués par une incubation de la membrane sur la nuit en présence de TBS-T supplémenté de 5 % de lait demi-écrémé. Par la suite, l'anticorps primaire est incubé pendant 1h avec la membrane dans du TBS-T supplémenté de 0,5% de lait demi-écrémé. Après 3 lavages

avec du TBS-T de 5 min sous agitation, la membrane est incubée pendant 1h avec l'anticorps secondaire dilué dans du TBS-T supplémenté de 0,5% de lait demi-écrémé. Après 3 nouveaux lavages avec du TBS-T de 5 min sous agitation, la membrane est incubée dans une solution de luminol et de substrats peroxydase mélangés à volume égal et provenant du kit Immobilon Western (Millipore). Finalement, la révélation du blot est réalisée à l'aide d'une caméra LAS600 (Amersham).

II.F. Clonages

Les clonages des minigènes de *BIN1* exon 7 ont été réalisés à partir d'ADN génomique humain pour amplifier les exons 6 à 8 avec les introns 6 et 7 de *BIN1*. L'amplification a été effectuée par PCR avec l'ADN polymérase haute-fidélité « Phusion » (ThermoScientific) selon le protocole suivant : 0,5 μ M de chacun des deux oligodésoxynucléotides (sens et anti-sens), les 4 dNTP à 0,2 mM chacun, 0,02 unités/ μ L de Phusion et le tampon de l'enzyme. Le cycle PCR est effectué comme suit : 1 min à 98°C suivi de 30 cycles de [30 sec à 98°C, 30 sec à 60°C et 1 min à 72°C] ainsi qu'une étape finale de 5 min à 72°C. La taille des produits PCR est vérifiée sur gel d'agarose 1% et le reste de la PCR est purifié à l'aide du kit « Nucléospin Gel and PCR Clean-Up » (MACHEREY-NAGEL). La digestion des produits PCR ainsi que du plasmide de destination (pCDNA3.1, Clontech pour le minigène v.2) est réalisée avec 0,04 unités/ μ L de chaque enzyme de restriction (Biolabs) avec le tampon correspondant pendant 3h à 37°C. La digestion du plasmide seulement est suivie d'une déphosphorylation avec 1,5 unités de phosphatase alcaline (FastAP, Fermentas) pendant 30 min supplémentaires à 37°C. Les digestions sont ensuite déposées sur gel d'agarose 1% ultra pur (Invitrogen), les bandes correspondants aux ADN d'intérêts sont découpées au scalpel sous UV et purifiées à l'aide du kit « Nucléospin Gel and PCR Clean-Up » (MACHEREY-NAGEL). Les ligations sont réalisées à 16°C sur la nuit en combinant 200 ng de plasmide de destination avec 40 ng de produit PCR digérés ainsi que 30 unités/ μ L de T4 DNA Ligase (Biolabs) avec le tampon de l'enzyme contenant de l'ATP dans un volume final de 20 μ L. La moitié de la réaction est utilisé pour transformer des bactéries compétentes XL10 (Agilent) par choc thermique (30 sec à 42°C puis 2 min dans la glace). Ensuite, la régénération des bactéries est réalisée en ajoutant du milieu LB sans antibiotique et par leur incubation à 37°C pendant 1h30. Ces préparations sont étalées sur boîte de pétri avec milieu gélosé additionné de 100 μ g/ml d'ampicilline. Après une incubation à 37°C sur la nuit, les

colonies sont repiquées etensemencées dans du milieu LB supplémenté en ampicilline. Les bactéries sont cultivées à 37°C sous agitation pendant la nuit. L'ADN plasmidique est ensuite extrait avec le kit « Nucleospin plasmid » (MACHEREY NAGEL) et la présence de l'insert d'intérêt est vérifié par digestion puis par séquençage (entreprise GATC). Les cultures positives sont amplifiées dans un plus grand volume de milieu LB avec antibiotique afin d'obtenir une quantité suffisante d'ADN plasmidique à l'aide du kit « NucleoBond Xtra Midi » (MACHEREY-NAGEL). La qualité et la concentration de l'ADN ainsi obtenu sont vérifiées sur le spectrophotomètre ND-1000 (Nanodrop).

Résultats

Chapitre I. Manuscrit :

Splicing misregulation of *BIN1* exon 7

contributes to muscle weakness and atrophy in Myotonic Dystrophy.

Michel Ney¹, Laura Smith², Masayuki Nakamori³, Emilie Chautard⁴, Kuang-Yung Lee⁵, Angeline Gaucherot¹, Nadia Messaddeq¹, Serge Vicaire¹, Bernard Jost¹, Mustapha Oulad-Abdelghani¹, Adolfo Lopez de Munain⁶, Bjarne Udd⁷⁻⁹, Benedikt Schoser¹⁰, Giovanni Meola¹¹, Didier Auboeuf⁴, Maurice S. Swanson¹², Eric Wang¹², Masanori P. Takahashi³, Denis Furling¹³, Alan H. Beggs², Karim Hnia^{1,14#}, Nicolas Charlet-Berguerand^{1#}.

1. Department of Translational Medicine, IGBMC, INSERM U964, CNRS UMR7104, Université de Strasbourg, Illkirch, France.
2. Division of Genetics and Genomics, The Manton Center for Orphan Disease Research, Boston Children's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA.
3. Department of Neurology, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan.
4. Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France.
5. Department of Neurology, Chang Gung Memorial Hospital, Keelung, Taiwan.
6. Department of Neurology, Hospital Universitario DONOSTIA, Neuroscience Area. Institute Biodonostia CIBERNED and University of Basque Country UPV-EHU. San Sebastián, Spain.
7. Neuromuscular Research Center, Tampere University and University Hospital, Finland.
8. Department of Medical Genetics, Folkhälsan Institute of Genetics, Helsinki University, Finland.
9. Department of Neurology, Vaasa Central Hospital, Vaasa, Finland.
10. Friedrich Baur Institute, Ludwig Maximilian University, Munich, Germany.
11. Department of Biomedical Sciences for Health, University of Milan, IRCCS Policlinico San Donato, Italy.
12. Department of Molecular Genetics and Microbiology, Center for NeuroGenetics and the Genetics Institute, University of Florida, College of Medicine, Gainesville, FL, USA.
13. Sorbonne Universités UPMC Univ Paris 06, INSERM, CNRS, Centre de Recherche en Myologie UMRS974/FRE3617, Institut de Myologie, GH Pitié-Salpêtrière, Paris, France.
14. I2MC, INSERM UMR 1048, Toulouse, France.

Corresponding authors.

ABSTRACT

Myotonic dystrophy (DM), the most common muscular dystrophy in adults, is caused by mutant RNAs containing expanded CUG or CCUG repeats that sequester the muscleblind-like (MBNL) splicing regulators, resulting in alternative splicing alterations that are ultimately responsible of DM symptoms. Muscle weakness and atrophy is the first cause of death in DM. Using RNA sequencing, we identified here novel splicing alterations in DM skeletal muscle samples, including an abnormal inclusion of the normally neuronal-restricted exon 7 of *BIN1*. Bridging integrator 1 is a protein specialized in membrane curvature that is essential for the integrity of muscle T-tubules. Mutations in the *BIN1* gene cause centronuclear myopathy (CNM), which shares common histopathological features with DM. We found that MBNL1 regulates alternative splicing of *BIN1* exon 7 and that inclusion of this exon enforces protein interaction of BIN1 with dynamin 2 (DNM2), a GTPase involved in membrane remodeling and whose gain-of-function mutations cause CNM. Injection of the different splicing variants of *BIN1* in zebrafish demonstrated that inclusion of exon 7 alters BIN1 function. Importantly, expression of BIN1 with its exon 7 in mice is sufficient to recruit DNM2 to T-tubules, induces membranes alterations, muscle fiber atrophy and ultimately skeletal muscle weakness. In conclusion, we propose that misregulation of the alternative splicing of *BIN1* is a key pathogenic event participating to muscle wasting in myotonic dystrophy.

INTRODUCTION

Alternative splicing generates multiple mRNA transcripts from a single pre-mRNA, hence vastly extending the coding capacity of a given genome. Recent reports estimate that up to 95% of human multi-exon genes produce two or more mRNA splice variants, with a majority yielding an average of eight variants (Wang et al., 2008; Castle et al., 2008). Regulation of alternative splicing requires the recruitment of numerous RNA-binding proteins to nascent pre-mRNAs, and alterations in the activities of these trans-acting factors are associated with a number of human diseases, such as spinal muscular atrophy (SMA), amyotrophic lateral sclerosis (ALS), oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) and myotonic dystrophy (DM) (review in Cooper et al., 2009).

Myotonic dystrophy (DM), the most common dystrophy in adults, is an autosomal disorder characterized by skeletal muscle myotonia, atrophy and weakness, heart conduction defects and others features such as ocular cataract, insulin resistance, cognitive dysfunctions and IgG diminution. DM encompasses two genetically distinct forms. Myotonic dystrophy of type 1 (DM1) and its severe congenital form (CDM1) are caused by an expansion of CTG repeats in the 3'-untranslated region of the *DMPK* gene, while myotonic dystrophy of type 2 (DM2) is caused by an expansion of CCTG repeats within the first intron of the *CNBP* gene (Brook et al., 1992; Fu et al., 1992; Mahadevan et al., 1992; Liquori et al., 2001). These expanded CTG and CCTG repeats are transcribed into pathogenic RNA (Mankodi et al., 2000), which interfere with the splicing of other pre-mRNAs through dysfunction of two classes of RNA binding proteins (Philips et al., 1998; Miller et al., 2000). Expression and phosphorylation of the CUG-binding protein 1 (CUGBP1) are increased in heart samples of DM1 individuals (Kuyumcu-Martinez et al., 2007), whereas splicing regulators from the Muscleblind-like family (MBNL1, MBNL2 and MBNL3) are enrolled within the nuclear RNA foci formed by the expanded CUG and CCUG repeats, and thus titrated away from their normal pre-mRNA targets (Miller et al., 2000; Ho et al., 2004; Goodwin et al., 2015). Remarkably, knockout mice for *Mbnl1* and/or *Mbnl2* show salient features of DM (Kanadia et al., 2003; Charizanis et al., 2012; Lee et al., 2013), and overexpression of MBNL1 corrects muscle and splicing alterations in mice expressing expanded CTG repeats (Kanadia et al., 2006). Alterations of the functional levels of MBNL and CUGBP1 proteins in myotonic dystrophic tissues results in specific alternative splicing changes, such as in the insulin receptor (*INSR*), pyruvate kinase M (PKM), muscle chloride channel (*CLCN1*) and cardiac sodium channel (*SCN5A*), which are associated with the perturbed glucose metabolism, myotonia and cardiac electrical alterations observed in DM, respectively (Savkur et al., 2011; Gao and Cooper, 2013; Mankodi et al., 2002; Charlet et al., 2002; Wheeler et al., 2007; Freyermuth et al., 2016).

In contrast, the molecular origins of muscle weakness and atrophy, which is the prime cause of death in DM, remain poorly defined. Various splicing alterations have been observed in skeletal muscle of individuals with DM (Nakamori et al., 2013). However, splicing changes in the dystrophin (*DMD*), sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase SERCA1 (*ATP2A1*), ryanodine receptor 1 (*RYR1*), calcium channel Cav1.1 (*CACNA1S*) and bridging integrator 1 (*BIN1*) are associated with only limited changes of skeletal muscles structure and function (Rau et al., 2015; Nakamori et al., 2007; Kimura et al., 2005; Tang et al., 2012; Fugier et al., 2011). Interestingly, muscle alterations in DM are reminiscent to those observed in centronuclear myopathy (CNM), namely muscle fibers atrophy with centrally located nuclei in absence of regeneration. CNM are caused by mutations in the myotubularin (*MTM1*), dynamin 2 (*DNM2*) and bridging integrator 1 (*BIN1*) genes (Laporte et al., 1996; Bitoun et al., 2005; Nicot et al., 2007; Böhm et al., 2014). *BIN1*, also named amphiphysin 2, is a protein specialized in membrane curvature, which function is regulated by tissue-specific alternative splicing. Indeed, neuronal-specific inclusion of exon 7 and of the successive exons 13 to 16, which are encoding a clathrin and AP2 binding domain, generates a splicing form of *BIN1* involved in endocytosis (Ramjaun et al., 1997; Butler et al., 1997; Wechsler-Reya et al., 1997). In contrast, in skeletal muscles, inclusion of the muscle-specific exon 11 that encodes a phosphoinositide binding domain, generates an isoform of *BIN1* that induces membrane tubular invaginations and is consequently crucial for the generation and maintenance of the muscle T-tubule network (Lee et al., 2002; Royer et al., 2013). Muscle T-tubules are specialized membrane structures fundamental for excitation-contraction (E-C) coupling, and decreased expression of *BIN1* in animal models or humans leads to T-tubules alterations, muscle atrophy and weakness (Razzaq et al., 2001; Tjondrokoesoemo et al., 2011; Böhm et al., 2013; Smith et al., 2014).

Others and we reported that alternative splicing of *BIN1* exon 11 is altered in DM1, resulting in expression of an altered *BIN1* isoform with reduced ability to bind to phosphoinositide (Fugier et al., 2011; Nakamori et al., 2013). However, partial skipping of *BIN1* exon 11, as observed in DM individuals, has only subtle and limited adverse consequences on muscle fiber size and strength in zebrafish and mouse model organisms, as well as in CNM individuals (Fugier et al., 2011; Böhm et al., 2013; Smith et al., 2014). Here, we identified by RNA sequencing novel splicing changes in skeletal muscle samples of DM1 individuals. Among these alterations, we focused on the abnormal inclusion of *BIN1* exon 7. This exon is normally present only in the nervous system where it contributes to the endocytosis regulatory function of *BIN1* (Ellis et al., 2012). We found that alternative splicing of *BIN1* exon 7 is regulated by MBNL1 and MBNL2, the splicing regulators titrated by expanded CUG and CCUG repeats in DM. Also, we confirmed that exon 7 reinforces the interaction of *BIN1* with dynamin 2 (*DNM2*), a GTPase protein promoting membrane fission and whose gain-of-function mutations cause CNM. Importantly, the ectopic expression of *BIN1* with its

exon 7 in the skeletal muscle of Bin1-knockdown zebrafish revealed that inclusion of exon 7 alters BIN1 function. We confirmed these results in mice, where expression of BIN1 exon 7 causes characteristic pathological features of CNM or DM, namely T-tubules alterations, muscle atrophy and weakness. Finally, expression of BIN1 with its exon7 in mouse skeletal muscle promotes abnormal recruitment of DNM2 to T-tubules and leads to morphological alterations of this specialized muscle excitation-contraction coupling compartment. Altogether our data reveal a major and conserved role of BIN1 in muscle physiology and underlie that the alteration of *BIN1* alternative splicing is a key pathogenic event participating to muscle wasting in DM.

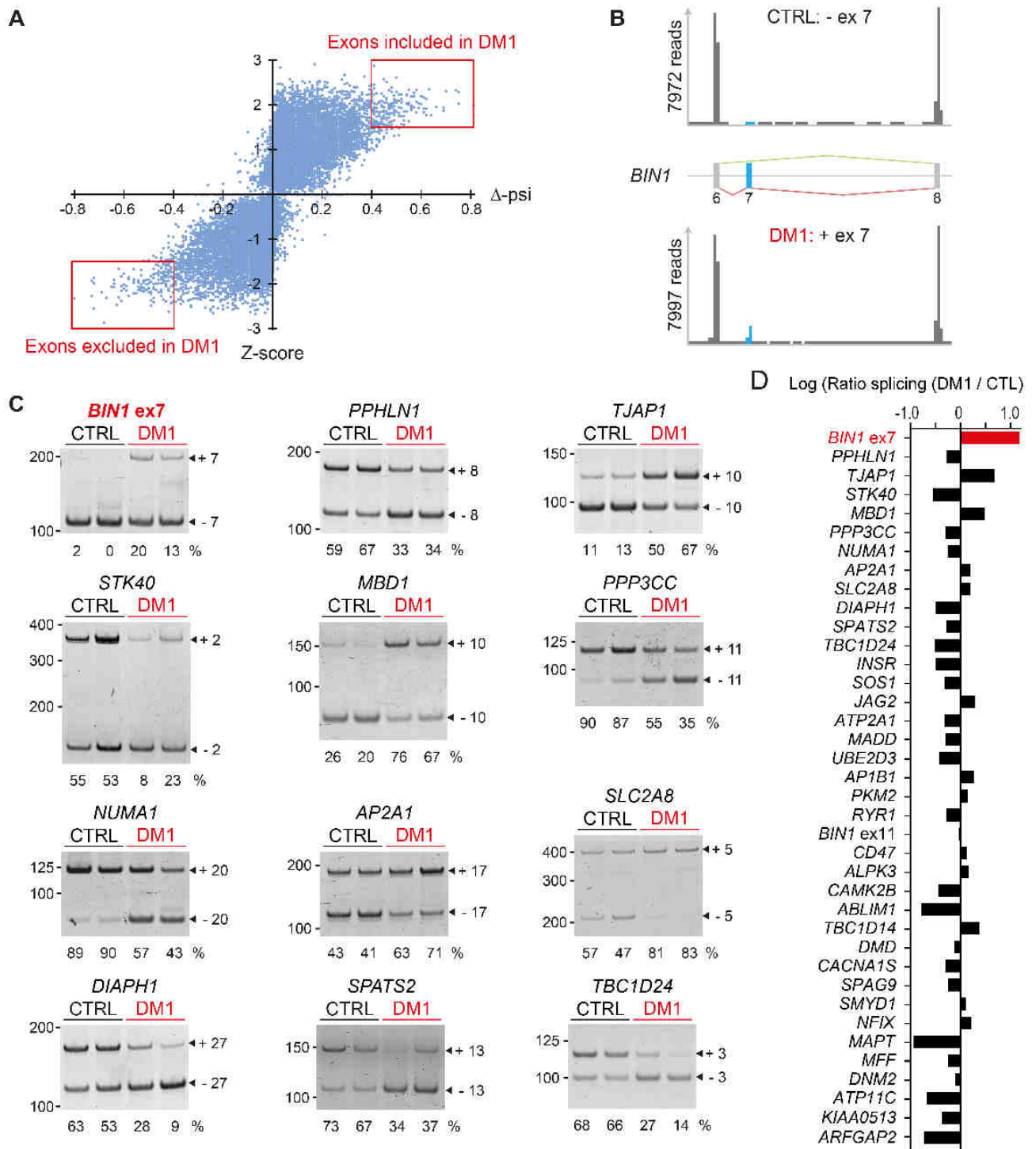


Figure 1: Identification of splicing alterations in DM1 skeletal muscle.

(A) Scatter plot illustrating the difference of splicing (Δ -psi) between control ($n = 3$) and DM1 ($n = 3$) skeletal muscle samples versus Z-score predicted by MISO. Boxes indicate cassette exons significantly included or excluded in DM1 muscles (Δ -psi > 0.4 and Z-score > 1.5). (B) RNA-sequencing reads coverage of *BIN1* exons 6 to 8 in control and DM1 muscle samples. (C) RT-PCR validation of splicing alterations predicted by RNA-sequencing in skeletal muscle samples of control individuals (CTRL, black) and DM1 patients (DM1, red). The percentage of exon inclusion is indicated at the bottom of each gel. Molecular sizes are indicated in base pairs on the left of each gel. (D) Graphical representation of the ratio of the percentage of splicing alteration in DM1 over control.

RESULTS

Identification of splicing changes in skeletal muscle of DM1 individuals.

To identify novel splicing abnormalities in DM1 muscles, we performed paired-end RNA sequencing (RNA-seq) on polyadenylated RNA extracted from distal skeletal muscle samples of three adult DM1 patients compared to three age-matched control individuals. In total we obtained 935 and 820 millions 100 bp paired-end reads for adult DM1 and control skeletal muscle samples, respectively. MISO bioinformatic analysis, which computes the fraction of mRNA including a given cassette alternative exon (Katz et al., 2010), predicted 422 significant ($\Delta\text{PSI} \geq 0.4$; Z-score ≥ 1.2) alternative splicing changes between control and DM1 muscle samples (**Figure 1A and supplementary data 1**). This analysis confirmed the abnormal inclusion of *BIN1* exon 7 in DM1 skeletal muscle samples (**Figure 1B**), which was validated by RT-PCR analysis (**Figure 1C**). We similarly confirmed splicing alterations for 35 other mRNAs (**Figure 1C and supplementary figure 1**), including some identified in previous studies (*INSR*, *ATP2A1*, *RYR1*, *CACNA1S*, *DMD*, *PKM2*, etc.) as well as others that represent to the best of our knowledge novel alterations of alternative splicing in DM1 (*TJAP1*, *STK40*, *MBD1*, *PPP3CC*, *AP2A1*, *SLC2A8*, *DIAPH1*, *SPATS2*, etc.). Interestingly, splicing index calculated as the log of the ratio of exon inclusion in DM1 over control revealed that *BIN1* exon 7 was among the top exons misregulated in DM1 due to its quasi null inclusion in control individuals (**Figure 1D**). As splicing change in *BIN1* exon 7 correlates with muscle weakness in DM1 (Nakamori et al., 2013), and mutations in the *BIN1* gene cause CNM (Nicot et al., 2007), a muscle disease with histopathological features similar to DM, we decided to investigate further the splicing alteration of *BIN1* exon 7 in DM1 muscle.

Altered splicing of *BIN1* exon 7 in skeletal muscle of DM individuals and models.

To confirm the abnormal inclusion of *BIN1* exon 7 in skeletal muscle of individuals with DM, we investigated its alternative splicing by RT-PCR in a larger number of samples (**Figure 2A**). Exon 7 was absent from skeletal muscle of adult individuals with no muscle disease (n=4) or amyotrophic lateral sclerosis (n=3). In contrast, exon 7 was abnormally included into *BIN1* mRNA in DM1 with an inclusion of 20% in adults (n=7) but reaching 50 to 70% in congenital cases (n=6). Slight inclusion of *BIN1* exon 7 is also perceptible in control fetuses, which is consistent with the model that DM1 reflects a return to an embryonic splicing regulation. In contrast, *BIN1* exon 7 was mostly absent from skeletal muscle of individuals with DM2 (n=10). To confirm integrity of these DM2

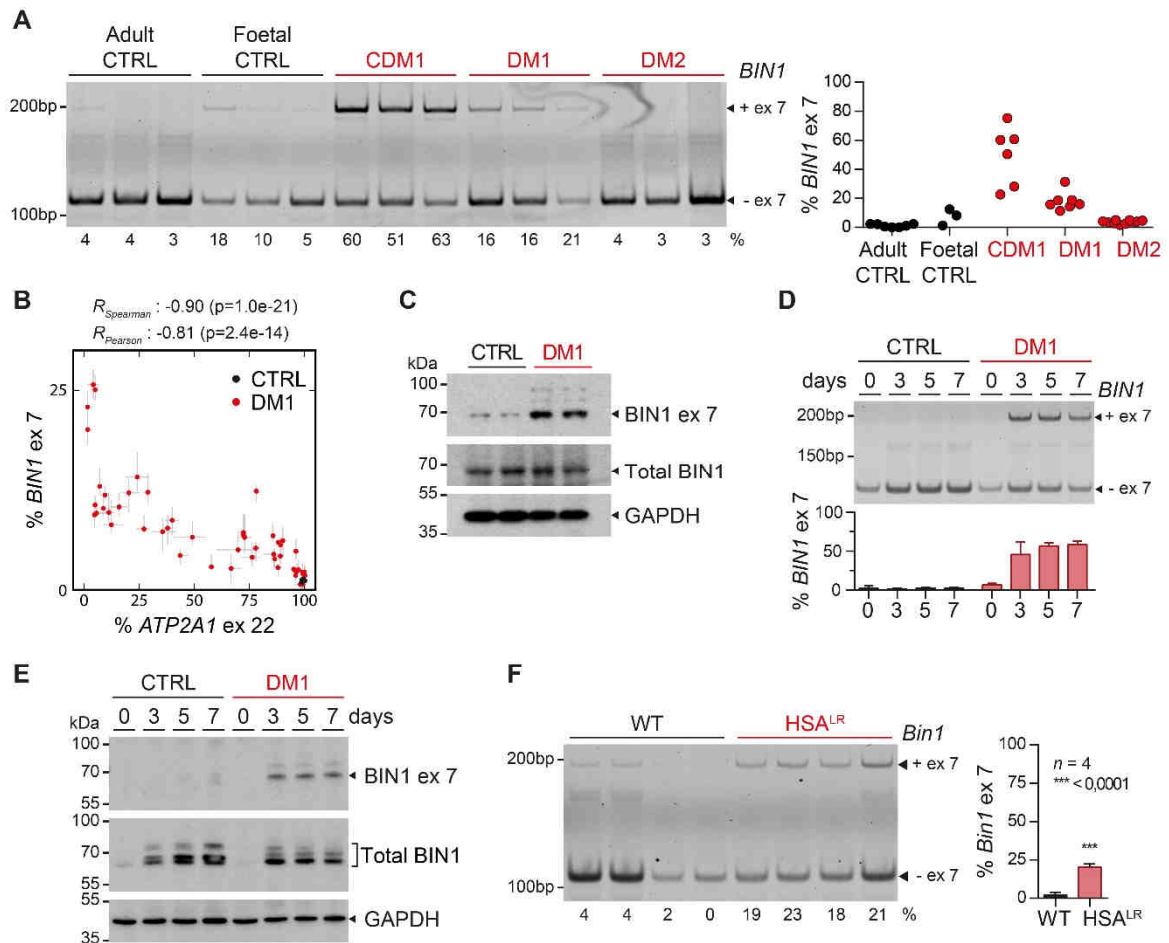


Figure 2: *BIN1* exon 7 is included in skeletal muscle of DM1 individuals and models.

(A) Left panel, RT-PCR analysis of *BIN1* exon 7 inclusion in human skeletal muscle samples of control adult (CTRL), non-DM fetuses (18, 27 and 28 weeks), congenital DM1 fetuses (CDM1 of 18, 28 and 33 weeks), adults DM1 and DM2 individuals. The percentage of exon 7 inclusion is indicated at the bottom of the gel. Molecular sizes are indicated in base pairs on the left of the gel. Right panel, graphical dot representation of the percentage of *BIN1* mRNA including exon 7 in skeletal muscle samples of adult individuals either with no muscle disease ($n=4$) or with amyotrophic lateral sclerosis ($n=3$) (CTL), foetal controls ($n=3$), CDM1 ($n=6$) and adult DM1 ($n=7$) and DM2 ($n=10$) individuals. (B) Correlation between alterations of the alternative splicing of *ATP2A1* exon 22 and *BIN1* exon 7 in skeletal muscle samples of DM1 individuals (splicing alterations from Nakamori et al., 2013). (C) Immunoblotting against BIN1 exon 7, BIN1 exon 17 or GAPDH in skeletal muscle from control and DM1 individuals. Molecular sizes are indicated in kilodalton on the left of the gels. (D) Upper panel, RT-PCR analysis of *BIN1* exon 7 inclusion in 0, 3, 5 and 7 days differentiated primary muscle cell cultures originating from biopsies of control or DM1 individuals. Lower panel, quantification of the percentage of *BIN1* mRNA including exon 7. Bars indicate s.e.m with $n=2$ independent cell cultures. (E) Immunoblotting against BIN1 exon 7, BIN1 exon 17 or GAPDH in differentiated primary muscle cells cultures derived from control or DM1 individuals. (F) Left panel, RT-PCR analysis of *BIN1* exon 7 inclusion in tibialis anterior muscles of control non-transgenic or HSA^{LR} mice. The percentage of exon 7 inclusion is indicated at the bottom of the gel. Molecular sizes are indicated in base pairs on the left of the gel. Right panel, quantification of the percentage of *BIN1* mRNA including exon 7. Bars indicate s.e.m with $n=4$ different mice in each groups. Student's t-test, *** indicates $P < 0.0001$.

samples, we tested by RT-PCR an alternative splicing event (exon 22 of *ATP2A1*, also named SERCA1) known as classically altered in DM. *ATP2A1* splicing was only mildly altered in our DM2 samples compared to DM1, which is consistent with the milder severity and later age of onset of DM2 compared to DM1 (**supplementary figure 2A**). Thus, presence of *BIN1* exon 7 grossly correlates with severity of DM as it is more included in the severe congenital CDM form compared to the later-onset and milder DM2 form. This is consistent with the correlation between inclusion of *BIN1* exon 7 and muscle weakness identified previously in adult DM1 (Nakamori et al., 2013). Taking advantage of this larger set of DM1 patients (Nakamori et al., 2013), we noted that the extent of *BIN1* exon 7 abnormal inclusion was correlated with other splicing altered in DM, such as *ATP2A1* exon 22 or *BIN1* exon 11 (**Figure 2B and supplementary figure 2B**). These analyses were performed on mRNA, which may only partly reflect BIN1 protein alteration. Thus, to confirm presence of BIN1 exon 7 at the protein level, we developed a monoclonal antibody specific to the 31 amino acids encoded by *BIN1* exon 7 (**supplementary figure 2C**). Immunoblotting confirmed RT-PCR results with a large increase of exon 7 inclusion in BIN1 protein in DM1 compared to control skeletal muscle samples (**Figure 2C**). *BIN1* exon 7 is normally present only in the nervous system, where it contributes to the endocytosis regulatory function of BIN1 (Ellis et al., 2012). Thus, the abnormal inclusion of exon 7 observed in DM muscle samples may originate from an alteration of the nervous system innervating the skeletal muscles. To discriminate between muscle cell and non-muscle cell autonomous mechanisms, we tested the alternative splicing of *BIN1* exon 7 in cultures of primary muscle cells isolated from control or DM1 individuals. RT-PCR assays revealed that inclusion of exon 7 is negligible in control muscle cultures but reaches 50 to 60% in differentiated DM1 muscle cells (**Figure 2D**). Immunoblotting confirmed specific inclusion of exon 7 in BIN1 protein in DM1 myotubes compared to control myotubes (**Figure 2E**). As control, alternative splicing of *ATP2A1* exon 22 and *BIN1* exon 11 were also altered in DM1 muscle cells compared to control cells (**supplementary figure 2D and 2E**). Finally, we tested misregulation of *Bin1* exon 7 in a mouse model of DM1 expressing expanded CUG repeats only in skeletal muscle (HSA^{LR} mice, Mankodi et al., 2000), thus excluding any potential side effect from changes in others tissues than muscle. Similarly to primary muscle cell culture, *Bin1* exon 7 was observed only in HSA^{LR} mice and not in control non-transgenic animals (**Figure 2F**). As control, alternative splicing of *Atp2a1* exon 22 was also altered in HSA^{LR} mice (**supplementary figure 2F**). Overall, these results suggest that inclusion of exon 7 of *BIN1* is misregulated in DM1 skeletal muscle.

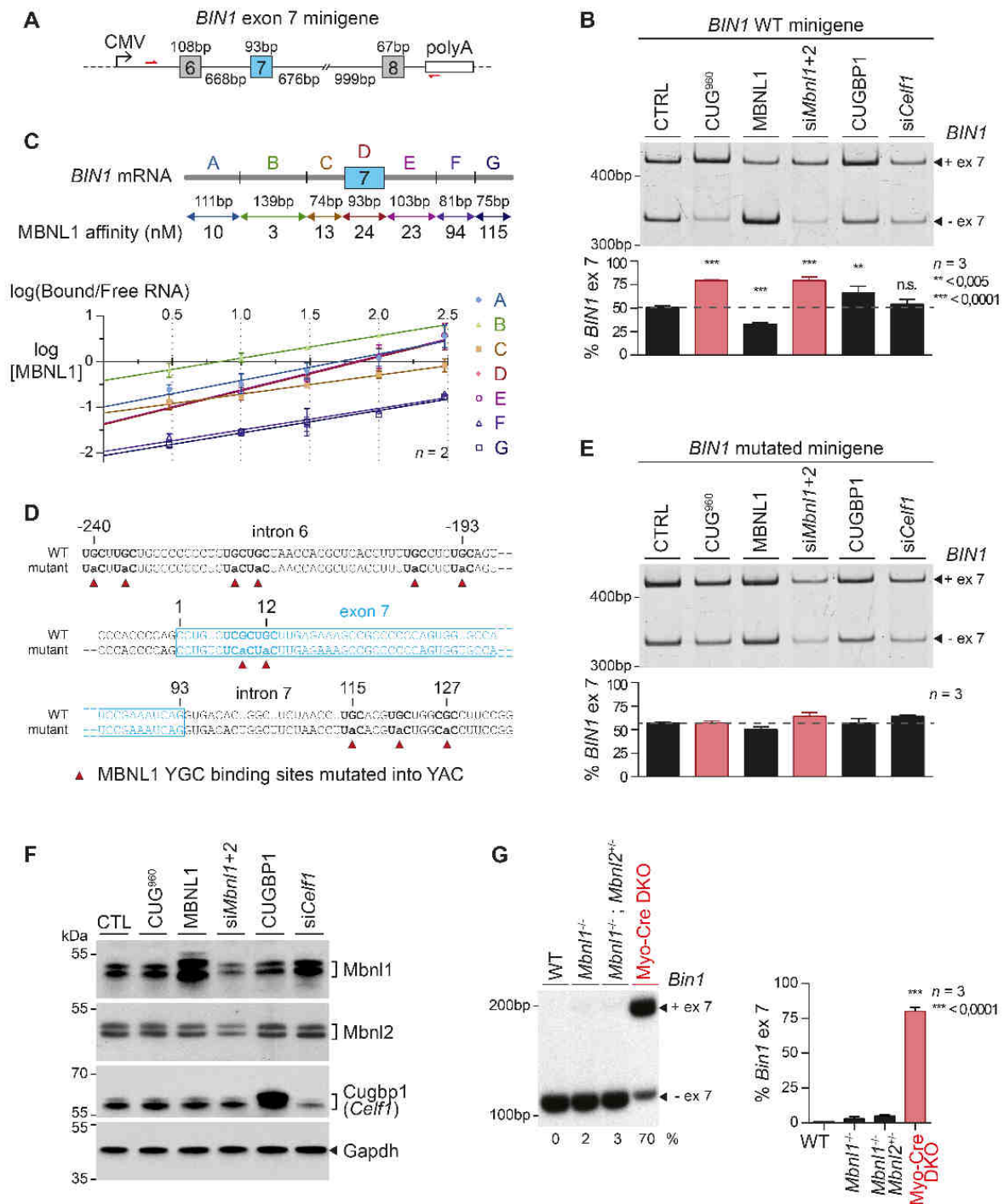


Figure 3: MBNL1 regulates *BIN1* exon 7 alternative splicing.

(A) Schematic representation of *BIN1* minigene encompassing exons 6 to 8 with their introns 6 and 7. Primers for RT-PCR analysis of exon 7 inclusion are indicated by red arrows. (B) Upper panel, RT-PCR analysis of *BIN1* minigene exon 7 inclusion in Neuro2A cells co-transfected with *BIN1* minigene and with either a plasmid expressing 960 CTG repeats, MBNL1, CUGBP1, or with siRNA directed against *Mbn1* and *Mbn2* mRNAs (siMbn1+2) or *Celf1* (encoding Cugbp1; siCelf1) mRNA. Lower panel, percentage of *BIN1* minigene exon 7 inclusion. Bars indicate s.e.m with n=3 independent transfection experiments. Student's t-test, ** indicates P < 0.005, *** P < 0.0001. (C) Upper panel, schematic representation of the *BIN1* RNA sequence tested in gel-shift assays. Size of RNA fragments and affinity of MBNL1 are indicated. Lower panel, hill plots of MBNL1 binding to *BIN1* RNA fragments. Bars indicate s.e.m with n=2 independent experiments. (D) Sequence comparison of WT and mutated *BIN1* exon 7 minigenes. MBNL1 binding sites (YGC sequences) are indicated in bold, mutations are indicated by red arrowheads. (E) Splicing analysis as in (B) but with a mutant minigene

where MBNL1 YGC RNA binding sites described in (D) are mutated in YaC. (F) Immunoblotting against Mbnl1, Mbnl2, Cugbp1 and Gapdh in Neuro2A cells co-transfected as in (B). (G) Left panel, RT-PCR analysis of *Bin1* exon 7 inclusion in skeletal muscle samples of wild-type, single Mbnl1 knockout mice (*Mbnl1^{-/-}*), double Mbnl1 homozygous and Mbnl2 heterozygous knockout mice (*Mbnl1^{-/-}; Mbnl2^{+/-}*) and double Mbnl1 homozygous and skeletal muscle specific-Mbnl2 homozygous knockout mice (Myo-Cre DKO). Right panel, percentage of *Bin1* ex 7 inclusion. Bars indicate s.e.m with n=3 different mice in each groups. Student's t-test, *** indicates $P < 0.0001$.

Alternative splicing of *BIN1* exon 7 is regulated by MBNL proteins.

Expanded CUG repeats alter pre-mRNA alternative splicing through dysfunction of the CUGBP1 and MBNL proteins. To clarify the mechanisms underlying the abnormal inclusion of *BIN1* exon 7 in DM1, we constructed a minigene containing human *BIN1* exons 6 to 8 (**Figure 3A**), which we co-expressed in Neuro2A cells with different vectors expressing either expanded CUG repeats, MBNL1 or CUGBP1 (**Figure 3B**). Over-expression of ~1000 CUG repeats reproduced DM1 situation and induced exon 7 inclusion. Similarly, depletion of endogenous Mbnl1 and Mbnl2 expression by siRNA mimicked the effect of CUG repeats and promoted exon 7 inclusion, whereas over-expression of MBNL1 inhibited it (**Figure 3B**). Of technical interest, the sole depletion of either Mbnl1 or Mbnl2 expression by siRNA had little effect and depletion of both Mbnl1 and Mbnl2 expression was required to alleviate MBNL inhibitory action. In contrast, over-expression or depletion of CUGBP1 had little regulatory effect on the alternative splicing of *BIN1* exon 7, suggesting that MBNL proteins are the main regulators of *BIN1* exon 7 alternative splicing. To determine whether MBNL regulation is direct or indirect we tested whether MBNL1 binds directly to *BIN1* pre-mRNA. Gel-shift assays revealed that purified recombinant GST-tagged MBNL1 binds to UGC intronic RNA sequences located upstream of *BIN1* exon 7 (**Figure 3C and supplementary figure 3A**). Mutation of these UGC motifs abolished MBNL1 binding (**Figure 3D and supplementary figure 3B**), as well as the inhibitory effect of MBNL1 on a mutant *BIN1* minigene (**Figure 3E**). Interestingly, mutation of MBNL1 binding sites abolished the responsiveness of the *BIN1* exon 7 minigene to MBNL1, but also to expanded CUG repeats (**Figure 3E**), demonstrating that the pathogenic effect of expanded CUG repeats on *BIN1* splicing mis-regulation requires functional MBNL1 binding sites. Immunoblotting analysis confirmed MBNL1 and CUGBP1 overexpression and that siRNA transfection efficiently reduced Mbnl1, Mbnl2 or Cugbp1 endogenous expression (**Figure 3F**). Finally, we assessed *Bin1* exon 7 inclusion in *Mbnl* knockout mice (Lee et al., 2013). RT-PCR analysis shows that inclusion of *Bin1* exon 7 is largely increased in skeletal muscle samples of *Mbnl1* and *Mbnl2* double knockout mice (Myo-CRE DKO; **Figure 3G**). However, *Bin1* exon 7 is not misregulated in skeletal muscles of the sole Mbnl1 knockout mice (*Mbnl1^{-/-}*) or in compound mice with no Mbnl1 and reduced level of Mbnl2 (*Mbnl1^{-/-}, Mbnl2^{+/-}*),

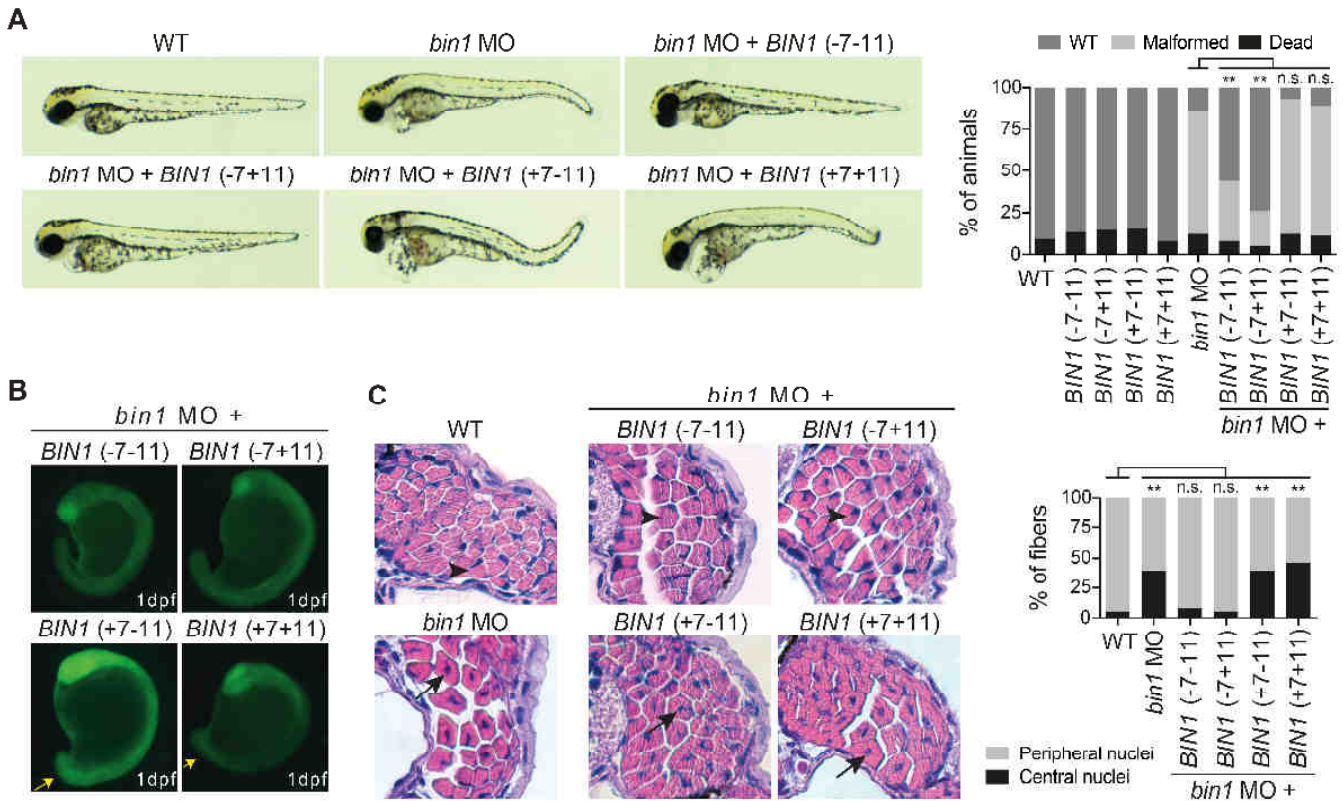


Figure 4: BIN1 with its exon 7 presents an altered function in zebrafish.

(A) Left panel, morphological analysis of 3 dpf zebrafish larvae co-injected with antisense morpholino against *Bin1* and GFP-tagged BIN1 isoforms with or without exons 7 and 11. Right panel, quantification of morphological changes. Bars indicate s.e.m with n=3 different injections in each groups. Student's t-test, ** indicates $P < 0.005$. (B) Morphological analysis of 1 dpf zebrafish larvae co-injected with antisense morpholino against *Bin1* and GFP-tagged BIN1 isoforms with or without exons 7 and 11. Yellow arrows indicate abnormally short and bend tails. (C) Left panel, Hematoxylin and eosin analysis of transversal muscle sections of 3 dpf zebrafish larvae co-injected with antisense morpholino against *Bin1* and GFP-tagged BIN1 isoforms with or without exons 7 and 11. Black arrows indicate abnormal centrally localized nuclei. Right panel, proportion of muscle fibers with centrally located nuclei. Student's t-test, ** indicates $P < 0.005$.

suggesting that repression of *BIN1* exon 7 is remarkably sensitive to even low quantity of Mbnl proteins (**Figure 3G**). Overall, these results establish that MBNL1 directly regulates alternative splicing of *BIN1* exon 7.

BIN1 with exon 7 presents altered function in zebrafish.

Abnormal inclusion of *BIN1* exon 7 in DM1 is one alternative splicing alteration identified among many others, thus questioning the importance of *BIN1* misregulation to muscle pathology in myotonic dystrophy. Reduced expression of *Bin1* in zebrafish induces alterations of the muscle structure and function (Smith et al., 2014). To test the pathological consequences caused by the inclusion of exon 7 into *BIN1* mRNA, we injected the different splicing forms of BIN1 (with and without exon 7, but also with and without exon 11 as control) in wild-type and *Bin1*-knockdown zebrafish. As reported previously (Smith et al., 2014), reduced expression of *Bin1* by antisense morpholinos in zebrafish leads to muscle alterations and morphological changes that can be corrected by injection of RNA expressing control *BIN1* with or without its exon 11 (-7+11 or -7-11). In contrast, injection of RNA expressing *BIN1* with its exon 7 (+7+11 or +7-11) failed to correct the abnormal dorsal curvature induced by loss of *Bin1* expression (**Figure 4A**). We confirmed these results in zebrafish larvae of 1 day post-fertilization, which present shorter and abnormally bended tails upon knockdown of *Bin1* expression (**Figure 4B**). These morphological alterations were rescued by injection of control *BIN1* isoforms (-7 -11 or -7 +11), but not by the *BIN1* exon 7 splicing forms expressed in DM1 (**Figure 4B**). Finally, reduced expression of *Bin1* in zebrafish leads to muscle weakness but also to altered muscle structure including abnormally centrally localized nuclei (Smith et al., 2014), an observation that is reminiscent to the central myonuclei observed in DM1 and CNM pathologies. Importantly, injection of *BIN1* with its exon 7 (either +7 -11 or +7 +11) did not rescue the abnormal nuclei localization in *Bin1* morphants, while injection of *BIN1* control splicing forms (-7 -11 or -7 +11) fully corrected the nuclei localization (**Figure 4C**). Overall, these results demonstrate that inclusion of exon 7 alters BIN1 functions.

Expression of BIN1 with exon 7 leads to muscle weakness and atrophy in mouse muscle.

Results in zebrafish larvae indicate that BIN1 with its exon 7 has little dominant negative deleterious activity (**Figure 4A**). However these analyses were limited to one to three days of BIN1 expression and did not address a potential deleterious effect of exon 7 expression on an extended time period. To further investigate the pathological consequences of *BIN1* splicing misregulations in a mammalian model and on a longer time period, we injected adeno-associated virus (AAV2/9) expressing the different splicing forms of *BIN1* in the tibialis anterior (TA) muscles of adult wild-type mice. To investigate the pathological role of *BIN1* exon 7, but also of its exon 11, which is partly excluded in DM1 (Fugier et al., 2011), we tested two splicing forms expressed in DM1 both

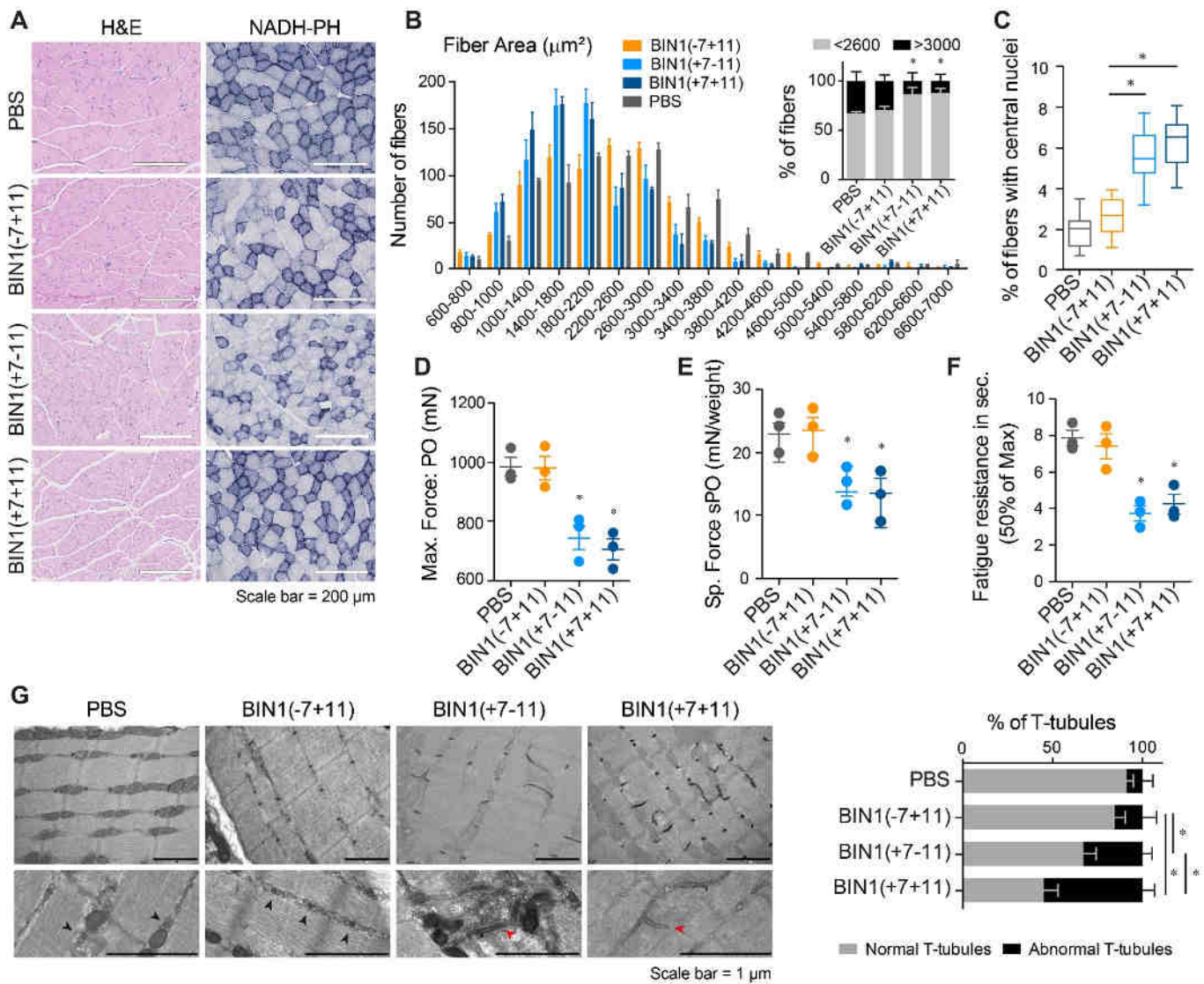


Figure 5: Expression of BIN1 with its exon 7 in mouse skeletal muscle induces T-tubule alterations, muscle atrophy and weakness.

(A) Hematoxylin and eosin and NADH-PH staining of mouse tibialis anterior (TA) muscles injected for 3 months with AAV2/9-BIN1 isoforms with or without exons 7 and 11. Scale bar = 200 μ m. (B) Left panel, muscle fiber area of mouse TA muscles injected for 3 months with AAV2/9-BIN1 isoforms with or without exons 7 and 11. Right panel, quantification of small (< 2600 μ m²) versus large (> 3000 μ m²) muscle fibers. (C) Percentage of fibers with centrally located nuclei in mouse TA muscles injected for 3 months with AAV2/9-BIN1 isoforms with or without exons 7 and 11. (D to F) Muscle absolute maximal force (D), specific maximal force (E) and fatigue resistance (F) were assessed *in situ* in mouse TA muscles injected for 3 months with AAV2/9-BIN1 isoforms with or without exons 7 and 11. (G) Left panel, transmission electron microscopy of potassium ferrocyanide stained mouse TA muscles injected for 3 months with AAV2/9-BIN1 isoforms with or without exons 7 and 11. Black arrowheads shows normal T-tubules whereas red arrowheads shows altered T-tubules. Scale bar = 1 μ m. Right panel, quantification of normal and abnormal T-tubules. For all experiments, bars indicate s.e.m with n=3 independent injections in each groups. Student's t-test, * indicates P < 0.05.

with exon 7 but with or without exon 11 (+7 -11 and +7 +11) that we compared to the control *BIN1* muscle isoform containing exon 11 but lacking its exon 7 (-7 +11). We controlled by histological analyses that ectopic expression of any *BIN1* splicing forms induced no overt toxicity with absence of inflammation or regeneration three months post-AAV injection (**Figure 5A**). Importantly, expression of both *BIN1* isoforms with exon 7 (+7 -11 or +7 +11), but not the control *BIN1* isoform (-7 +11), reproduced some key pathological alterations characteristic of DM1. First, muscle fiber areas were reduced upon expression of *BIN1* exon 7 (with or without exon 11), while the control splicing form of *BIN1* deprived of exon 7 did not induce any muscle fiber atrophy (**Figure 5B**). Next, expression of *BIN1* with exon 7 (+7 -11 or +7 +11), but not the control *BIN1* isoform (-7 +11), increased the number of abnormally centrally localized nuclei (**Figure 5C**). Moreover, both maximum strength, specific force and fatigue resistance were decreased upon expression of *BIN1* with its exon 7 compared to contralateral PBS injected muscle or to muscle injected with control *BIN1* without exon 7 (**Figures 5D to F**). Finally, as *BIN1* is involved in generation and maintenance of the muscle T-tubule network (Lee et al., 2002), we investigated further these structures. Electron microscopy analyses revealed that ~30 to 60% of T-tubules were abnormal with longitudinally orientated, disorganized and irregular membrane structures upon expression of *BIN1* isoforms with its exon 7 (+7 -11 or +7 +11) compared to injection of control *BIN1* isoform (**Figure 5G**). Of interest and as noted in zebrafish, the inclusion or exclusion of *BIN1* exon 11 had only a limited pathogenic effect compared to the presence of exon 7. We repeated these experiments upon a shorter time period of *BIN1* expression. Similarly to the 3 months period, expression of *BIN1* isoforms for 1 month did not induce any overt toxicity (**supplementary figure 4A**). However, in contrast to the 3 months expression, only expression of the splicing form of *BIN1* with exon 7 and without its exon 11 induced mild muscle fiber atrophy (**supplementary figure 4B**) and abnormal nuclei localization (**supplementary figure 4C**) upon a one-month expression period. These results suggest that the splicing form of *BIN1* including exon 7 but lacking exon 11 is likely more toxic than the splicing form with both exons 7 and 11, while expression of the control form (-7 +11) is not pathogenic. Interestingly, we observed that expression of *BIN1* with its exon 7 during one month induced no major muscle weakness, compared to the three months period (**supplementary figure 4D and 4E**). In contrast, a decrease in the resistance to muscle fatigue (**supplementary figure 4F**) and alterations of T-tubule structures were already present upon one-month expression of *BIN1* with its exon 7 (**supplementary figure 4G**). Thus, alteration of the T-tubules network is an early onset defect that precedes apparition of muscle atrophy and weakness. As control, expression of the normal *BIN1* isoform (-7 +11) had no deleterious effects. Overall, these results indicate that expression of *BIN1* with its exon 7 is pathogenic for muscle structure and function and that these alterations progress with time, starting with alterations of the T-tubules network.

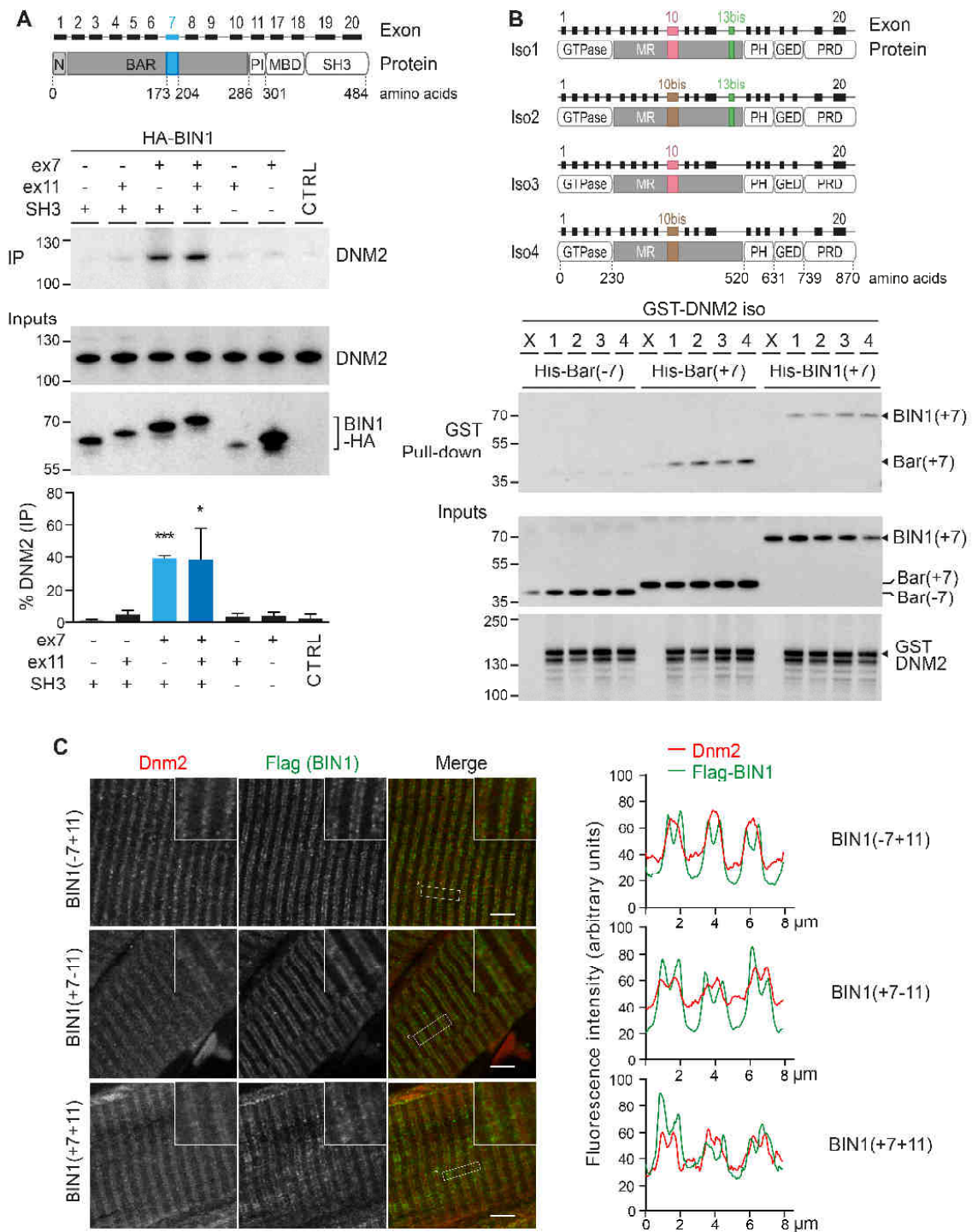


Figure 6: BIN1 exon 7 interacts with DNM2 and affects T-tubule organization.

(A) Upper panel, schematic representation of BIN1 exons structure and protein domains. BAR, Bin/Amphiphysin/Rvs domain; PI, phosphoinositide binding domain; SH3, Src Homology 3 domain. Middle upper panel, immunoblotting against endogenous DNM2 co-immunoprecipitated by HA-tagged BIN1 with or without exon 7 and 11 and its C-terminal SH3 domain. Middle lower panel, immunoblotting against endogenous DNM2 and exogenous BIN1 in COS-1 cell lysates transfected with HA-tagged BIN1 with or without exon 7 and 11 and its c-terminal SH3 domain. Lower panel, quantification of immunoprecipitated DNM2. Bars indicate s.e.m with n=3 independent transfections in each groups. Student's t-test, * indicates $P < 0.05$, *** $P < 0.0001$. (B) Upper panel, schematic representation of DNM2 exons structure, protein domains and splicing isoforms. GTPase, GTPase domain; MR, middle region. GED, GTPase effector domain; PH, pleckstrin homology domain; PRD, proline rich domain. Middle panel, immunoblotting against HIS tag of BIN1

BAR domain with or without exon 7 pull-downed by the various GST-DNM2 isoforms. Glutathione beads used as negative binding controls are noted as X. Lower panel, immunoblotting against HIS and GST tags of HIS-tagged BIN1 BAR domain with or without exon 7 and of the various GST-tagged DNM2 isoforms. (C) Left panel, representative confocal images of immunofluorescence labeling of endogenous Dnm2 and Flag-tagged BIN1 in mouse TA longitudinal sections of muscles injected for 3 months with AAV2/9-BIN1 isoforms with or without exons 7 and 11. Scale bar = 5 μ m. Right panel, fluorescence intensity measurements of DNM2 (red) and Flag-BIN1 (green).

BIN1 exon 7 interacts with DNM2 and alters its localization.

Expression of BIN1 with its exon 7 induces T-tubules alteration, muscle atrophy and weakness, questioning what are the molecular alterations induced by presence of this exon. Exon 7 of *BIN1* encodes 31 amino acids that form an alpha-helix extruded from the crescent-shaped BAR domain (Casal et al., 2006). This exon is reported to interact with DNM2 (Ellis et al., 2012), a large GTPase protein that constricts membrane vesicular necks and which is mutated in the autosomal dominant form of CNM (Bitoun et al., 2005). However, previous reports indicated that BIN1 interacts with DNM2 through binding of BIN1 C-terminal atypical SH3 domain with DNM2 PRD domain (Owen et al., 1998; Nicot et al., 2007). We found by co-immunoprecipitation experiments that both models are correct as deletion of either exon 7 or SH3 domain of BIN1 abolishes interaction of BIN1 with endogenous DNM2 (**Figure 6A**). Interaction of BIN1 exon 7 to DNM2 may be indirect through a third protein partner or any other mechanism. To test direct binding of BIN1 exon 7 to DNM2 we produced and purified the BAR domain of BIN1 with or without exon 7 but deleted of its C-terminal SH3 domain. *In vitro* binding assays indicated that purified recombinant GST-tagged full length DNM2 was able to pull down purified recombinant HIS-tagged BAR domain of BIN1 with its exon 7, but not control BAR domain without exon 7 (**Figure 6B**). As positive control, GST-DNM2 was also able to pull down full length HIS-BIN1 with its exon 7 (**Figure 6B**). *DNM2* is regulated by alternative splicing of its cassette exon 10 and mutually exclusive exons 13a and 13b, we found that all four splicing forms of DNM2 equally interact with the BAR domain of BIN1 with its exon 7 (**Figure 6B**). These results demonstrate that BIN1 exon 7 can directly contact DNM2. The BAR domain of BIN1 without exon 7 assembles in dimers (Casal et al., 2006). However, we noted that the BAR domain of BIN1 including its exon 7 forms mainly tetramers (**supplemental figure 5A**). Beyond DNM2, the SH3 domain of BIN1 can also interact with its own BAR domain to induce an inhibitory conformation preventing deleterious association of BIN1 to non-specific membranes (Kojima et al., 2004; Wu and Baumgart 2014). Thus, we tested whether presence of exon 7 may modulate this mechanism. GST pull down assays demonstrated that inclusion of the exon 7 impairs interaction of BIN1 SH3 domain with its own BAR domain (**supplemental figure 5B**). These data indicate that presence of exon 7 alters BIN1 at multiple levels, notably by potentially reducing its auto-inhibitory regulation while reinforcing its interaction with DNM2. To investigate further the pathological consequences of this interaction, we analyzed the localization of endogenous Dnm2 in skeletal muscle of mice injected with AAV2/9

expressing either the control or the DM1 splicing forms of BIN1. Immunofluorescence followed by confocal microscopy of muscle longitudinal sections indicated that Dnm2 is, as reported previously (Durieux et al., 2010), localized as a single band centered on the muscle Z-line and bordered by the T-tubule marker BIN1 in control non-injected mice or in muscle injected with the control form of BIN1 (-7 +11). In contrast, in muscle injected with *BIN1* with its exon 7 (either +7-11 or +7+11), Dnm2 localization was altered and changed from a single band to a double band co-localizing with BIN1 (**Figure 6C**). As control, the localization of α -actinin (*Actn1*), which is a marker of muscle fiber Z lines, was neither altered in control nor in BIN1 with exon 7 injected muscles (**supplemental figure 5C**). Overall, these results indicate that the *in vitro* binding of BIN1 exon 7 to DNM2 translates into an *in vivo* abnormal tethering of DNM2 to skeletal muscle T-tubules. Mutations that enhance DNM2 membrane-remodeling activity cause CNM (Durieux et al., 2010; Wang et al., 2010; Kenniston and Lemmon, 2010; Cowling et al., 2011; Chin et al., 2015), which are characterized alike DM by T-tubules alterations, muscle atrophy, central nuclei and muscle weakness. Thus we propose that the misregulated inclusion of *BIN1* exon 7 in DM1 is an important pathogenic event in DM and may mediate T-Tubules alterations through abnormal tethering of DNM2 to these membrane structures.

DISCUSSION

Myotonic dystrophy is the most common muscular dystrophy in adults. However, the molecular and cellular mechanisms underlying muscle weakness and atrophy in DM remain ill defined. Using RNA sequencing we identified various novel-splicing changes in skeletal muscle of DM1 patients. Among these alterations, the abnormal inclusion of exon 7 in *BIN1* mRNA is of particular interest. Indeed, mutations in *BIN1* cause centronuclear myopathy (Nicot et al., 2007; Böhm et al., 2014), which shares similar histopathological features with DM. Furthermore, the degree of exon 7 inclusion correlates with muscle weakness in adult DM1 (Nakamori et al., 2013). Similarly, we found that exon 7 inclusion grossly correlates with the severity of the disease between congenital and adult DM forms. Finally, expression of *BIN1* with its exon 7 in mouse skeletal muscle recapitulates key pathological features of DM, including progressive muscle fiber atrophy, centrally localized nuclei and muscle weakness. Overall, these results suggest that inclusion of *BIN1* exon 7 is a key pathogenic mechanism in myotonic dystrophy.

About the molecular mechanisms responsible of the abnormal inclusion of *BIN1* exon 7 in skeletal muscle of DM1, we found that MBNL1 binds to intronic YGC RNA motifs located upstream of exon 7 and inhibits its inclusion. Importantly, *BIN1* exon 7 is included only in Mbnl1 and Mbnl2 double knockout mice or in cells siRNA-depleted for both Mbnl1 and Mbnl2 expression, indicating that repression of *BIN1* exon 7 is sensitive to low levels of Mbnl proteins. Such sensibility may potentially explain the higher inclusion of *BIN1* exon 7 in CDM1 newborns, which typically present larger size of expanded CTG repeats, hence increased titration of MBNL proteins, compared to adults DM1 with lesser number of pathogenic CTG repeats.

BIN1 was reported to bind to DNM2 through its C-terminal SH3 domain (Owen et al., 1998; Nicot et al., 2007) or through its exon 7 (Ellis et al., 2012). Here we found that both results are correct and that presence of exon 7 reinforces the interaction of DNM2 to the atypical SH3 domain of *BIN1*. An interaction between DNM2 and *BIN1* is necessary in neuronal cells, where exon 7 is normally included, to promote constriction and scission of the membrane budding neck of the nascent endosome by DNM2 (Ellis et al., 2012). However, such robust interaction is probably to be avoided in skeletal muscle where *BIN1* and DNM2 are normally localized on different transversal projections and where *BIN1* is fundamental to maintain the long and regular membrane tubular structures forming the T-tubule network (Razzaq et al., 2001; Lee et al., 2002; Tjondrokoesoemo et al., 2011; Böhm et al., 2013; Smith et al., 2014). We noted that DNM2 is abnormally recruited to T-tubules in mice expressing *BIN1* plus exon 7 as early as 1 month post-injection, a time where T-tubules are altered, while muscle weakness is not yet apparent. In CNM, a pathology that presents similar histopathological features than DM, mutations resulting in excess or uncontrolled DNM2 activity lead

to T-tubules alterations and ultimately to muscle atrophy and weakness (Durieux et al., 2010; Wang et al., 2010; Kenniston and Lemmon, 2010; Cowling et al., 2011; Chin et al., 2015). Thus, we propose that the abnormal inclusion of *BIN1* exon 7 in skeletal muscle of DM1 individuals results in the pathological tethering of DNM2 to T-tubules, where its membrane remodeling activity will lead to T-tubules alterations and disorganization, ultimately resulting in muscle atrophy and weakness. This model is consistent with previous finding of T-tubule alterations in DM (Ueda et al., 1999; Fugier et al., 2011), but also highlights that fatal muscle weakness in centronuclear myopathy and myotonic dystrophy, two unrelated genetic diseases but with similar histological features, may also share some common pathogenic mechanisms.

Finally, numerous alternative splicing events are modified in skeletal muscle of individuals with DM1. Notably, others and we reported that exon 11 of *BIN1* is also altered in DM individuals (Fugier et al., 2011; Nakamori et al., 2013). This exon encodes for a phosphoinositide binding domain, and its absence in DM patients generates an isoform of BIN1 with reduce ability to induces membrane tubular invaginations (Fugier et al., 2011). However, individuals with a genetic mutation in the acceptor splice site of *BIN1* exon 11 (IVS11-1G>A), resulting in loss of this exon, present an infant and progressive centronuclear myopathy only in homozygous patients with a complete loss of *BIN1* exon 11 inclusion, while heterozygous parents with a 50% reduction of exon 11 inclusion, a level of splicing alteration typically observed in adult DM1 patients, present no overt symptoms (Böhm et al., 2013). Similarly, forced skipping of *Bin1* exon 11 in mouse skeletal muscle leads only to mild muscle weakness (15% decrease of muscle specific strength), but neither to muscle fiber atrophy nor to centrally located nuclei (Fugier et al., 2011). In contrast, we found in the present study that expressing BIN1 with its exon 7 consistently leads to muscle atrophy, muscle weakness and abnormally located nuclei, demonstrating that inclusion of exon 7 in *BIN1* is probably a key pathogenic event in DM. We also noted that injection of BIN1 construct with exon 7 and absence of exon 11 (+7-11) was mildly more toxic than BIN1 with both exons 7 and 11 (+7 +11), especially at 1 month post-AAV injection. These results suggest that splicing alterations of *BIN1* in DM are complex with both gain and loss of functions due to inclusion of exon 7 but loss of exon 11, respectively (**Figure 7A**). It is also striking to note that beyond BIN1, other key components of the excitation-contraction coupling process including the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase SERCA1 (*ATP2A1*), ryanodine receptor 1 (*RYR1*) and the calcium channel $\text{Ca}_v1.1$ (*CACNA1S* also known as DHPR) show misregulated alternative splicing in DM1 (Kimura et al., 2005; Tang et al., 2012). However, these splicing changes lead individually to only subtle alterations of skeletal muscle functions compared to the muscle atrophy and weakness induced by expression of BIN1 with its exon 7. Thus, it is tempting to propose that cumulative alternative splicing alterations of *CACNA1S*,

RYR1, *ATP2A1* and *BIN1* exons 7 and 11 leads to T-tubules alterations and non optimal excitation-contraction coupling ultimately resulting in muscle atrophy and weakness in individuals with DM (Figure 7B).

In conclusion, our results identified that abnormal inclusion of exon 7 in *BIN1* leads to T-tubules alterations, muscle fiber atrophy and muscle weakness in model organism. These data suggest that alteration of T-tubules and of the excitation-contraction coupling process may underlie muscle weakness in myotonic dystrophy.

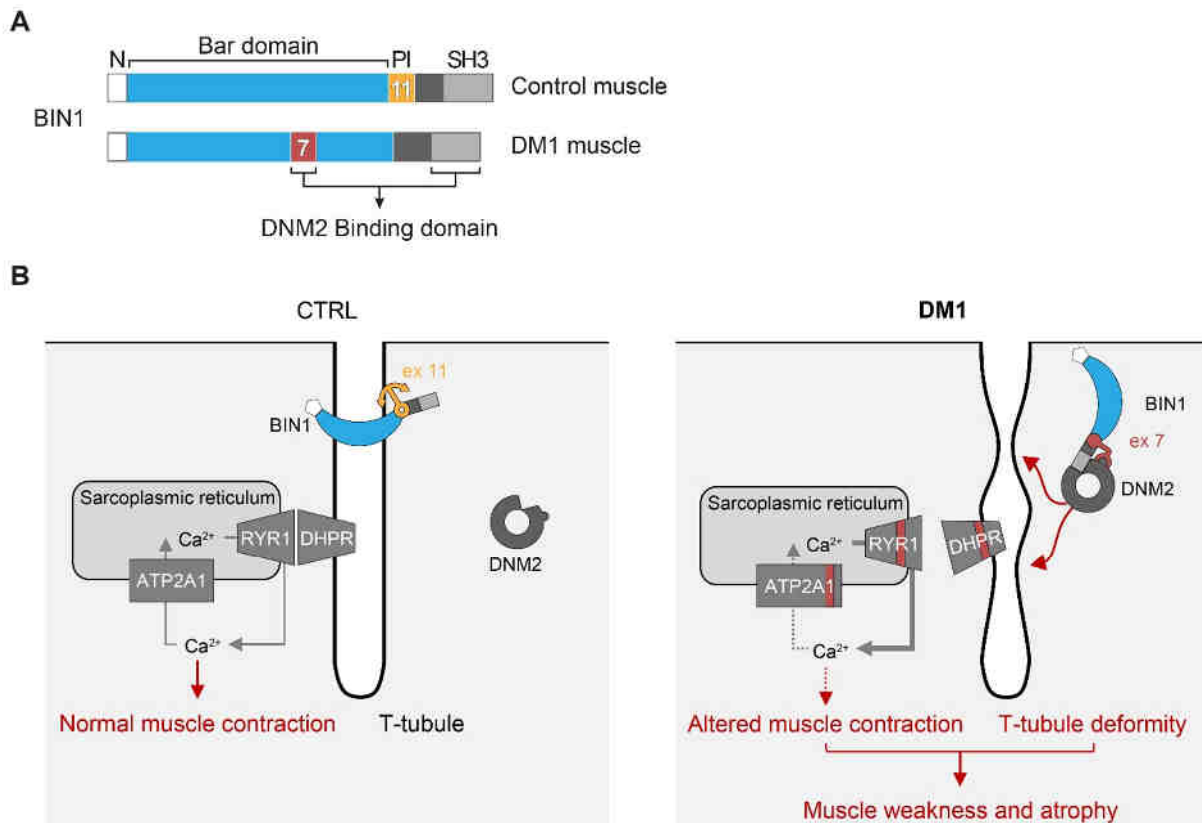


Figure 7: Proposed model of *BIN1* exon 7 splicing alteration in DM1

(A) Schematic representation of *BIN1* isoforms expressed in control or DM1 skeletal muscle. BAR, Bin/Amphiphysin/Rvs domain; PI, phosphoinositide binding domain; SH3, Src Homology 3 domain. (B) In control muscles, *BIN1* with its exon 11 maintains longitudinal and regular T-tubules membrane structures enabling tight contact between the calcium receptors DHPR and RYR1. In DM1 skeletal muscles, titration of the MBNL proteins by mutant RNA containing expanded CUG repeats leads to various alternative splicing alterations, including changes into *BIN1*, DHPR, RYR1 and SERCA1. Abnormal inclusion of *BIN1* exon 7 reinforces interaction of *BIN1* with DNM2, resulting in T-tubules alterations, muscle atrophy and muscle weakness.

METHODS

Human samples.

Human samples were skeletal muscle needle biopsies that were sampled with the informed consent of individuals and approved by the Institutional Review Board of the Hospital at Pitié-Salpêtrière, of the Neuromuscular Research Center of the Tampere University Hospital, of the Hospital Donostia, of the Friedrich Baur Institute, of the IRCCS policlinico San Donato and of the Toneyama National Hospital. Non-affected muscle samples (CTL #1 to #4) were purchased at Ambion. CTL #5 to #7 were patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) described previously (Nakamori et al., *Neurology* 70(9):677–685, 2008). Foetal control and CDM1 samples were described previously (Fugier et al., 2011). Adult DM1 and DM2 samples have been described previously (Nakamori et al., *Neurology* 70:677–685, 2008; Fugier et al., 2011; Schoser et al., *Neurology* 63(12):2402-4, 2004; Udd et al. *Neuromusc Disord* 7:217-228, 1997).

RNA sequencing.

RNA sequencing was performed on distal skeletal muscle samples of adult DM1 and age- and sex-matched controls described previously (Nakamori et al., *Neurology* 70(9):677–685, 2008). After isolation of total cellular RNA from human skeletal muscles samples, libraries of template molecules were created using TruSeq RNA Sample Preparation v2 Kit (ref. RS-122-2001, Illumina) with modifications in the manufacturer's protocol. Briefly, mRNA was purified from 1 µg total RNA using oligo-dT magnetic beads and fragmented using divalent cations at 94°C for 8 minutes. The cleaved mRNA fragments were reverse transcribed to cDNA using random primers, then the second strand of the cDNA was synthesized using Polymerase I and RNase H. The next steps of RNA-Seq Library preparation were performed in a fully automated system using SPRIworks Fragment Library System I kit (ref. A84801, Beckman Coulter) with the SPRI-TE instrument (Beckman Coulter). In this system double stranded cDNA fragments were blunted, phosphorylated and ligated to Illumina indexing adapters and fragments in the range of ~200-400 bp were size selected. The automated steps were followed by PCR amplification (30 sec at 98°C; [10 sec at 98°C, 30 sec at 60°C, 30 sec at 72°C] x 12 cycles; 5 min at 72°C), and then surplus PCR primers and adapter dimers were removed by purification using AMPure XP beads (Beckman Coulter). DNA libraries were checked for quality and quantified using 2100 Bioanalyzer (Agilent). The libraries were sequenced on the Illumina HiSeq 2500 as paired-end 2x100 base reads following Illumina's instructions. Image analysis and base calling were done using RTA 1.17.21.3 and CASAVA.

RNA extraction and RT-PCR analysis.

Total RNA was extracted from samples using TRI Reagent (Molecular Research Center), then 500 ng of RNA was reverse transcribed using 10 units of Transcriptor reverse transcriptase (Roche) with 100 ng of random hexaprimers (Invitrogen) in a final volume of 20 μ l. Alternative splicing tests were carried out by PCR using 2 μ l of cDNA with 2.5 units of Taq DNA polymerase (Roche) with amplification consisting of one denaturation step at 94 °C for 2 min, 26 cycles of amplification 94 °C for 1 min, 60 °C for 1 min, 72 °C for 2 min and a final step at 72 °C for 5 min using the primer described in Tables 1 and 2. PCR products were resolved by electrophoresis using 8% non-denaturing polyacrylamide gel stained by ethidium bromide, washed 3 times in distilled water and revealed with a Typhoon FLA 9500 fluorescence scanner (GE Healthcare). Gels were subsequently quantified with the ImageQuant TL software and the percentage of exon splicing was determined.

Constructions.

Full-length BIN1 isoforms with or without its exon 7 and 11 that all contain exon 17 but lack the neuronal exons 13 to 16 were cloned from BIN1 isoform 8 NM_004305.2 (-ex7, +ex11, -Ex13to16, +ex17) into pcDNA3.1 fused to a C-terminal GFP or HA tag or into pAAV2 fused to a C-terminal Flag tag and were described previously (Fugier et al., 2011). Presence of the alternative BIN1 exon 17 was determinant for further recognition by the anti-BIN1 99D (Abcam ab10532) antibody. Truncated BAR domain constructs with or without exon 7 was cloned into pET28 with a 6xHIS tag.

Cell culture and transfection.

All cells were maintained at 37°C, 5% CO₂. Neuro2A cells (ATCC) were cultured in CellBIND Flasks (Corning) in minimum essential medium Eagle (MEM) with Earle's salts containing 10% foetal calf serum supplemented with non-essential amino acids, 1mM sodium pyruvate and 40 μ g/ml gentamycin. HEK293 and COS-1 cells (ATCC) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 1 g/L glucose and 5% foetal calf serum supplemented with 40 μ g/ml gentamycin. Immortalized myoblasts originating from control and DM1 patients were grown and differentiated as previously described (Furling et al., 2001). Transfections were carried out in medium containing 0.1% serum without gentamycin using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

BIN1 exon 7 splicing reporter.

BIN1 minigene containing exons 6, 7 and 8, as well as full intron 6 and truncated intron 7 was constructed by PCR using human genomic DNA (Clontech) as template and reading proof Phusion DNA polymerase (Thermo Scientific) with the primers MG1 fwd, 5'-AAAGCTAGCTCACGCATTGCCAAGCGGG-3' and MG1 rev, 5'-AAAGCTTCCCCCAGGAACACTGTGGTGC-3' for sequence from exon 6 to intron 7 and primers

MG2 fwd, 5'-AAAAAGCTTGGCCTGAGAACGTGAGGCTGC-3' and MG2 rev, 5'-AAACTCGAGCTGTTCCACAGGGACGGCAGC-3' for BIN1 sequence from intron 7 to exon 8. PCR products were cloned side by side into pcDNA3.1+ vector (Clontech) using NheI with HindIII restriction sites for the first part of the minigene (MG1) and HindIII with XhoI for the second part (MG2). Mutations were performed by primer-directed PCR mutagenesis. Neuro2A cells in 6-well plates were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) with 500 ng of WT or mutated minigene with or without 1.5 µg of DT960, 1.5 µg of v5-MBNL1 40 kDa, 200 pmol of siMbnl1 and siMbnl2 (Dharmacon), 1.5 µg of tgCUGBP1 or 200 pmol of siCelf1 (encoding Cugbp1). RNA were extracted 24 hours after transfection and RT-PCR was performed using MG-splicing fwd 5'-AGAGAACCCACTGCTTACTGGC-3' and MG-splicing rev 5'-AGATGGCTGGCAACTAGAAAGGC-3' primers, localized within the pcDNA3.1 vector to avoid amplification of endogenous Bin1.

Zebrafish analyses.

Zebrafish from the Oregon AB line were staged by hours (hpf) or days (dpf) post-fertilization at 28.5°C. All animal work was performed with approval from the Boston Children's Hospital Animal Care and Use Committee. Antisense morpholinos (GeneTools LLC) targeting Bin1 translational start site 5'-TGACTCCTTTCCCAACCTCTGCCAT-3' or negative control human β-globin (5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3'), which is not homologous to any sequence in the zebrafish genome, were dissolved in 1X Danieau buffer with 0.1% phenol red and 1–2 nl (1–10 ng) injected into the yolk of 1-cell stage embryos. For rescue experiments, mRNA for full length *BIN1* with or without its exon 7 or 11 were synthesized using mMessage kits (Ambion), then 50–200 pg of mRNA was injected into embryos at the 1-cell stage independently or in combination with ATG MO, and subsequent phenotypic analyses performed at 1 or 3 dpf. For H&E staining and analysis, zebrafish embryos were anesthetized and fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde (PFA) diluted in PBS, washed in PBS, dehydrated in alcohols and xylenes, and embedded in paraffin. Microtome sections were cut at 5 µm using a Leica 2255 cryostat (Leica Microsystems) and H&E was performed.

Adeno-Associated Virus (AAV2/9) production and muscle injection.

All animal work was performed with approval from the IGBMC and ICS Animal Care Committee. Recombinant AAV2/9 BIN1 were generated by tri-transfection of HEK293 cells with pAAV2-BIN1 with or without its exon 7 and 11, p5E18-VD29, and pAD-DELTA-F16. Recombinant vectors were purified by double cesium chloride ultracentrifugation gradients from cell lysates, followed by dialysis and concentration against sterile PBS. Particles were quantified by real time PCR and vector titers are expressed as viral genomes per ml (vg/ml). Tibialis anterior (TA) muscles of 5 to 7-week-old mice (129PAS, Charles River) were injected with either 40 µL of sterile PBS or 1x10¹⁰ viral genomes of AAV-BIN1. Animals were housed in a temperature-controlled room (19–22°C) with a

12:12-hours light/dark cycle. One or three months after AAV injection, mice were either perfused with PFA or sacrificed by cervical dislocation in order to dissect TA muscles which were subsequently frozen in nitrogen-cooled isopentane for histology or treated for TEM.

Immunofluorescence and muscle histology.

Tibialis anterior muscles from 4% PFA perfused mice were dissected, embedded in paraffin and cut into 5 μm longitudinal muscle sections. Prior to immunofluorescence, sections were deparaffinized two times for 20 min in Histosol Plus (Shandon) and dehydrated (each step of 5 min) twice in ethanol 100%, twice in ethanol 95%, once in ethanol 80%, once in ethanol 70% and rinsed in PBS. Sections were incubated for 10 min in PBS + 0.5% Triton X-100 and washed three times with PBS. Non-specific sites were blocked in PBS supplemented with 10% foetal calf serum for 1 h. Sections were incubated overnight at 4°C in a humidified chamber with the primary antibody diluted in PBS, 1/200 mouse anti-BIN1 [99D directed against exon 17 of BIN1] (Abcam ab10532), 1/200 rabbit anti-DNM2 [R-2865] (kind gift of Dr. Laporte, IGBMC). Sections were washed twice with PBS before a one-hour incubation with secondary antibodies 1/500 goat anti-mouse Alexa-Fluor 488 (Life Technologies) and 1/500 donkey anti-rabbit DyLight 594 (Thermo Scientific). Sections were rinsed three times before nuclei staining by a 10 min incubation with a 1/10,000 DAPI solution, rinsed twice and mounted in Pro-Long media (Molecular Probes). Fluorescent images acquisitions were realized on a Leica SP8 point-scanning confocal system with an HC PL APO CS2 63x/1.40 OIL objective. Fluorescence intensity quantification was measured using the plot profile function in FIJI image analysis software. For histology, muscle sections were stained with H&E or NADH/PH followed by acquisition using a slide scanner NanoZoomer 2HT (Hamamatsu Photonics). Muscle fibers size and nuclei position were analyzed in transversal H&E sections using FIJI image analysis software.

Transmission electron microscopy.

Muscle samples were fixed in 2.5% glutaraldehyde and 2.5% PFA in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH=7.2) for 24h at 4°C, washed in 0.1M cacodylate buffer for 30 minutes and post-fixed in 1% osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffer for 1 hour at 4°C. For selective staining of T-tubules, the samples were post-fixed with 2% OsO₄, 0.8% K₃Fe(CN)₆ in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) for 2 h at 4 °C and incubated with 5% uranyl acetate for 2 h at 4 °C. Samples were dehydrated through graded alcohol (50, 70, 90, and 100%) and propylene oxide for 30 minutes each, then embedded in Epon 812, cut at semi-thin 2 μm or ultra-thin 70nm, contrasted with uranyl acetate and lead citrate, examined at 70kv with a Morgagni 268D (Philips) electron microscope and imaged with Mega View III camera (Soft Imaging System).

***In situ* force measurement.**

Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (50-80 mg/kg),

immobilized and knee and foot were pin fixed. Tibialis anterior muscle tendon was attached to a servomotor system (Aurora Scientific). Sciatic nerve was stimulated with a bipolar silver electrode using 0.1-ms-duration supramaximal square-wave pulses. Absolute maximal force generated during isometric contractions in response to electrical stimulation (500-ms-duration stimulation train, 100 Hz frequency) was determined at L0 (length at which maximal tension was obtained during the tetanus). Specific maximal force was calculated by dividing absolute maximal force by muscle weight. Fatigue or susceptibility to contraction-induced injury is monitored according to the force drop after a prolonged contraction-induced injury according the following protocol. The sciatic nerve was stimulated for 700 ms (150 Hz frequency) and maximal isometric contraction of the TA muscle was initiated during the first 500 ms. Then, muscle lengthening (10% L0) at a velocity of 5.5 mm/s (0.85 fiber length/s) was imposed during the last 200 ms. All isometric contractions were performed at an initial length L0. Nine lengthening contractions of the TA muscles were recorded, each separated by a 60 ms rest period. Maximal isometric force was measured 1 min after each lengthening contraction and expressed as a percentage of the initial maximal force. After contractile measurements, the animals were euthanized and muscles were dissected and weighed.

BIN1 exon 7 antibody production.

Mouse monoclonal antibody directed against BIN1 containing exon 7 [4A9] was raised against full-length exon 7 peptide (PVSLLLEKAAPQWCQGKLQAHLVAQTNLLRNQ) conjugated with Imject Maleimide Activated Carrier Protein Spin Kit (Pierce) and injected intraperitoneally into two months old female BALB/c mice with 200 µg of poly(I/C) as adjuvant. Three injections were performed at 2 weeks intervals and four days prior to hybridoma fusion, mice with positively reacting sera were re-injected. Spleen cells were fused with Sp2/0.Agl4 myeloma cells and hybridoma culture supernatants were tested at day 10 by ELISA. Positive cultures were cloned twice on soft agar. Specific hybridomas were established and ascites fluid was prepared by injection of 2x10⁶ hybridoma cells into Freund adjuvant-primed BALB/c mice. All animal experimental procedures were performed with approval of IGBMC and ICS Animal Care Committee.

Western Blotting.

Cells were rinsed with PBS, scraped in PBS, centrifuged at 500g for 5 min and lysed for 30-min on ice in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.5% NP40 supplemented with protease inhibitor cocktail (Roche). Cell lysates were clarified by centrifugation at 14000g for 10 min and protein concentration was determined by Bradford assay (Biorad). Proteins were denatured 3 min at 95°C with Laemmli buffer, separated on 4-12% bis-Tris gradient gel (NuPAGE) in MOPS SDS running buffer (NuPAGE), transferred on 0.45 µm nitrocellulose membranes (Whatman Protan) in 25 mM Tris, 190 mM Glycine, 20% ethanol and blocked overnight with 5% non-fat dry milk in Tris Buffer Saline (TBS). Equal loading was monitored by Ponceau red. Primary antibody incubation was performed for 1 hour in

TBS-T buffer containing 0.5% non-fat dry milk with 1/2,000 mouse anti-BIN1 [99D] (Abcam ab10532), 1/1,000 mouse anti-BIN1 exon 7 [4A9] (homemade), 1/1,000 mouse anti-GAPDH [6C5] (Santa Cruz sc-32233), 1/2,000 mouse anti-MBNL1 or anti-MBNL2 (kind gift of Prof. Morris, Wolfson Centre for Neuromuscular Disease, UK), 1/2,000 mouse anti-CUGBP1 [3B1] (Sigma 3B1-3D11), 1/8,000 rabbit anti-HA tag (Abcam ab9110), 1/2,000 rabbit anti-DNM2 [R-2865] (Dr. Laporte, IGBMC, France), 1/5,000 mouse anti-polyHistidine (Sigma H1029). After washing in TBS-T, blots were incubated for 1 h with 1/4,000 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch) diluted in TBS-T containing 0.5% non-fat dry milk, washed three times with TBS-T, incubated with Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) and imaged on LAS600 (Amersham).

Co-immunoprecipitation assay.

COS-1 cells in 6-well plates were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) with 1 µg of the different HA-C-terminally tagged BIN1 constructions. After 24 h of transfection, cells were lysed in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.5% NP40 supplemented with protease inhibitor cocktail (Roche) and clarified by centrifugation at 14000g for 10 min. Immunoprecipitations were performed at 4°C for 1 h using pre-washed Pierce Anti-HA Magnetic Beads (ThermoFisher) in TBS buffer supplemented with 0,05% Tween-20, washed three time, then bound proteins were eluted by 2 min denaturation step at 95°C with Laemmli buffer followed by western blot. Percentage of DNM2 immunoprecipitated was obtained by quantification of the western blots using FIJI image analysis software.

Recombinant protein production and purification.

Escherichia coli BL21(RIL) pRARE competent cells (Invitrogen) were transformed with 20 ng of either pGEX-GST-DNM2 (variants 1 to 4), pGEX-GST-SH3 domain of BIN1, pET28a-His-BIN1-His (-ex7, -ex11 or +ex7, -ex11), pET28a-His-BAR-His domain of BIN1 with or without its exon 7 or pET28a-GST-MBNL1-Δ101-His. Bacteria were grown at 37°C in 400 ml of LB medium supplemented with kanamycin (pET-28a) or ampicillin (pGEX). When OD600 reached 0.5 units, cultures were cooled down in ice for 15 min prior addition of 0.5 mM IPTG followed by an overnight incubation at 18°C. His-tagged proteins were purified on Protino Ni-TED Packed Columns (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's guidelines and elutions were dialyzed overnight at 4°C in 50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂. Pellets of bacteria expressing GST-tagged DNM2 proteins were rinsed with PBS and lysed in 50 mM Tris-HCl pH 8; 300 mM NaCl; 5 mM MgCl₂ containing 1% sarkosyl. Sonication was realized for 3 min followed by an overnight incubation of the lysate on a rotating wheel. The lysate was clarified by centrifugation at 20,000 g for 20 min and 4% Triton and 40 mM CHAPS was added. GST-DNM2 protein lysates were added to 1 ml pre-washed Glutathione (GSH) sepharose (GE Healthcare), washed and resuspended into

50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ and 0.5% Triton. GST-SH3 domain of BIN1 was purified as above but with final elution in 50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.5% Triton and 10mM of reduced glutathione. All purifications steps were realized at 4°C with ice-cold buffers supplemented with protease inhibitor cocktail (Roche).

Analytical ultracentrifugation sedimentation velocity (AUC-SV)

AUC-SV experiments were performed with a ProteomeLab XL-I analytical ultracentrifuge (Beckman Coulter) at 4°C and 50,000 rpm. The samples were diluted in 50 mM Tris, pH 8, 100 mM NaCl, and 1 mM EGTA with protease inhibitors (Roche). Absorbance scans were taken at 280 nm every 3 min for 10 h, and the sedimentation data were analyzed with SEDFIT software (<http://www.analyticalultracentrifugation.com>) with continuous c(s) distribution analysis. An average partial specific volume of 0.7213 ml/g for BIN1 BAR -ex7 and 0.7231 ml/g for BIN1 BAR +ex7 were used for the AUC-SV analysis.

RNA transcription and gel-shift assays.

Templates for transcription were obtained by PCR using as template pCDNA3.1-BIN1 control or mutant minigenes with the forward primer including a T7 promoter sequence. Transcription reactions were performed using T7 transcription kit (Ambion) in presence of 1 µl of αP³²-CTP (10µCi, 800 Ci per mmole, Perkin Elmer), analyzed on 8% denaturing polyacrylamide and quantified with LS-6500 counter (Beckman). After transcription, 1 unit of DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA) was added, and the sample was incubated for additional 30 min at 37°C. Transcribed RNAs were then purified by micro Bio-Spin 6 chromatography columns (Bio-rad). Sizes and integrity of RNAs were confirmed by gel electrophoresis on a denaturing 6% polyacrylamide gel. For gel-shift, recombinant MBNL1ΔCter in a concentration ranging from 3 to 300 nM was diluted in Buffer D (20 mM Hepes pH 7.9, 100 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 17.5% glycerol, 0.5 µg/µL BSA, 0.1% NP40), incubated 10 min at 30°C with 2 min 94°C denatured 5,000 cpm of internally αP³²-CTP-labeled RNA in binding buffer (Buffer D supplemented with 1.4 units/µL of RNase Inhibitor and 0.01 µg/µL of tRNA from *E. coli*). The reactions were run on a 6% native acrylamide gel (40:1 Acrylamide/bisacrylamide) and revealed and quantified using a Typhoon FLA 9500 scanner (GE Healthcare). The binding affinities (K_d) of MBNL1 are expressed in nanomolar (nM) and were calculated using the intercept of the fitted curve with the Y-axis, using the following formula $K_d = 10^{EXP-y}$.

Statistical analysis

All cells experiments are represented as average ± Standard Error of Mean (SEM) with significance determined using Student T-test.

REFERENCES

Bitoun, M. et al. Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nat. Genet.* 37, 1207–1209 (2005).

Böhm J, Vasli N, Maurer M, Cowling BS, Shelton GD, Kress W, Toussaint A, Prokic I, Schara U, Anderson TJ, Weis J, Tired L, Laporte J. Altered splicing of the BIN1 muscle-specific exon in humans and dogs with highly progressive centronuclear myopathy. *PLoS Genet.* 2013 Jun;9(6):e1003430.

Böhm J, Biancalana V, Malfatti E, Dondaine N, Koch C, Vasli N, Kress W, Strittmatter M, Taratuto AL, Gonorazky H, Laforêt P, Maisonobe T, Olivé M, Gonzalez-Mera L, Fardeau M, Carrière N, Clavelou P, Eymard B, Bitoun M, Rendu J, Fauré J, Weis J, Mandel JL, Romero NB, Laporte J. Adult-onset autosomal dominant centronuclear myopathy due to BIN1 mutations. *Brain.* 2014 Dec;137(Pt 12):3160-70.

Butler, M.H. et al. Amphiphysin II (SH3P9; BIN1), a member of the amphiphysin/Rvs family, is concentrated in the cortical cytomatrix of axon initial segments and nodes of ranvier in brain and around T tubules in skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 137, 1355–1367 (1997).

Brook, J.D. et al. Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 68, 799–808 (1992).

Casal E. et al. The crystal structure of the BAR domain from human Bin1/amphiphysin II and its implications for molecular recognition. *Biochemistry.* 45, 12917-28 (2006).

Castle JC, Zhang C, Shah JK, Kulkarni AV, Kalsotra A, Cooper TA, Johnson JM. Expression of 24,426 human alternative splicing events and predicted cis regulation in 48 tissues and cell lines. *Nat Genet.* 2008 Dec;40(12):1416-25.

Charizanis K, Lee KY, Batra R, Goodwin M, Zhang C, Yuan Y, Shiue L, Cline M, Scotti MM, Xia G, Kumar A, Ashizawa T, Clark HB, Kimura T, Takahashi MP, Fujimura H, Jinnai K, Yoshikawa H, Gomes-Pereira M, Gourdon G, Sakai N, Nishino S, Foster TC, Ares M Jr, Darnell RB, Swanson MS. Muscleblind-like 2-mediated alternative splicing in the developing brain and dysregulation in myotonic dystrophy. *Neuron.* 2012 Aug 9;75(3):437-50.

Charlet, B.N. et al. Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol. Cell* 10, 45–53 (2002).

Chin YH, Lee A, Kan HW, Laiman J, Chuang MC, Hsieh ST, Liu YW. Dynamin-2 mutations associated with centronuclear myopathy are hypermorphic and lead to T-tubule fragmentation. *Hum Mol Genet.* 2015 Oct 1;24(19):5542-54.

Cooper TA, Wan L, Dreyfuss G. RNA and disease. *Cell*. 2009 Feb 20;136(4):777-93.

Cowling BS, Toussaint A, Amoasii L, Koebel P, Ferry A, Davignon L, Nishino I, Mandel JL, Laporte J. Increased expression of wild-type or a centronuclear myopathy mutant of dynamin 2 in skeletal muscle of adult mice leads to structural defects and muscle weakness. *Am J Pathol*. 2011 May;178(5):2224-35.

Durieux AC, Vignaud A, Prudhon B, Viou MT, Beuvin M, Vassilopoulos S, Fraysse B, Ferry A, Lainé J, Romero NB, Guicheney P, Bitoun M. A centronuclear myopathy-dynamin 2 mutation impairs skeletal muscle structure and function in mice. *Hum Mol Genet*. 2010 Dec 15;19(24):4820-36.

Ellis JD, Barrios-Rodiles M, Colak R, Irimia M, Kim T, Calarco JA, Wang X, Pan Q, O'Hanlon D, Kim PM, Wrana JL, Blencowe BJ. Tissue-specific alternative splicing remodels protein-protein interaction networks. *Mol Cell*. 2012 Jun 29;46(6):884-92.

Freyermuth F, Rau F, Kokunai Y, Linke T, Sellier C, Nakamori M, Kino Y, Arandel L, Jollet A, Thibault C, Philipps M, Vicaire S, Jost B, Udd B, Day JW, Duboc D, Wahbi K, Matsumura T, Fujimura H, Mochizuki H, Deryckere F, Kimura T, Nukina N, Ishiura S, Lacroix V, Campan-Fournier A, Navratil V, Chautard E, Auboeuf D, Horie M, Imoto K, Lee KY, Swanson MS, Lopez de Munain A, Inada S, Itoh H, Nakazawa K, Ashihara T, Wang E, Zimmer T, Furling D, Takahashi MP, Charlet-Berguerand N. Splicing misregulation of SCN5A contributes to cardiac-conduction delay and heart arrhythmia in myotonic dystrophy. *Nat Commun*. 2016 Apr 11;7:11067.

Fu, Y.H. et al. An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* 255, 1256–1258 (1992).

Fugier C, Klein AF, Hammer C, Vassilopoulos S, Ivarsson Y, Toussaint A, Tosch V, Vignaud A, Ferry A, Messaddeq N, Kokunai Y, Tsuburaya R, de la Grange P, Dembele D, Francois V, Precigout G, Boulade-Ladame C, Hummel MC, Lopez de Munain A, Sergeant N, Laquerrière A, Thibault C, Deryckere F, Auboeuf D, Garcia L, Zimmermann P, Udd B, Schoser B, Takahashi MP, Nishino I, Bassez G, Laporte J, Furling D, Charlet-Berguerand N. Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy. *Nat Med*. 2011 Jun;17(6):720-5.

Gao Z, Cooper TA. Reexpression of pyruvate kinase M2 in type 1 myofibers correlates with altered glucose metabolism in myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Aug 13;110(33):13570-5.

Goodwin M, Mohan A, Batra R, Lee KY, Charizanis K, Fernández Gómez FJ, Eddarkaoui S, Sergeant N, Buée L, Kimura T, Clark HB, Dalton J, Takamura K, Weyn-Vanhentenryck SM, Zhang C, Reid T, Ranum LP, Day JW, Swanson MS. MBNL Sequestration by Toxic RNAs and RNA Misprocessing in the Myotonic Dystrophy Brain. *Cell Rep*. 2015 Aug 18;12(7):1159-68.

Ho, T.H. et al. Muscleblind proteins regulate alternative splicing. *EMBO J.* 23, 3103–3112 (2004).

Kanadia, R.N. et al. A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science* 302, 1978–1980 (2003).

Kanadia RN, Shin J, Yuan Y, Beattie SG, Wheeler TM, Thornton CA, Swanson MS. Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscleblind overexpression in a mouse poly(CUG) model for myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Aug 1;103(31):11748-53.

Katz Y, Wang ET, Airoidi EM, Burge CB. Analysis and design of RNA sequencing experiments for identifying isoform regulation. *Nat Methods.* 2010 Dec;7(12):1009-15.

Kenniston JA, Lemmon MA. Dynamin GTPase regulation is altered by PH domain mutations found in centronuclear myopathy patients. *EMBO J.* 2010 Sep 15;29(18):3054-67.

Kimura T. et al., Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet.* 14, 2189-200 (2005).

Kojima C. et al. Regulation of Bin1 SH3 domain binding by phosphoinositides. *EMBO J.* 23, 4413-22 (2004).

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).

Laporte, J. et al. A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast. *Nat. Genet.* 13, 175–182 (1996).

Lee KY, Li M, Manchanda M, Batra R, Charizanis K, Mohan A, Warren SA, Chamberlain CM, Finn D, Hong H, Ashraf H, Kasahara H, Ranum LP, Swanson MS. Compound loss of muscleblind-like function in myotonic dystrophy. *EMBO Mol Med.* 2013 Dec;5(12):1887-900.

Lee, E. et al. Amphiphysin 2 (BIN1) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science* 297, 1193–1196 (2002).

Liquori, C.L. et al. Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science* 293, 864–867 (2001).

Mahadevan, M. et al. Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science* 255, 1253–1255 (1992).

Mankodi, A. et al. Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science* 289,

1769–1773 (2000).

Mankodi, A. et al. Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of CIC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. *Mol. Cell* 10, 35–44 (2002).

Miller, J.W. et al. Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)_n expansions associated with myotonic dystrophy. *EMBO J.* 19, 4439–4448 (2000).

Nakamori M, Kimura T, Fujimura H, Takahashi MP, Sakoda S. Altered mRNA splicing of dystrophin in type 1 myotonic dystrophy. *Muscle Nerve.* 2007 Aug;36(2):251-7.

Nakamori M, Sobczak K, Puwanant A, Welle S, Eichinger K, Pandya S, Dekdebrun J, Heatwole CR, McDermott MP, Chen T, Cline M, Tawil R, Osborne RJ, Wheeler TM, Swanson MS, Moxley RT 3rd, Thornton CA. Splicing biomarkers of disease severity in myotonic dystrophy. *Ann Neurol.* 2013 Dec;74(6):862-72.

Nicot, A.S. et al. Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy. *Nat Genet.* 39, 1134-9 (2007).

Owen DJ, Wigge P, Vallis Y, Moore JD, Evans PR, McMahon HT. Crystal structure of the amphiphysin-2 SH3 domain and its role in the prevention of dynamin ring formation. *EMBO J.* 1998 Sep 15;17(18):5273-85.

Philips, A.V., Timchenko, L.T. & Cooper, T.A. Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science* 280, 737–741 (1998).

Ramjaun, A.R., Micheva, K.D., Bouchelet, I. & McPherson, P.S. Identification and characterization of a nerve terminal-enriched amphiphysin isoform. *J. Biol. Chem.* 272, 16700–16706 (1997).

Rau F, Lainé J, Ramanoudjame L, Ferry A, Arandel L, Delalande O, Jollet A, Dingli F, Lee KY, Peccate C, Lorain S, Kabashi E, Athanasopoulos T, Koo T, Loew D, Swanson MS, Le Rumeur E, Dickson G, Allamand V, Marie J, Furling D. Abnormal splicing switch of DMD's penultimate exon compromises muscle fibre maintenance in myotonic dystrophy. *Nat Commun.* 2015 May 28;6:7205.

Razzaq, A. et al. Amphiphysin is necessary for organization of the excitation-contraction coupling machinery of muscles, but not for synaptic vesicle endocytosis in *Drosophila*. *Genes Dev.* 15, 2967–2979 (2001).

Royer B, Hnia K, Gavriilidis C, Tronchère H, Tosch V, Laporte J. The myotubularin-amphiphysin 2 complex in membrane tubulation and centronuclear myopathies. *EMBO Rep.* 2013 Oct;14(10):907-15.

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).

Smith LL, Gupta VA, Beggs AH. Bridging integrator 1 (Bin1) deficiency in zebrafish results in centronuclear myopathy. *Hum Mol Genet.* 2014 Jul 1;23(13):3566-78.

Tang ZZ, Yarotsky V, Wei L, Sobczak K, Nakamori M, Eichinger K, Moxley RT, Dirksen RT, Thornton CA. Muscle weakness in myotonic dystrophy associated with misregulated splicing and altered gating of Ca(V)1.1 calcium channel. *Hum Mol Genet.* 2012 Mar 15;21(6):1312-24.

Tjondrokoesoemo A, Park KH, Ferrante C, Komazaki S, Lesniak S, Brotto M, Ko JK, Zhou J, Weisleder N, Ma J. Disrupted membrane structure and intracellular Ca²⁺ signaling in adult skeletal muscle with acute knockdown of Bin1. *PLoS One.* 2011;6(9):e25740.

Ueda H, Shimokawa M, Yamamoto M, Kameda N, Mizusawa H, Baba T, Terada N, Fujii Y, Ohno S, Ishiura S, Kobayashi T. Decreased expression of myotonic dystrophy protein kinase and disorganization of sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle of myotonic dystrophy. *J Neurol Sci.* 162, 38-50 (1999).

Wang ET, Sandberg R, Luo S, Khrebtkova I, Zhang L, Mayr C, Kingsmore SF, Schroth GP, Burge CB. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature.* 2008 Nov 27;456(7221):470-6.

Wang L, Barylko B, Byers C, Ross JA, Jameson DM, Albanesi JP. Dynamin 2 mutants linked to centronuclear myopathies form abnormally stable polymers. *J Biol Chem.* 2010 Jul 23;285(30):22753-7.

Wechsler-Reya, R., Sakamuro, D., Zhang, J., Duhadaway, J. & Prendergast, G.C. Structural analysis of the human BIN1 gene. Evidence for tissue-specific transcriptional regulation and alternate RNA splicing. *J. Biol. Chem.* 272, 31453–31458 (1997).

Wheeler TM, Lueck JD, Swanson MS, Dirksen RT, Thornton CA. Correction of CIC-1 splicing eliminates chloride channelopathy and myotonia in mouse models of myotonic dystrophy. *J Clin Invest.* 2007 Dec;117(12):3952-7.

Wu T, Baumgart T. BIN1 membrane curvature sensing and generation show autoinhibition regulated by downstream ligands and PI(4,5)P2. *Biochemistry.* 2014 Nov 25;53(46):7297-309.

ENDNOTES

Acknowledgments.

We thank Tom Cooper (Baylor College of Medicine, Houston, USA) for the gift of the DT960 and tgCUGBP1 plasmids, Christiane Branlant (CNRS, Nancy, France) for the gift of the pGEX-MBNL1 Δ ¹⁰¹ vector, Jocelyn Laporte (IGBMC, Strasbourg, France) for the gift of the rabbit anti-DNM2 [R-2865], Glenn Morris for the gift of the anti MBNL1 and MBNL2 antibodies (Wolfson Centre for Neuromuscular Disease, UK), the Research Resource Network of Japan for providing human tissue samples, the Penn Vector Core, Gene Therapy Program, University of Pennsylvania (Philadelphia) for providing the pAAV2/9 plasmid (p5E18-VD29) and all IGBMC common facilities for assistance.

Funding acknowledgments.

This work was supported by ERC-2012-StG #310659 “RNA DISEASES” (NCB); AFM #18833 “Animal model for DM” (NCB); E-rare and ANR-12-RARE-0005 “HEART DM” (DF, NCB); ANR-10-INBS-07 PHENOMIN (ICS), ANR-10-LABX-0030-INRT (IGBMC) and ANR-10-IDEX-0002-02 (IGBMC); UPMC/INSERM/CNRS/AIM (DF); Research Grants for Practical Research Project for Rare / Intractable Diseases and for Comprehensive Research on Persons with Disabilities from AMED (MPT); Grants-in-Aids from JSPS (MPT) and Intramural Research Grant of NCNP 26-8 (MPT).

Author contributions.

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

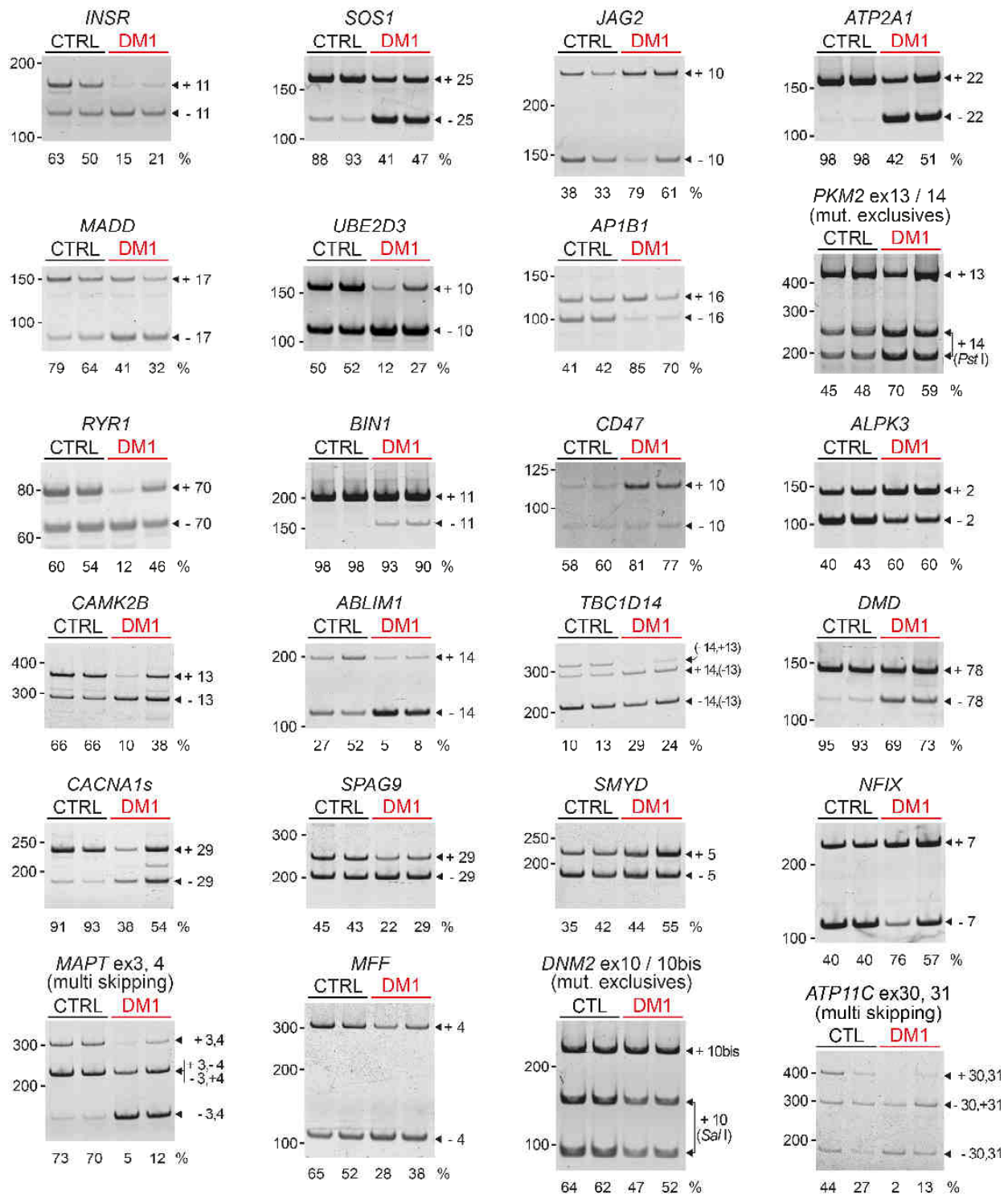
Conflict of interest.

The authors declare no conflicts of interest.

Accession codes.

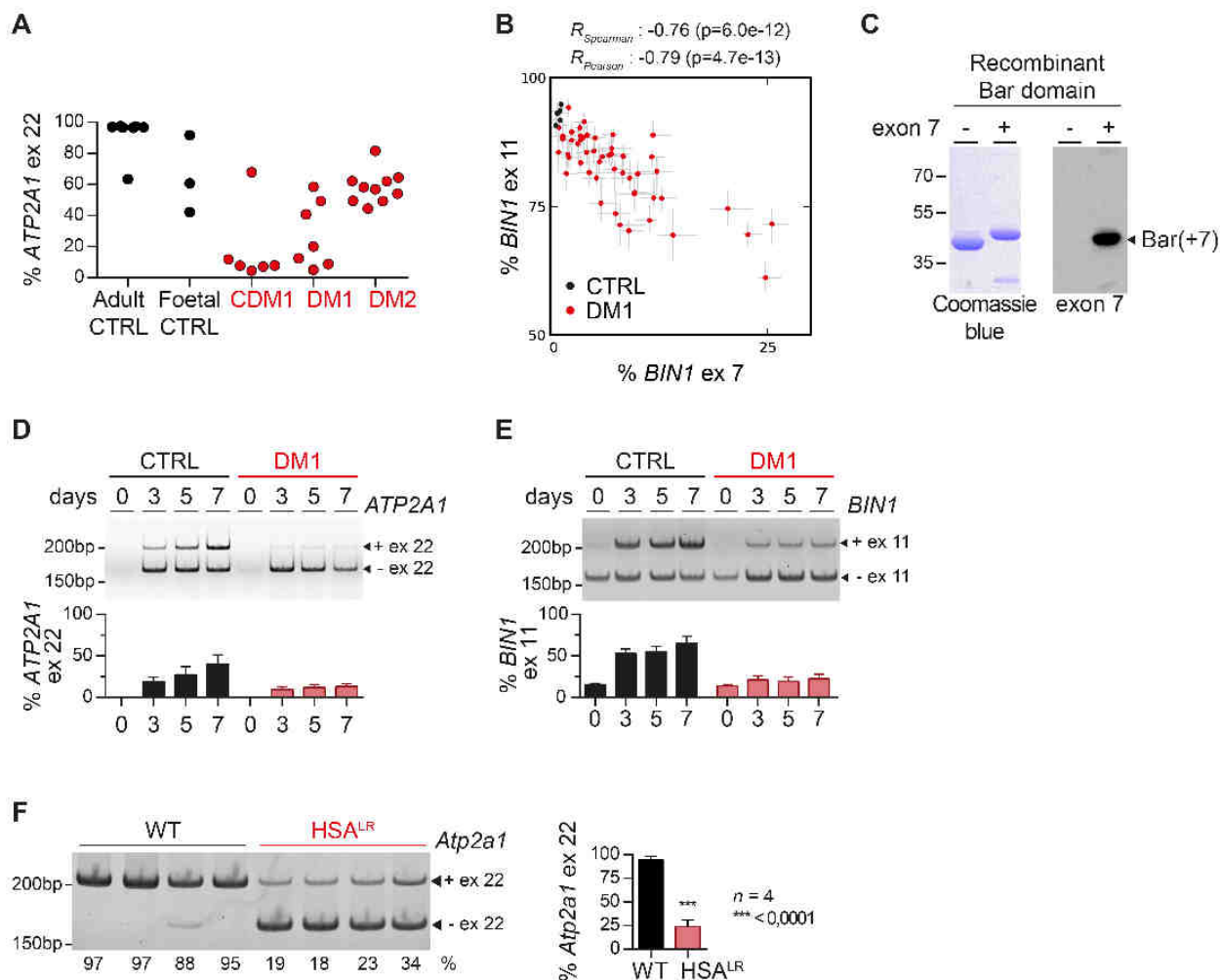
RNA sequencing, GEO# GSE85984.

SUPPLEMENTARY FIGURES



Supplementary figure 1 (related to Figure 1):

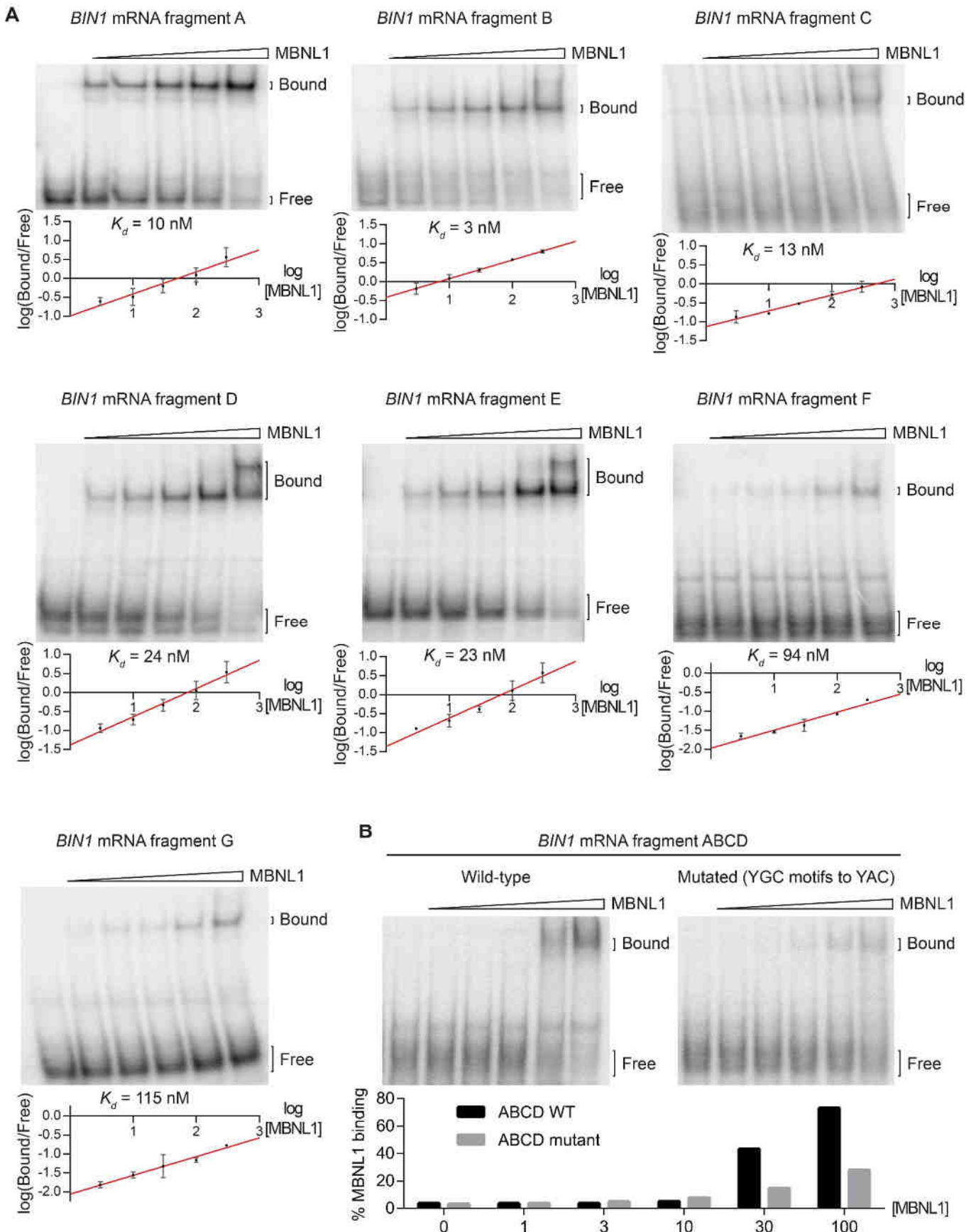
RT-PCR validation of splicing alterations predicted by RNA-sequencing in skeletal muscle samples of control individuals (CTRL, black) and DM1 patients (DM1, red). The percentage of exon inclusion is indicated at the bottom of each gel. Molecular sizes are indicated in base pairs on the left of each gel.



Supplementary figure 2 (related to Figure 2):

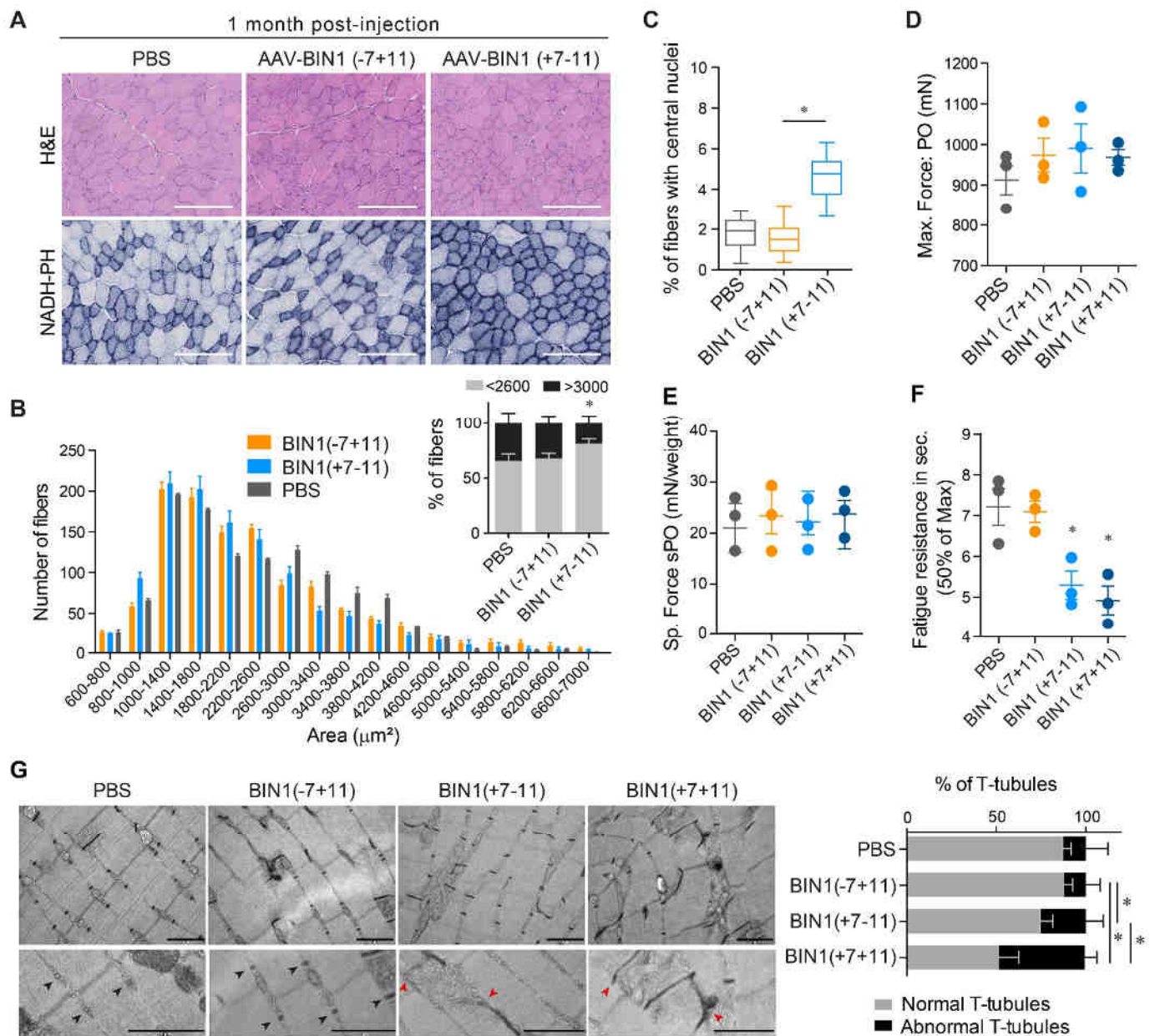
(A) Graphical representation of the percentage of *ATP2A1* (SERCA1) mRNA including exon 22 in skeletal muscle samples of adult individuals either with no muscle disease ($n=4$) or with amyotrophic lateral sclerosis ($n=3$) (CTRL), foetal controls ($n=3$), congenital DM1 fetuses ($n=6$), adult DM1 ($n=7$) and DM2 ($n=10$) individuals. (B) Correlation between alterations of the alternative splicing of *BIN1* exons 7 and 11 in skeletal muscle samples of DM1 individuals (splicing alterations from Nakamori et al., 2013). (C) Left panel, coomassie staining of purified recombinant BIN1 BAR domain with and without its exon 7. Right panel, Immunoblotting against BIN1 exon 7 of purified recombinant BIN1 BAR domain with and without its exon 7. Molecular sizes are indicated in kilodalton on the left of the gel. (D) Upper panel, RT-PCR analysis of *ATP2A1* (SERCA) exon 22 inclusion in 0, 3, 5 and 7 days differentiated primary muscle cell cultures originating from biopsies of control or DM1 individuals. Lower panel, quantification of the percentage of *ATP2A1* mRNA including its exon 22. Bars indicate s.e.m with $n=2$ independent cell cultures. (E) Upper panel, RT-PCR analysis of *BIN1* exon 11 inclusion in 0, 3, 5 and 7 days differentiated primary muscle cell cultures originating from biopsies of control or DM1 individuals. Lower panel, quantification of the percentage of *BIN1* mRNA including its exon 11. Bars indicate s.e.m with $n=3$ independent cell cultures.

(F) Left panel, RT-PCR analysis of *Atp2a1* (SERCA1) exon 22 inclusion in tibialis anterior muscles of control non-transgenic or HSA^{LR} mice. The percentage of exon 22 inclusion is indicated at the bottom of the gel. Molecular sizes are indicated in base pairs on the left of the gel. Right panel, quantification of the percentage of *Atp2a1* mRNA including its exon 22. Bars indicate s.e.m with n=4 different mice in each groups. Student's t-test, *** indicates $P < 0.0001$.



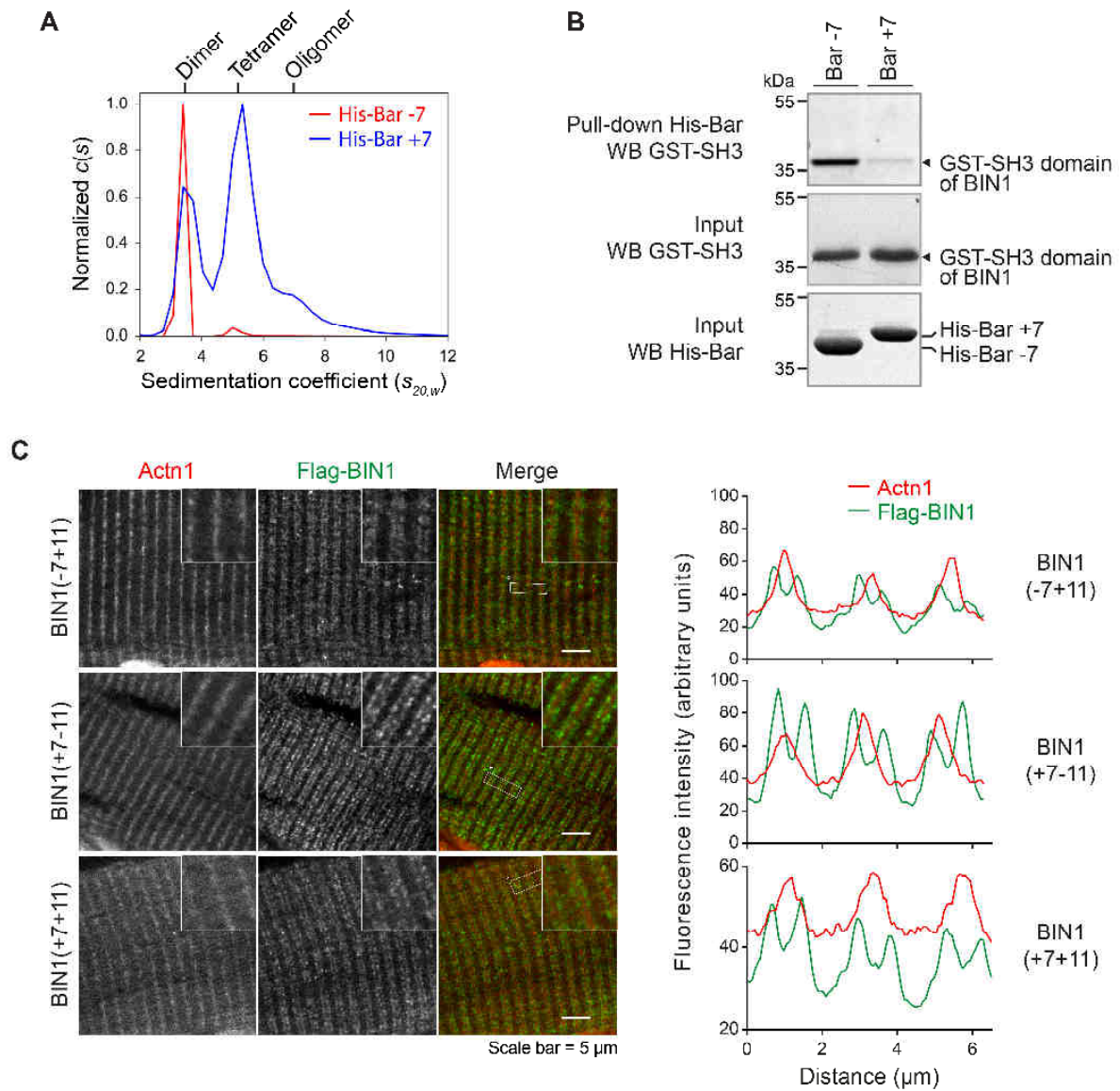
Supplementary figure 3 (related to Figure 3):

(A) Upper panels, representative gel-shift assays of binding of 3, 10, 30, 100 and 300 nM of purified recombinant GST-tagged MBNL1 Δ Cter to *BIN1* RNA fragments covering either end of intron 6 (fragments A, B and C), exon 7 (fragment D) or beginning of intron 7 (fragments E, F and G). Lower panels, hill plot of MBNL1 binding to the different *BIN1* mRNA fragments, showing the log of shifted RNA over free RNA ($\log[\text{Bound/Free RNA}]$) versus the log of MBNL1 concentration ($\log[\text{MBNL1}]$). The intercept of the fitted curve with the Y-axis is used to calculate the K_d using the formula $K_d = 10^{\text{EXP-y}}$. The resulting MBNL1 binding affinities (K_d) are expressed in nanomolar (nM). **(B)** Upper panel, gel-shift assay of binding of 3, 10, 30 and 100 nM recombinant purified GST-tagged MBNL1 Δ Cter to wild type or UGC to UAC mutated *BIN1* RNA fragments corresponding to end of intron 6 and exon 7 (fragment ABCD). Lower panel, quantification of the percentage of MBNL1 binding.



Supplementary figure 4 (related to Figure 5):

(A) H&E and NADH-PH staining of mouse tibialis anterior (TA) muscles injected for 1 month with AAV2/9-BIN1 isoforms with or without exons 7 and 11. Scale bar = 200 μm . (B) Left panel, muscle fiber area of mouse TA muscles injected for 1 month with AAV2/9-BIN1 isoforms with or without exons 7 and 11. Right panel, quantification of small (< 2600 μm^2) versus large (> 3000 μm^2) muscle fibers. (C) Percentage of fibers with centrally located nuclei in mouse TA muscles injected for 1 month with AAV2/9-BIN1 isoforms with or without exons 7 and 11. (D to F) Muscle absolute maximal force (D), specific maximal force (E) and fatigue resistance (F) were assessed *in situ* in mouse TA muscles injected for 1 month with AAV2/9-BIN1 isoforms with or without exons 7 and 11. (G) Left panel, transmission electron microscopy of potassium ferrocyanide stained mouse TA muscles injected for 1 month with AAV2/9-BIN1 isoforms with or without exons 7 and 11. Black arrowheads shows normal T-tubules whereas red arrowheads shows altered T-tubules. Scale bar = 1 μm . Right panel, quantification of normal and abnormal T-tubules. For all experiments, bars indicate s.e.m with n=3 independent injections in each groups. Student's t-test, * indicates $P < 0.05$.



Supplementary figure 5 (related to Figure 6):

(A) Gel-filtration and analytical ultracentrifugation sedimentation velocity of purified recombinant HIS-tagged BIN1 BAR domain with and without its exon 7. (B) Upper panel, immunoblotting against GST of GST-tagged BIN1 SH3 domain pull-downed by recombinant HIS tagged-BIN1 BAR domain with or without exon 7. Middle and lower panels, immunoblotting against GST and HIS tags of GST-tagged BIN1 SH3 domain or HIS tagged-BIN1 BAR domain with or without exon 7. (C) Left panel, representative confocal images of immunofluorescence labeling of endogenous alpha-actinin (Actn1) and Flag-tagged BIN1 in mouse TA longitudinal sections of muscles injected for 3 months with AAV2/9-BIN1 isoforms with or without exons 7 and 11. Scale bar = 5 μ m. Right panel, fluorescence intensity measurements of Actn1 (red) and Flag-BIN1 (green).

Synthèse des résultats du manuscrit

Synthèse des résultats du manuscrit

Certains symptômes développés par les patients DM1 sont expliqués par l'altération de l'épissage d'ARN messagers spécifiques. Ainsi des altérations de l'épissage du canal chlore musculaire *CLCN1*, du récepteur à l'insuline *INSR* et du canal sodique cardiaque *SCN5A* sont respectivement associés à la myotonie, la résistance à l'insuline et aux troubles de la conduction cardiaque (Savkur et al., 2001; Charlet-B et al., 2002; Mankodi et al., 2002; Freyermuth et al., 2016). De même, les altérations du muscle squelettique sont associées à de nombreuses altérations de l'épissage alternatif, affectant notamment la fonction des canaux calciques musculaires *DHPR (CACNA1S)* et *RYR1*, de la pompe calcique *SERCA1 (ATP2A1)*, de la dystrophine (*DMD*) et de *BIN1* (Kimura et al., 2009 ; Fugier et al., 2011 ; Tang et al., 2012 ; Nakamori et al., 2013 ; Rau et al., 2015). L'étude de ces altérations d'épissage a permis d'avancer dans la compréhension des DM. Cependant, les causes moléculaires responsables de la faiblesse et de l'atrophie musculaire ne sont pas encore complètement identifiées. Pour cette raison nous nous sommes concentrés sur ces problèmes de faiblesse et d'atrophie des muscles et avons entrepris d'identifier leurs possibles origines.

Notre approche de séquençage ARN à haut débit confirme que les muscles de patients atteints de DM1 présentent une multitude de dérégulations avec une cinquantaine d'évènements d'épissage significativement altérés ($\Delta\psi > 0.5$, Z-score > 2). Cette analyse nous a permis, non seulement de confirmer des altérations d'épissage déjà identifiées précédemment, mais aussi de caractériser une vingtaine de nouvelles altérations (*PPHLN1*, *TJAP1*, *STK40*, etc.). Il est aussi à noter que ces exons dérégulés chez les patients DM1 sont bordés par des séquences introniques enrichies en motifs ARN de type YGCY, qui sont des sites de liaison pour les protéines MBNL. Au contraire, on ne retrouve pas d'enrichissement pour des sites de liaison pour *CUGBP1*, *Staufen1*, les protéines *hnRNP* ou *rbFOX*. Ces résultats suggèrent donc que la titration des protéines MBNL est la cause majeure des altérations d'épissage dans le muscle squelettique de patients DM1.

Cependant les causes de la faiblesse musculaire ne peuvent pas être déterminées uniquement par cette approche. Nous nous sommes donc basés sur une étude corrélant le degré d'altération d'épissage alternatif avec la sévérité de la faiblesse musculaire affectant les patients DM1 (Nakamori et al., 2013). L'une des altérations les mieux corrélées avec la faiblesse musculaire était l'épissage de *BIN1*

(Nakamori et al., 2013). Ces informations, combinées avec le fait que des mutations du gène *BIN1* sont responsables de la myopathie centronucléaire (Nicot et al., 2007), nous ont conduites à étudier l'implication de l'épissage de *BIN1* dans la DM1. L'altération de l'inclusion de l'exon 11 ayant été étudiée précédemment et celui-ci conduisant à une perte de force limitée, sans atrophie ou présence de noyaux centraux (Fugier et al., 2011), je me suis plus particulièrement intéressé à l'inclusion anormale de l'exon 7 de *BIN1* dans cette maladie.

Premièrement, nous avons confirmé, par simple RT-PCR, que l'inclusion de l'exon 7 de *BIN1* est augmentée dans un large panel d'échantillons de muscle de patients DM. En effet, l'exon 7 est un exon spécifiquement neuronal qui est normalement absent du muscle squelettique. Cependant dans le muscle des patients DM1, cet exon est exprimé de façon aberrante, avec une inclusion moyenne de 18% pour 7 patients DM1. L'inclusion de l'exon 7 atteint une moyenne de 50% lorsque nous avons analysé des échantillons musculaires de six patients CDM1 différents. La forme congénitale de la DM1 est une forme sévère et précoce de dystrophie myotonique, qui touche les nouveau-nés. Il semble donc que la corrélation entre l'inclusion anormale de l'exon 7 de *BIN1* et la faiblesse musculaire observée précédemment chez les patients DM1 (Nakamori et al., 2013), soit aussi vraie entre forme congénitale et forme adulte. Nous avons alors développé un anticorps monoclonal dirigé spécifiquement contre le peptide encodé par l'exon 7 de *BIN1*. Cet anticorps nous a ainsi permis de confirmer définitivement la présence de l'inclusion de l'exon 7 à l'état protéique dans les échantillons de muscle de patients DM1.

Je me suis donc attaché à déterminer les causes moléculaires de cette inclusion anormale. En effet, dans les DM, plusieurs facteurs d'épissage sont connus comme altérés. Ainsi, l'expression de CUGBP1 est augmentée, alors que la disponibilité des protéines MBNL diminue à cause de leur séquestration par les répétitions C/CUG. A l'aide d'un rapporteur synthétique d'épissage de l'exon 7, nous avons montré que l'inclusion de cet exon était inhibée par la protéine MBNL1. Au contraire, la perte d'expression de MBNL1 par siRNA ou l'expression de répétitions CUG titrant MBNL1 conduisent à l'augmentation de l'inclusion de l'exon 7. Nous avons démontré que cette régulation était directe, puisqu'une protéine recombinante MBNL1 purifiée est capable de lier les séquences introniques bordant l'exon 7 de *BIN1 in vitro*. De plus, la mutation des sites de liaison de MBNL1 sur l'ARN *BIN1* empêchait son action régulatrice sur l'épissage de l'exon 7. Enfin, dans un modèle murin de la DM1 qui possède une

invalidation des gènes *Mbnl1* et *Mbnl2* dans le muscle (K.-Y. Lee et al., 2013), l'inclusion de l'exon 7 de *BIN1* est fortement élevée comparée aux souris contrôles (1% d'inclusion de l'exon 7 dans les souris sauvages contre 75% d'inclusion dans les souris knockout pour *Mbnl1* et *Mbnl2*). Globalement, ces résultats montrent que l'exon 7 de *BIN1* n'est pas présent dans le muscle squelettique contrôle, par contre, chez les patients DM1, nous avons identifié que l'exon 7 était exprimé, à la fois au niveau ARN et protéique. Cette inclusion aberrante de l'exon 7 est engendrée par la perte fonctionnelle de MBNL1, comme le prouvent les tests du rapporteur d'épissage et l'analyse de modèle murin invalidé pour *Mbnl1* et 2.

Cette inclusion anormale de l'exon 7 pose la question de son importance physiologique pour la DM, et ceci d'autant plus que le séquençage ARN à haut débit montre que de nombreux autres événements d'épissage sont altérés chez les patients DM. Afin d'étudier les conséquences de l'inclusion de l'exon 7 de *BIN1* dans le muscle et notamment sa possible participation à la faiblesse musculaire, nous avons collaboré avec l'équipe du professeur Beggs (Harvard Medical School), qui a testé la fonction des différentes formes d'épissage de *BIN1* dans le zebrafish, par injection de leurs ADNc, après invalidation de l'expression de *bin1* endogène par morpholino. Ces expériences montrent que la perte de *bin1* endogène mène au développement de poissons à la musculature malformée, avec une atrophie des fibres musculaires et une augmentation des noyaux centraux. La complémentation des zebrafish par l'expression de l'isoforme de *BIN1* contrôle (-ex7, +ex11) corrige ce phénotype. De façon surprenante, l'expression d'une forme sans exon 7 et sans exon 11 montre elle aussi une correction, mais partielle, de la perte d'expression de *bin1*, suggérant que l'exon 11 ne soit que partiellement essentiel pour la fonction de *bin1* dans le muscle. A l'inverse, l'expression des isoformes de *BIN1* contenant l'exon 7 n'améliore pas le phénotype des zebrafish invalidés pour *bin1* endogène. Cette première expérience *in vivo* montre donc l'effet délétère de l'exon 7 sur la fonction de *bin1* et donc sur la morphologie du muscle.

Fort de ces résultats préliminaires, nous avons alors procédé à des injections intramusculaires, chez des souris contrôles adultes, de virus adéno-associé (AAV2.9) exprimant différentes constructions de *BIN1*. A l'aide de cette approche nous avons confirmé l'effet toxique de l'inclusion de l'exon 7 de *BIN1* sur le muscle avec une taille des fibres diminuée et une augmentation des noyaux centraux. De plus, un autre effet notable est l'effet délétère de l'expression de *BIN1* avec son exon 7 sur la structure

des tubules-T. En effet, celles-ci sont spécifiquement altérées dans les souris injectées avec BIN1 contenant l'exon 7 (+ex7, +ex11 ou +ex7, -ex11) comparé à la forme contrôle de BIN1 (-ex7, +ex11). Enfin, nous avons aussi mis en évidence une diminution de la force musculaire liée à la présence de cet exon 7. Par conséquent, ces expériences suggèrent que l'inclusion de l'exon 7 altère la fonction de BIN1 sur le maintien de la structure des tubules-T, conduisant probablement à des altérations du couplage excitation / contraction et *in fine* à une atrophie et une faiblesse musculaire.

Afin d'élucider un mécanisme moléculaire potentiel mettant en jeu l'exon 7 dans la faiblesse musculaire, nous avons alors réalisé des expériences d'interaction *in vitro* entre BIN1 et une protéine partenaire, la dynamine 2 (DNM2). En effet, d'après des travaux analysant les interactions protéine-protéine à haut débit, la présence de l'exon 7 renforcerait l'interaction de BIN1 avec la DNM2 (Ellis et al., 2012). Nous avons confirmé ce résultat à la fois par immunoprécipitation et par interaction *in vitro* avec des protéines recombinantes purifiées. De plus, cette interaction semble aussi se produire dans le muscle *in vivo* puisque nous avons observé une délocalisation de la DNM2 après injection d'AAV exprimant BIN1 avec son exon 7. Il est important de noter qu'à la fois la DNM2 et BIN1 sont impliqués dans la myopathie centronucléaire (CNM). Ces deux acteurs pourraient donc être le point commun menant aux atteintes musculaires observées dans la DM1 et la CNM. C'est pourquoi nous proposons que l'interaction forcée entre BIN1 et la DNM2, dans le muscle des patients DM1, participe aux problèmes de faiblesse et d'atrophie musculaire caractéristiques de cette maladie.

Résultats supplémentaires

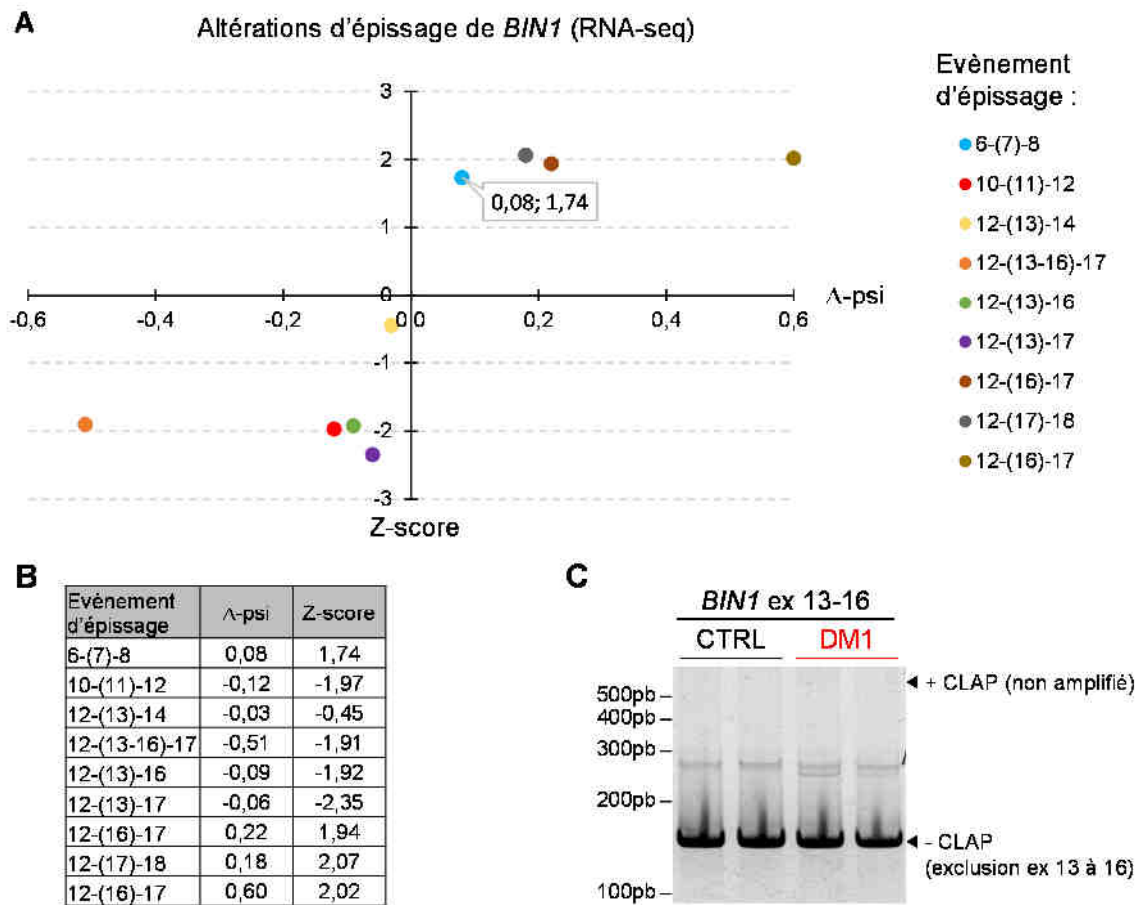


Figure 43 : Altérations de l'épissage de *BIN1* dans le muscle de patients DM1 mises en évidence par le RNA-seq.

(A) Graphique en nuage de point représentant les différentes altérations de l'épissage de *BIN1* mises en évidence par le RNA-seq. En abscisse, Δ -psi correspond à la différence d'épissage entre muscle de patient normal contre DM1. En ordonnée, le Z-score correspond à la probabilité. Les évènements d'épissage correspondant à chaque point apparaissent dans la légende à droite et ont une couleur définie, l'exon entre parenthèses est l'exon alternatif. *BIN1* exon 7 est en bleu ; *BIN1* exon 11 est en rouge. (B) Valeurs issues de l'analyse RNA-seq et utilisées pour le graphique en nuage de point. (C) RT-PCR de *BIN1* avec des amorces ciblant les exons 12 et 17 afin d'étudier l'épissage des exons 13 à 16 du domaine CLAP. Utilisation d'échantillons de muscle de patients sains (CTRL, noir) et de patients DM1 (DM1, rouge).

Mis à part les résultats obtenus sur l'épissage de l'exon 7 de *BIN1* et son implication dans la DM1, j'ai réalisé d'autres expériences, non reportées dans le manuscrit. Les résultats de ces différentes expériences sont regroupés dans le chapitre ci-dessous.

Chapitre II. Résultats supplémentaires

II.A. Autres altérations de l'épissage de *BIN1*

Les altérations de l'épissage de l'exon 7 (inclusion) et de l'exon 11 (exclusion) de *BIN1* sont connues dans la DM1 (Fugier et al., 2011 ; Nakamori et al., 2013). Cependant, par notre approche de séquençage à ARN, nous avons obtenus d'autres altérations potentielles pour *BIN1*, notamment pour les exons 13 à 16 du domaine CLAP (**Figure 43A et B**). Or ce domaine est spécifique du cerveau adulte, tout comme l'exon 7. Il est donc intéressant d'étudier si, tout comme l'exon 7, les exons 13 à 16 sont aussi dérégulés dans la DM1. Nous avons donc testé par RT-PCR l'épissage du domaine CLAP en utilisant des amorces ciblant les exons 12 et 17. Cependant, comme le montre le gel d'électrophorèse en **Figure 43C**, nous n'avons amplifié qu'un seul produit, correspondant à la forme sans domaine CLAP, c'est-à-dire sans les exons 13 à 16. En effet, la taille attendue de la forme avec domaine CLAP est de 525pb, or aucun produit de cette taille n'est visible sur le gel. Ainsi, nous n'avons pas pu valider l'altération d'épissage du domaine CLAP de *BIN1* dans la DM1. Les résultats du séquençage ARN peuvent alors s'expliquer soit par un faux-positif, soit par une inclusion extrêmement faible et non détectable par gel d'électrophorèse de ces exons, l'augmentation quantifiée par le facteur $\Delta\psi$ en séquençage ARN étant alors réel mais négligeable (par exemple un épissage de 0,001% qui augmente à 0,1% des isoformes de *BIN1* contenant le domaine CLAP est une augmentation de 100 fois, mais toujours insignifiante par rapport aux isoformes sans domaine CLAP).

II.B. Tests préliminaires du minigène de *BIN1* exon 7

II.B.1) Minigène, première version

Dans le but d'étudier l'épissage de l'exon 7 de *BIN1*, ainsi que l'effet de différentes conditions sur celui-ci, nous avons mis au point une première version d'un rapporteur d'épissage de *BIN1* exon 7 (minigène v.1). Celui-ci contenait les exons 6, 7 et 8 entiers, mais des séquences introniques tronquées, insérés entre le promoteur

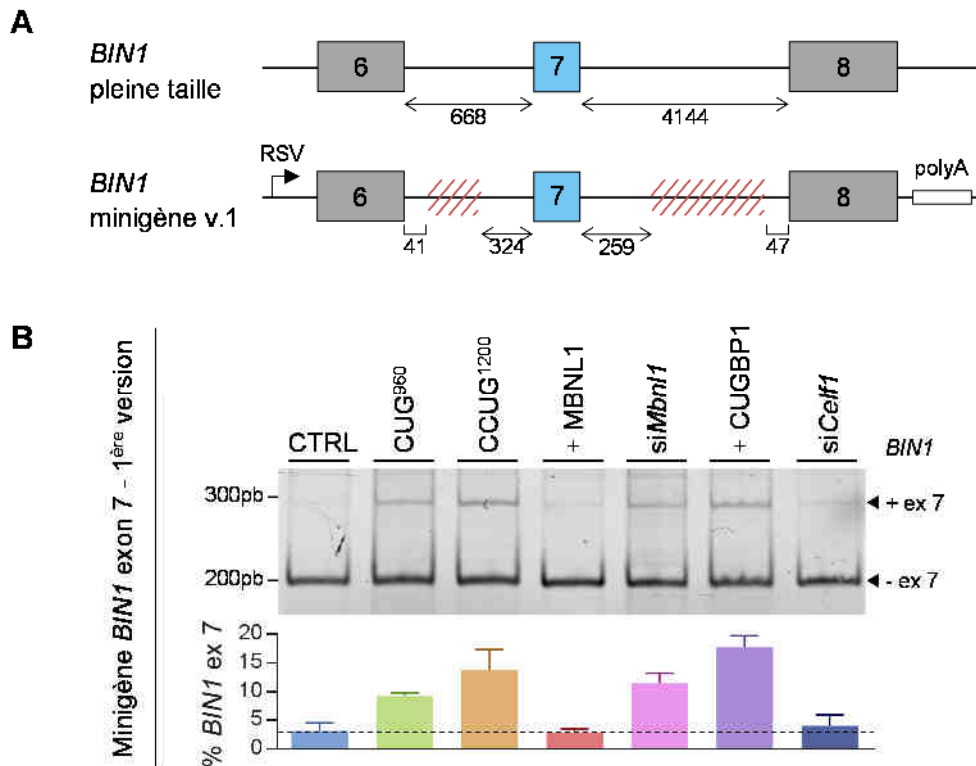


Figure 44 : Structure et test d'épissage de la 1^{ère} version du minigène *BIN1* ex 7.

(A) Représentation schématique de la structure exon / intron autour de *BIN1* exon 7 normal (pleine taille ; *en haut*) et de la 1^e version du minigène (minigène v.1 ; *en bas*). La taille des introns est donnée en paire de base. Les hachures rouges représentent la partie des introns tronquée dans le minigène par rapport à *BIN1* normal. RSV, promoteur du Virus du Sarcome de Rous ; polyA, signal de polyadénylation.

(B) Analyse de l'épissage de la première version du minigène de *BIN1* exon 7 réalisée dans des cellules COS-1. Le minigène a été transfecté seul (CTRL) ou co-exprimé avec un plasmide portant 960 répétitions CUG (CUG⁹⁶⁰) ou 1200 répétitions CCUG (CCUG¹²⁰⁰), surexprimant MBNL1 ou CUGBP1 (+MBNL1 et +CUGBP1, respectivement) ou co-transfecté avec un siARN dirigé contre *Mbnl1* (si*Mbnl1*) ou *Celf1* (codant pour Cugbp1 ; si*Celf1*). *Partie haute* : Gel d'électrophorèse représentatif pour l'épissage du minigène v.1 sous l'effet des différentes conditions décrites ci-dessus. *Partie basse* : Pourcentage d'épissage de l'exon 7 du minigène correspondant à chaque condition, représenté sous forme d'histogramme. Les valeurs expriment la moyenne de 3 expériences séparées.

RSV (Virus du Sarcome de Rous) et la séquence de polyadénylation de l'actine (**Figure 44A**). Nous avons choisi d'utiliser la lignée cellulaire de fibroblastes COS-1, pour étudier l'épissage de ce minigène. Cependant, comme le montre le gel d'électrophorèse en **Figure 44B**, le pourcentage basal d'inclusion de l'exon 7 (condition CTRL, piste à gauche) est de 3%, ce qui est très faible. De ce fait, l'étude de conditions favorisant l'exclusion de l'exon 7 est difficile. Cela est le cas pour la surexpression de MBNL1 (+MBNL1, 4^e piste) qui ne diminue pas l'inclusion de l'exon 7 de façon significative, cet exon étant en effet trop faiblement inclus pour être réprimé. Bien que ce minigène ne soit pas utilisable pour étudier la répression de l'exon 7, il nous a été utile pour tester son inclusion, et notamment l'effet des répétitions CUG⁹⁶⁰ et d'un siRNA dirigé contre *Mbnl1*. Nous avons déterminé que l'inclusion de l'exon 7 était augmentée par l'expression de répétitions CUG et CCUG et lors de la déplétion du facteur d'épissage Mbnl1 (*siMbnl1*, 5^e piste). Cependant, nous avons aussi identifié des problèmes d'expression et d'épissage de ce minigène, notamment avec la présence de produits PCR de grande taille sur le gel d'électrophorèse (non montré). Nous avons testé, sans succès, diverses lignées cellulaires (COS1, Neuro2A, HEK, C2C12), mais ces problèmes ont persisté. La raison la plus probable est que les troncations des introns de ce minigène par rapport à la séquence de *BIN1* normal ont perturbé le bon fonctionnement de la machinerie d'épissage.

II.B.2) Minigène, deuxième version

Pour poursuivre nos expériences d'épissage, nous avons construit un nouveau minigène (minigène v.2) en utilisant cette fois un plasmide pcDNA3.1 de base, contenant le promoteur CMV (cytomégalovirus). Nous avons utilisé les séquences entières des exons 6, 7 et 8, ainsi que de l'intron 6, mais une partie seulement de l'intron 7, qui était trop long pour être utilisé en entier. Afin d'optimiser notre approche, nous avons réalisé plusieurs variants de ce minigène qui contiennent les parties 3' et 5' de l'intron 7 de longueurs différentes. Nous avons réalisé au total 6 minigènes v.2 notés de A à F, et dont la structure est présentée **Figure 45A**, page suivante. Afin de sélectionner le meilleur minigène, nous avons étudié leurs épissages dans diverses lignées cellulaires et avons sélectionné des cellules de type neuronal (Neuro2A, N2A) qui montrent un taux d'inclusion basal de l'exon 7 plus important que les cellules d'origine non neuronale (HEK293, HeLa, COS1, etc.). En effet, l'exon 7 est exprimé spécifiquement dans le cerveau, donc l'exclusion presque complète de celui-ci dans

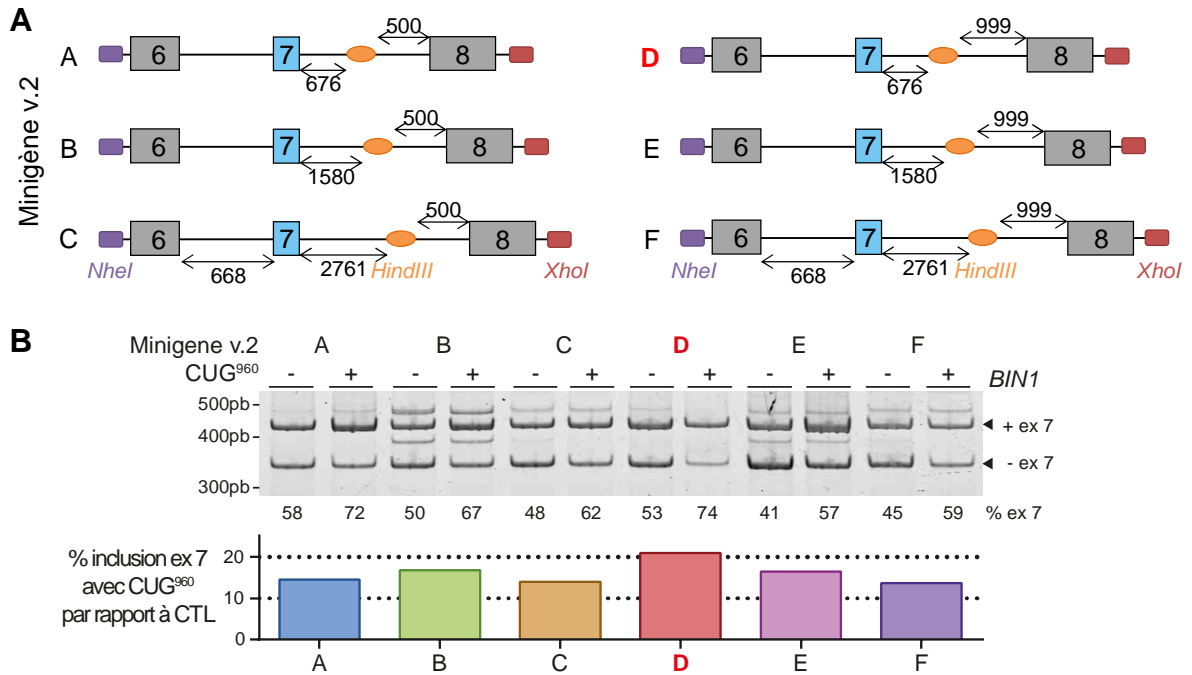


Figure 45 : Clonage des 6 différents variants de la deuxième version du minigène *BIN1* exon 7 et test d'épissage sous l'effet de répétitions CUG.

(A) Représentation schématique des différentes constructions du minigène v.2. La longueur des introns est donnée en paire de base. (B) Analyse de l'épissage des 6 différents minigènes v.2 A à F, seuls (-), ou en présence de 960 répétitions CUG (+), dans des cellules Neuro2A. Le pourcentage d'épissage de l'exon 7 du minigène co-exprimé avec les répétitions CUG par rapport à la condition contrôle, sans CUG, est représenté sous forme d'histogramme, sous le gel d'électrophorèse. Le minigène répondant le mieux aux répétitions CUG est le v.2D (en rouge).

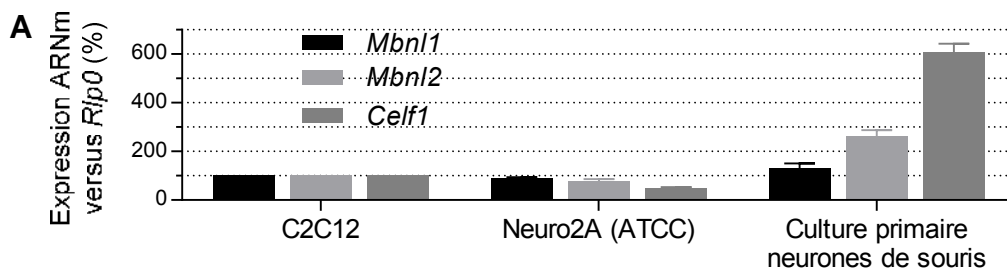


Figure 46 : Analyse de l'expression des ARNm *Mbnl1*, *Mbnl2* et *Celf1*.

Résultat de RT-PCR quantitative pour les ARNm *Mbnl1* (noir), *Mbnl2* (gris clair) et *Celf1* (codant pour Cugbp1 ; gris foncé) par rapport à l'ARNm *Rplp0*. Expérience réalisée à partir d'ARN de myoblastes C2C12 (gauche), de cellules Neuro2A-ATCC (milieu) et de culture primaire de neurones de souris (droite). Résultats exprimés en pourcentage par rapport aux C2C12 dont les valeurs ont été fixées à 100%.

des cellules non neuronales n'est guère surprenante. Voulant tester l'effet de répétitions CUG sur les protéines MBNL et CUGBP1, nous avons aussi vérifié que ces cellules N2A exprimaient bien *Mbnl1*, *Mbnl2* et *Celf1* (codant pour Cugbp1). Des expériences de RT-PCR quantitative (**Figure 46**) montrent que les cellules Neuro2A expriment *Mbnl1* et *Mbnl2* à un niveau comparable aux myoblastes C2C12, par contre l'expression de *Celf1* est diminuée de moitié. Nous avons aussi analysé le taux d'expression de ces ARN dans des cultures primaires de neurones de souris, où, comme attendu, l'expression de *Mbnl2* est plus forte que celle de *Mbnl1*. A propos de *Celf1*, nous avons mis en évidence une expression nettement supérieure (6 fois plus) dans les cultures primaires par rapport aux autres cellules, suggérant un rôle important de CUGBP1 dans les neurones. Cette approche nous a donc permis de confirmer que les ARNm *Mbnl1*, *Mbnl2* et *Celf1* étaient bien exprimés dans les cellules que nous utilisons pour l'étude du minigène *BIN1* exon 7. Nous avons alors testé nos 6 minigènes v.2A à F en cellules N2A, seuls, ou sous l'effet de répétitions CUG (**Figure 45B**). Parmi ces minigènes, j'ai choisi la construction v.2D, qui présente un taux basal d'inclusion de l'exon 7 de 53% qui atteint les 74% lorsque l'on co-exprime des répétitions CUG, cette différence de 21% étant la plus forte parmi tous les minigènes que j'ai testé. Cette construction a été nommée par la suite « minigène *BIN1* exon 7 WT » dans la Figure 3 de la publication.

II.C. Promotion de l'expression de l'exon 7 via oligonucléotides antisens

L'utilisation d'AAV (virus adéno-associé) conduit à une surexpression de *BIN1* exogène. Nous avons donc voulu trouver une approche pour induire l'expression endogène de l'exon 7 de *BIN1 in vivo*. Pour cela, nous avons testé divers oligonucléotides antisens (ASO) dirigés contre les séquences introniques bordant l'exon 7. En effet, plusieurs études ont montré que des ASO pouvaient induire l'exclusion d'un exon (exon skipping) via le masquage de sites d'épissage, empêchant ainsi l'assemblage de la machinerie d'épissage sur cet exon (Voir l'exemple pour *CLCN1* en **Figure 30** de l'introduction). De même, et quoique plus rarement utilisés, des ASO peuvent mener à l'inclusion d'un exon lorsqu'ils sont dirigés contre une séquence régulant négativement l'épissage. Notre approche consistait donc à cibler les séquences autour de l'exon 7 reconnues par la protéine MBNL1. Ainsi, l'hybridation d'ASO à ces séquences empêcherait le recrutement de MBNL1, ce qui inhiberait son effet négatif sur l'épissage de l'exon 7, favorisant de ce fait son inclusion.

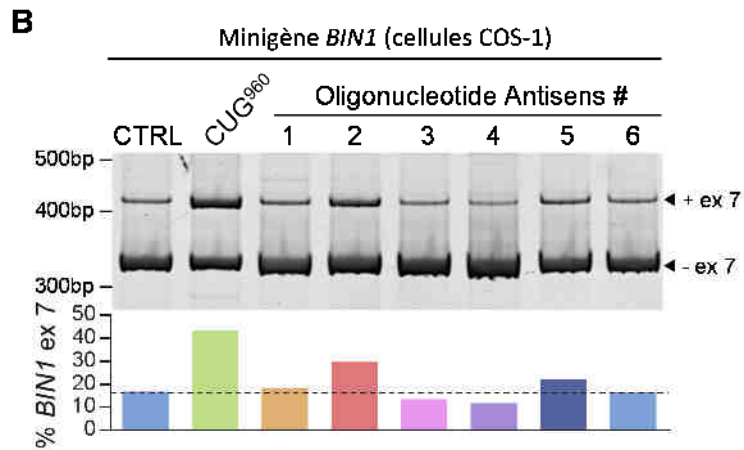
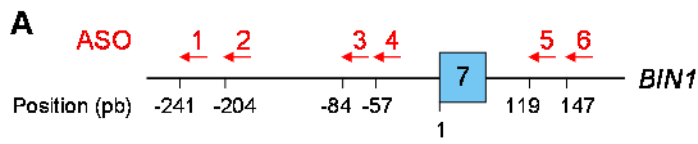


Figure 47 : Localisation et test des ASO pour l'exon keeping de *BIN1* exon 7.

(A) Localisation des ASO (numérotés 1 à 6 en rouge) sur la séquence de *BIN1*.

(B) Test d'épissage du minigène *BIN1* seul (CTRL), sous l'effet des répétitions CUG (CUG⁹⁶⁰) ou des ASO (# 1 à 6) dans des cellules COS.

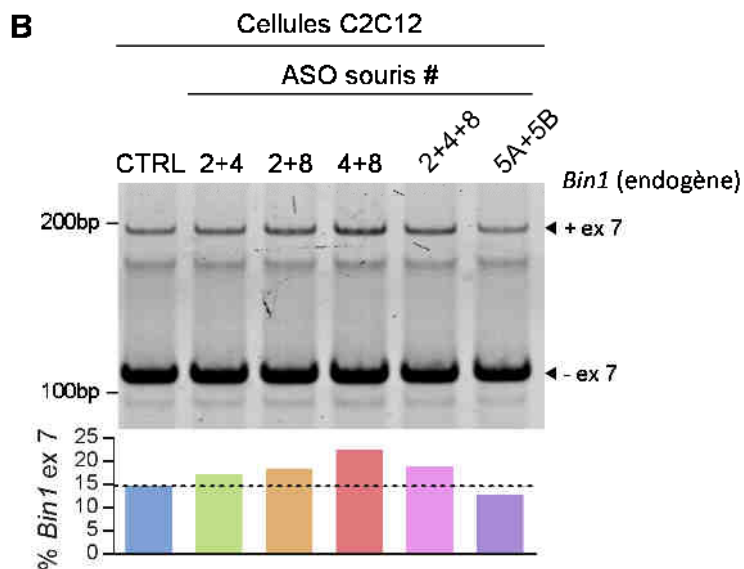
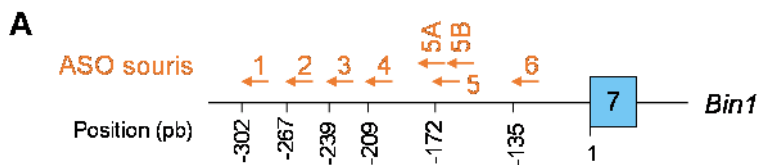


Figure 48 : Localisation et effet des ASO sur *Bin1* murin.

(A) Localisation des ASO (numérotés 1 à 6 en orange) sur la séquence de *Bin1*. L'ASO 5 qui possédait une forte structure secondaire a été divisé en deux ASO différents, l'ASO 5A et 5B.

(B) Test d'épissage de l'exon 7 de *Bin1* endogène aux cellules C2C12, sans (CTRL) ou avec des ASO combinés en paire ou en trio pour un meilleur effet.

Au total, nous avons sélectionné 6 ASO qui reconnaissent les séquences introniques bordant l'exon 7 et possédant des sites de fixation pour MBNL1 (**Figure 47A**). Ces ASO contiennent des nucléotides modifiés (2'O-Me) afin d'être plus stables et pour éviter leur reconnaissance par la RNase H.

Dans un premier temps, nous avons testé l'effet de ces ASO sur le minigène *BIN1*. Comme le montre le gel d'électrophorèse en **Figure 47B**, seul l'ASO #2 a un effet notable, avec 13% d'exon 7 inclus en plus vis-à-vis du minigène seul. Cette expérience montre donc la faisabilité d'une approche « d'exon keeping » avec des ASO ciblant les sites de fixation de MBNL1 présents sur l'ARN *BIN1*, menant à l'augmentation de l'inclusion de l'exon 7. Toutefois, il faut noter que le minigène ainsi que les ASO ci-dessus correspondent à la séquence humaine de *BIN1*. Or, notre objectif était d'induire l'expression de l'exon 7 *in vivo* dans le muscle de souris. Pour cela, nous avons utilisé de nouveaux ASO, reconnaissant cette fois les séquences introniques de *Bin1* murin où des sites potentiels de liaison de Mbn1 étaient présents (**Figure 48A**). Nous avons utilisé des cellules C2C12, qui sont des myoblastes de souris. Cependant, les ASO utilisés individuellement n'avaient qu'un effet très limité sur l'épissage de l'exon 7 de *Bin1* endogène dans les cellules C2C12 (non montré). C'est pourquoi nous avons décidé de combiner les ASO ayant les effets les plus marqués de manière à potentialiser leur impact sur l'épissage de l'exon 7 murin. Nous avons donc testé les ASO en duo ou trio, mais avec une inclusion basale de l'exon 7 à hauteur de 15% (condition CTRL), nous n'avons obtenu qu'une augmentation de 9% grâce à la combinaison des ASO #4 et #8 (**Figure 48B**). L'ajout d'un troisième ASO supplémentaire, n'augmente pas plus, voire diminue l'inclusion de l'exon 7 (condition ASO #2+4+8). Nous avons même observé des ASO qui avaient pour effet de diminuer l'inclusion de l'exon 7 par rapport au contrôle, montrant potentiellement qu'une séquence de régulation positive de l'épissage avait été touchée (ASO #5A+5B). Au vu de ces résultats peu encourageants, nous avons alors abandonné cette approche d'exon keeping *in vivo* chez la souris. En effet, l'augmentation d'inclusion de l'exon 7 provoquée par les ASO n'est pas assez forte pour espérer un phénotype chez la souris. Nous nous sommes alors concentrés sur l'approche avec virus AAV pour étudier l'effet de l'exon 7 sur le muscle *in vivo* (Cf. Figure 5 du manuscrit).

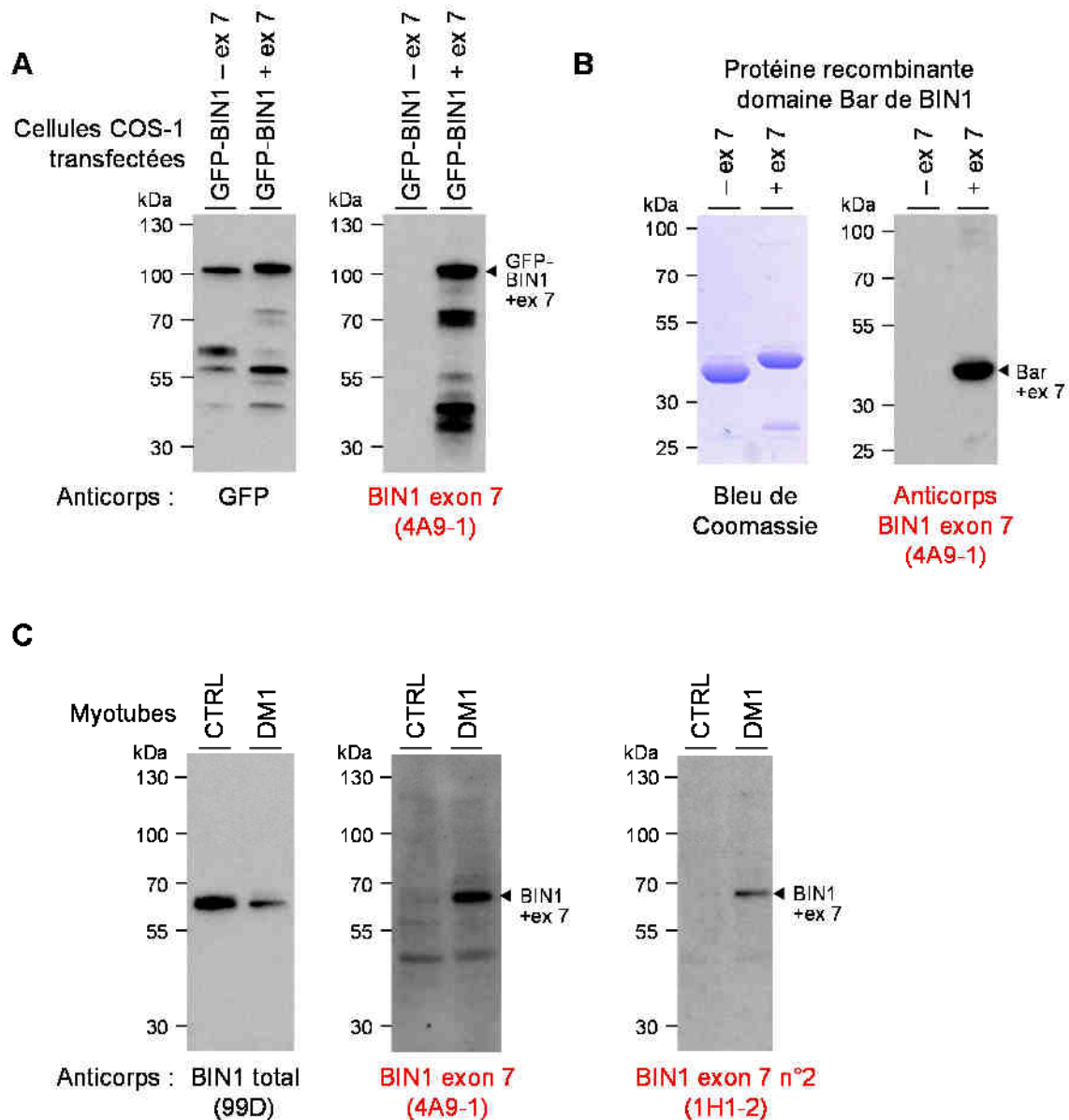


Figure 49 : Evaluation de la spécificité de l'anticorps anti-exon 7 de BIN1.

(A) Western blot sur lysat protéique de cellules COS-1 transfectées avec BIN1 contenant ou non l'exon 7, et en utilisant l'anticorps GFP (*blot de gauche*), ou l'anticorps anti-exon 7 (*blot de droite*). (B) Migration sur gel de protéines recombinantes du domaine Bar de BIN1 avec ou sans exon 7, suivi d'une coloration au bleu de Coomassie (*à gauche*) ou d'un western blot utilisant l'anticorps anti-exon 7 (*à droite*). (C) Evaluation par western blot de l'expression de BIN1 total (*blot de gauche*) ou de BIN1 contenant l'exon 7 (*blots du milieu et à droite*) dans des myotubes issus de patients contrôle (CTRL) ou DM1. Le poids moléculaire est exprimé en kilodaltons (kDa).

II.D. Validation de l'anticorps anti-BIN1 exon 7

Afin d'étudier plus précisément l'expression de BIN1 contenant l'exon 7 au niveau protéique, nous avons mis au point un anticorps anti-exon 7, en collaboration avec le service de production d'anticorps de l'IGBMC (Mustapha OULAD-ABDELGHANI). Cet anticorps a été dirigé contre le peptide entier de l'exon 7 de BIN1 humain, la séquence de ce peptide apparaît ci-dessous :

Nter – PVSLLLEKAAPQWCQGKQLQAHLVAQTNLLRNQ - Cter

Nous avons tout d'abord vérifié la spécificité de cet anticorps sur un lysat de cellules COS-1 transfectées avec *BIN1* contenant ou non l'exon 7 et fusionné à la GFP (**Figure 49A**). A l'aide de l'anticorps anti-GFP, nous avons été capables de détecter les protéines transfectées dans les deux échantillons, c'est à dire BIN1 contenant ou non l'exon 7. Par contre notre anticorps anti-exon 7 reconnaît seulement BIN1 avec exon 7. Ensuite, nous avons exprimé le domaine Bar de BIN1 recombinant, avec ou sans exon 7, et évalué la spécificité de l'anticorps sur ces protéines (**Figure 49B**). Encore une fois, l'anticorps anti-exon 7 détecte uniquement le domaine Bar contenant l'exon 7. Finalement, nous avons utilisé des protéines issues de myotubes en culture, provenant de patients contrôles ou DM1 (**Figure 49C**). La protéine BIN1 est exprimée dans les deux cas, c'est-à-dire à la fois dans les myotubes contrôles et DM1. En effet, l'anticorps commercial BIN1 [99D] utilisé, est dirigé contre le domaine MBD (exons 17 et 18 de BIN1) et détecte la protéine BIN1 indépendamment de la présence ou non de l'exon 7 (BIN1 total ; western blot de gauche). Au contraire, l'anticorps anti-exon 7 ne détecte qu'une bande dans l'échantillon protéique de myotubes DM1. Cela montre que l'exon 7 est exprimé uniquement dans les cellules musculaires DM1, alors qu'il est absent dans les myotubes normaux. Nous avons répété ces résultats avec un second clone d'anticorps (1H1-2), détectant aussi une bande correspondant à BIN1+ex7, uniquement dans les myotubes DM1 et non dans les contrôles. Ces résultats confirment donc la possibilité de l'utilisation d'un anticorps dirigé contre l'exon 7 de BIN1, pour des expériences de western blot sur des tissus humains.

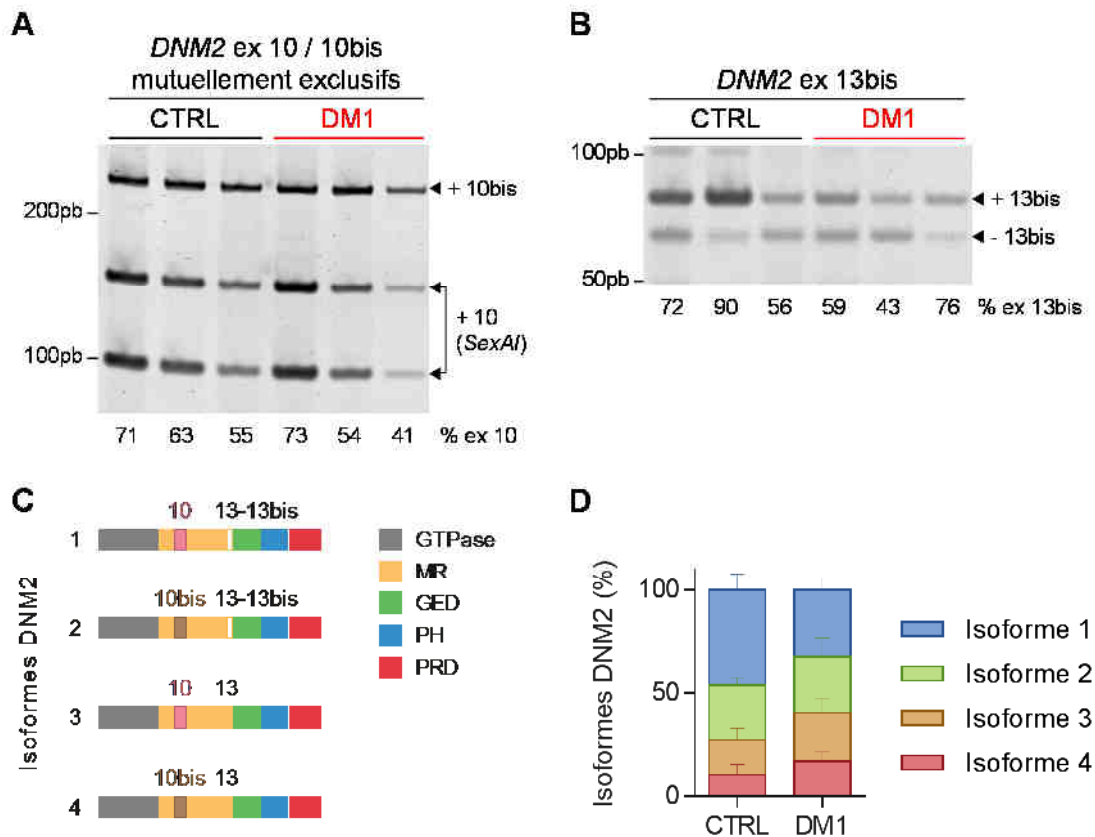


Figure 50 : Epissage de *DNM2* et distribution des isoformes dans le muscle.

(A) RT-PCR de *DNM2* afin d'étudier l'épissage des exons mutuellement exclusifs 10 / 10bis et de l'exon alternatif 13bis (B) dans le muscle de patients sains (CTRL, noir) et de patients DM1 (DM1, rouge). (C) Représentation schématique des différentes isoformes de *DNM2* avec les exons alternatifs 10 (rose), 10bis (marron) et 13bis (blanc). Les domaines protéiques apparaissent aussi et sont représentés en différentes couleurs. GTPase, domaine GTPase. MR, Middle Region. GED, GTPase Effector Domain. PH, domaine Pleckstrin Homology. PRD, Proline Rich Domain. (D) Évaluation du pourcentage de chaque isoforme de *DNM2* dans le muscle de patients sains ou DM1 à partir des résultats de RT-PCR.

II.E. Distribution des isoformes de l'ARNm *DNM2* dans le muscle

Il existe deux épissages alternatifs pour l'ARNm *DNM2*, il s'agit des exons mutuellement exclusifs 10 et 10bis ainsi que de l'exon alternatif 13bis. Compte tenu de l'importance de la Dynamine 2 dans les CNM, nous avons étudié son épissage dans le muscle de patients contrôles et DM1. Concernant les exons 10 et 10bis, puisqu'ils ont la même taille, le test d'épissage a nécessité de digérer les RT-PCR par l'enzyme de restriction *SexAI*, dont le site n'est présent que dans l'exon 10. Ainsi, sur le gel d'électrophorèse, on obtient deux bandes correspondantes à la forme contenant l'exon 10 (**Figure 50A**). La quantification montre une tendance vers la diminution de l'exon 10 chez les patients DM1, bien que cela ne soit pas significatif. Pour l'épissage de l'exon 13bis présenté en **Figure 50B**, il existe aussi une tendance non significative pour la diminution de l'exon 13bis. Ces deux épissages alternatifs donnent naissance à 4 isoformes de la *DNM2* qui sont représentées en **Figure 50C**. Nous avons combiné les résultats des tests d'épissage, pour obtenir une distribution des différentes isoformes de l'ARN *DNM2* chez les patients contrôles et DM1 et l'avons représenté sous forme de graphique en **Figure 50D**. A l'aide de cette représentation, nous avons pu observer chez les patients DM1 par rapport aux contrôles, à la fois une diminution de l'isoforme 1 et une augmentation des isoformes 3 et 4. Bien qu'il y ait une tendance de changement de distribution de l'ARNm *DNM2* entre les patients sains et DM1, cela reste faible et non significatif. En outre, pour notre expérience d'interaction *in vitro* de la *DNM2* avec *BIN1* réalisée dans le manuscrit (Figure 6 de la publication), nous avons exprimé les 4 isoformes de la *DNM2*. Cependant, nous n'avons observé aucune différence d'interaction de *BIN1* selon l'isoforme de *DNM2* utilisée. Nous avons donc conclu que l'épissage de la *DNM2* n'est pas significativement altéré chez les patients DM et ne change pas particulièrement son interaction avec *BIN1*.

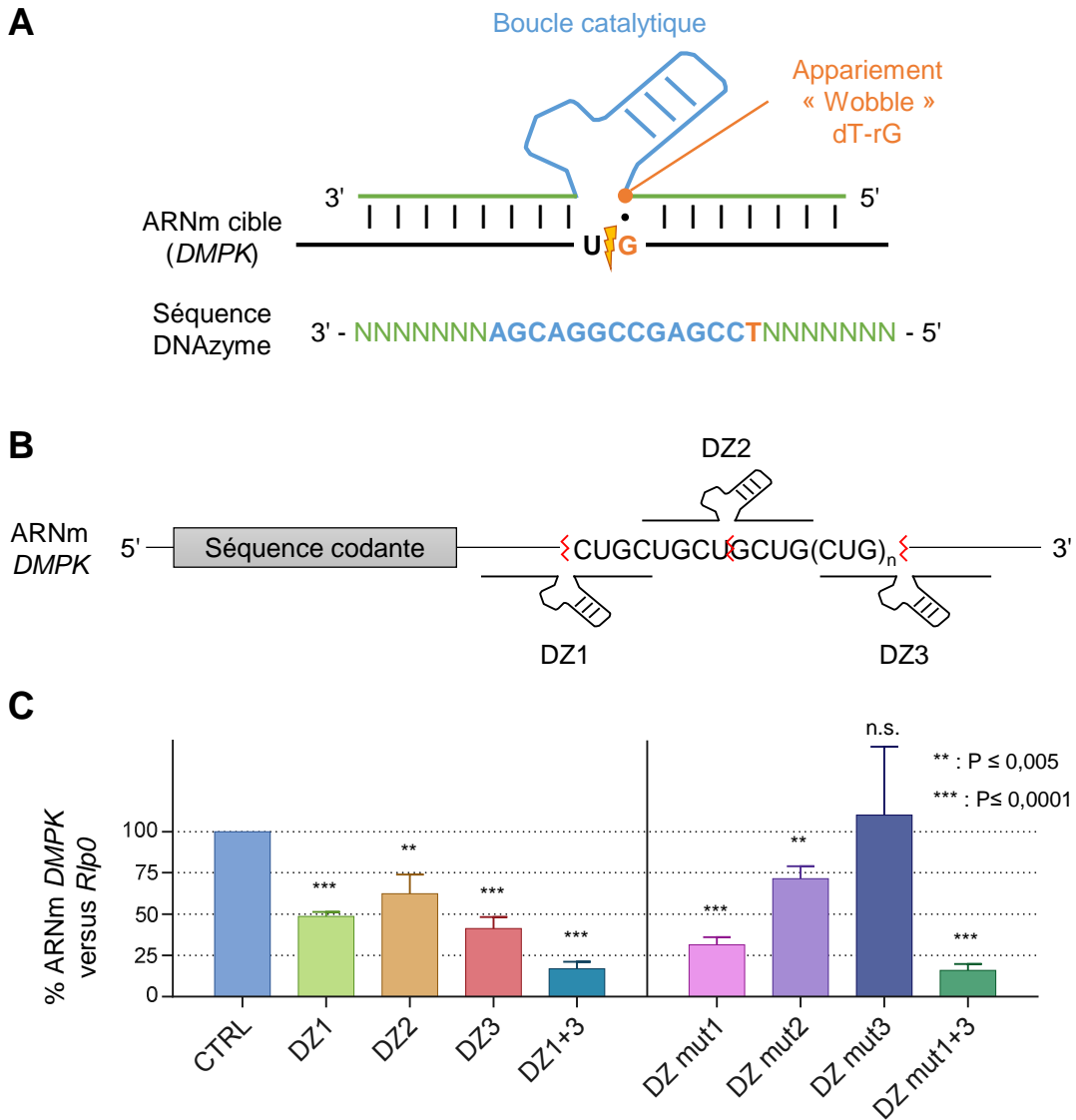


Figure 51 : Structure des DNAzymes, localisation et effet sur l'ARNm *DMPK*.

(A) Structure et séquence d'une DNAzyme, montrant la boucle catalytique (bleu), les bras de chaque côté s'hybridant à l'ARN à dégrader (vert) et la zone de clivage (éclair orange) d'après Santoro & Joyce, 1997. (B) Représentation schématique de la localisation des DNAzymes utilisées (DZ). Elles ciblent la région 3'UTR de l'ARNm *DMPK*, en amont (DZ1), à l'intérieur (DZ2) ou en aval (DZ3) des répétitions CUG. (C) Résultats de RT-PCR quantitative pour l'ARNm *DMPK* par rapport à *Rlp0*. Expérience réalisée à partir d'ARN de myoblastes issus de patients DM1 non traités (CTRL), traités avec les différentes DNAzymes normales (gauche) ou inactives (droite). Résultats exprimés en pourcentage par rapport à la condition CTRL dont les valeurs ont été fixées à 100%.

Outre l'étude de l'épissage de l'exon 7 de *BIN1* dans la dystrophie myotonique, je me suis intéressé à plusieurs autres sujets de recherche, dont la génération de nouveaux modèles murins de la DM et la recherche d'une nouvelle approche pour cibler et dégrader l'ARN *DMPK* portant les expansions de répétitions CUG. Ces deux sous projets sont présentés ci-dessous.

II.F. Tentative de dégradation de l'ARNm *DMPK*

Nous avons testé une nouvelle approche pour cibler l'ARNm *DMPK* toxique et le dégrader, en se basant sur l'utilisation d'une enzyme ADN, aussi appelée DNAzyme (DZ). Les DZ sont des ADN simples brins possédant une activité de type ribozyme, c'est-à-dire qu'elles sont capables de couper l'ARN. Elles sont composées d'une boucle catalytique centrale entourée par deux bras de reconnaissance qui s'hybrident à l'ARN cible (pour revue Isaka, 2007). La coupure de l'ARN a lieu entre une base U non appariée et une base G en appariement de type « flottant » avec la DZ (**Figure 51A**, d'après Santoro & Joyce, 1997). Nous avons donc testé trois DNAzymes ciblant différentes parties de la région 3'-UTR de l'ARNm *DMPK*. Ainsi, DZ1 cible la séquence en amont des répétitions CUG, DZ2 s'hybride directement sur les répétitions CUG alors que DZ3 cible la partie en aval des répétitions (**Figure 51B**). Afin d'étudier l'effet de ces DNAzymes sur l'ARNm *DMPK* pathogénique, nous avons transfecté ces DNAzymes dans des myoblastes immortalisés issus de patients DM1 et évalué le taux d'expression de l'ARNm *DMPK* par qPCR. Après traitement des myoblastes DM1 avec DZ1, 2 ou 3, nous avons observé une diminution marquée de *DMPK*, montrant une dégradation de celui-ci engendrée par les DNAzymes. De plus, lorsque DZ1 et DZ3 sont combinées, cela potentialise l'effet sur *DMPK*. En effet, utilisées seules, DZ1 et DZ3 diminuent respectivement le taux de *DMPK* de 51% et 59%, alors que réunies, on obtient une diminution de 83% (**Figure 51C** à gauche). Ces résultats valident donc le potentiel des DNAzymes pour dégrader l'ARN *DMPK*. Pour prouver que la dégradation de *DMPK* se produit bien à cause de l'activité DNAzyme, nous avons alors utilisé des DNAzymes inactives car mutées au niveau de la boucle catalytique. Cependant, comme le montrent les résultats de qPCR obtenus après traitement des myoblastes DM1 avec ces DNAzymes mutées (DZmut), on observe toujours une diminution du taux d'ARN *DMPK*. En effet, l'utilisation des DZmut1 ou DZmut2 engendre un effet similaire sur la quantité de *DMPK*, comparé à leurs homologues non mutés. Seule la DZmut3 avait l'air d'avoir un effet négligeable utilisée seule.

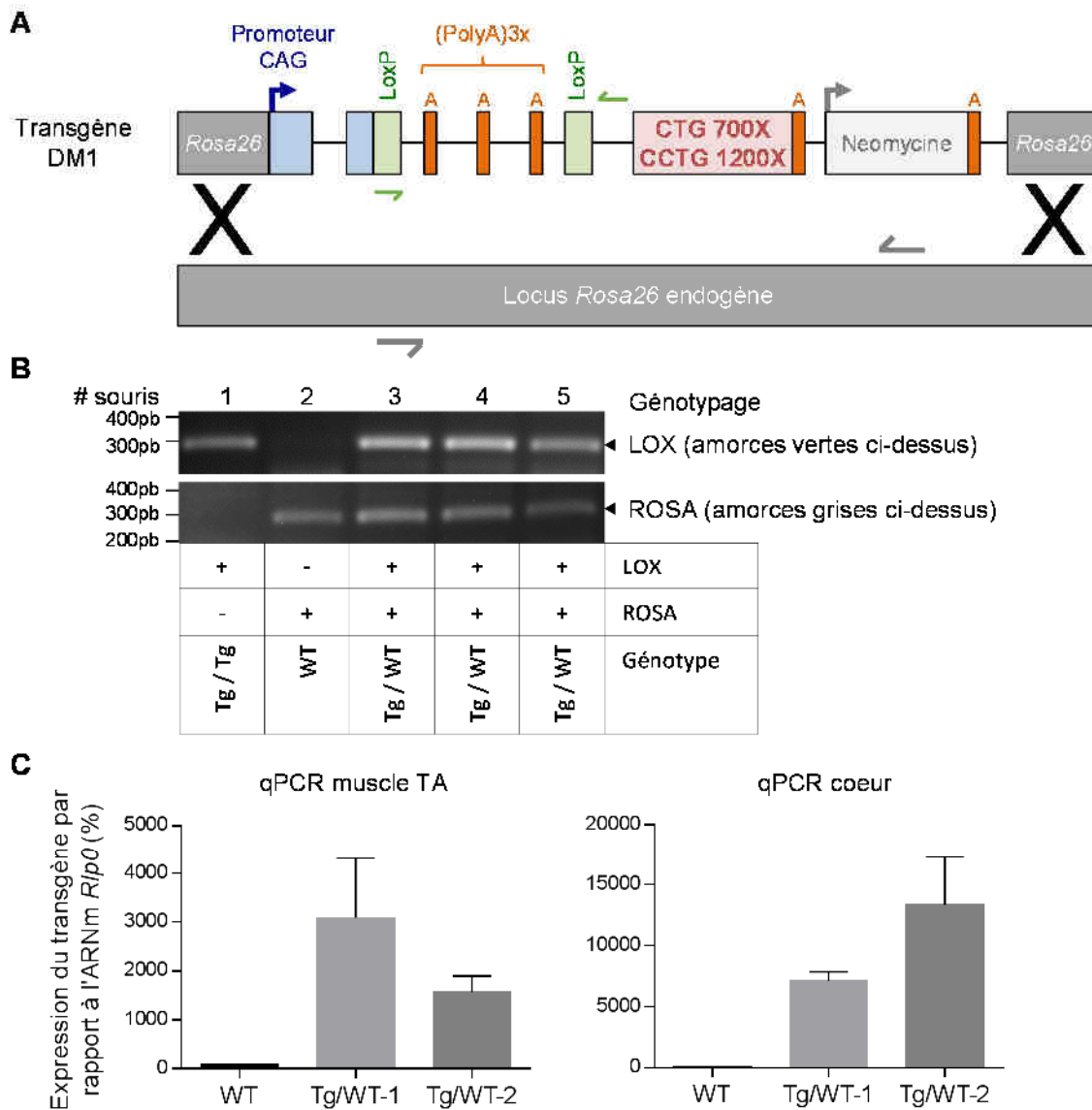


Figure 52 : Transgène utilisé pour les souris modèles des DM1 et DM2, génotypage et étude de la surexpression du transgène.

(A) Schéma du transgène utilisé pour créer la lignée de souris transgéniques modèles de la DM1 (700 répétitions CUG) et de la DM2 (1200 répétitions CCUG). (B) Gels de génotypage LOX et ROSA des souriceaux n°1 à 5 de la lignée DM1. Le tableau résume les résultats de génotypage ainsi que le génotype obtenu pour chaque souris. (C) RT-PCR quantitative de l'ARNm du transgène DM1 par rapport à l'ARNm *Rip0* dans le muscle TA et le cœur afin de vérifier la surexpression du transgène. Résultats exprimés en pourcentage par rapport à la souris WT dont la valeur a été fixée à 100%. Des résultats similaires ont été obtenus pour la lignée de souris DM2.

Cependant, la combinaison de DZmut 3 avec DZmut1 conduit à une diminution de *DMPK* aussi forte que le même duo de DNAzymes non mutées (**Figure 51C** à droite). En conclusion, à la fois les DNAzymes normales et inactives mènent à la dégradation de l'ARN *DMPK* dans les cellules DM1. Ainsi, l'activité ribozyme intrinsèque à ces DNAzymes n'a que peu ou pas d'importance pour dégrader *DMPK*. Il est probable que cette dégradation se produise via un mécanisme différent, comme par exemple via la RNase H, qui digère les duplex ARN-ADN. Notre approche n'est donc pas novatrice, puisqu'une stratégie utilisant des oligonucléotides antisens de type gapmères est déjà en cours de développement pour la DM (Wheeler et al., 2012 ; Pandey et al., 2015).

II.G. Tentative de génération de modèles murins de la DM1 et DM2

II.G.1) Réalisation des lignées

Nous avons tenté de développer deux modèles murins des DM, l'un, exprimant 700 répétitions CUG (DM1) et l'autre, 1200 répétitions CCUG (DM2). Pour cela, nous avons cloné le transgène schématisé en **Figure 52A**. Un promoteur CAG garantit une expression élevée et ubiquitaire du transgène, et une insertion dans le locus neutre *Rosa26* permet d'éviter une insertion aléatoire potentiellement délétère. L'expression du transgène est réprimée par une cassette Lox-STOP, correspondant à 3 sites de poly-adénylation entourés de deux sites LoxP. Cette stratégie permet d'éviter une éventuelle létalité embryonnaire en utilisant une recombinaison Cre pour exprimer le transgène dans un tissu donné et à un temps donné. En collaboration avec la clinique de la souris (ICS), nous avons obtenu des cellules souches embryonnaires, puis des souris fondatrices transgéniques pour les répétitions C/CTG. Toutefois, des expériences de southern blot ont révélé que le nombre de répétitions CTG est passé de 700 à moins de 300. De même, les répétitions CCTG se sont contractées de 1200 à 1000 répétitions. Ces résultats décevants ne sont pas forcément surprenants compte tenu de l'instabilité connue des répétitions CTG et CCTG. Malgré cette diminution de la taille des répétitions, nous avons poursuivi ce projet et dans un premier temps, nous avons choisi d'exprimer le transgène dans l'organisme entier, par le croisement de nos souris fondatrices avec des souris exprimant la recombinaison Cre de façon ubiquitaire. Après des croisements successifs nous avons obtenu des souris hétérozygotes puis homozygotes pour l'expression des répétitions CTG ou CCTG (**Figure 52B**). Nous avons confirmé par qPCR, la surexpression du transgène, à la fois dans le muscle squelettique et cardiaque de souris hétérozygotes comparé à des WT (**Figure 52C**).

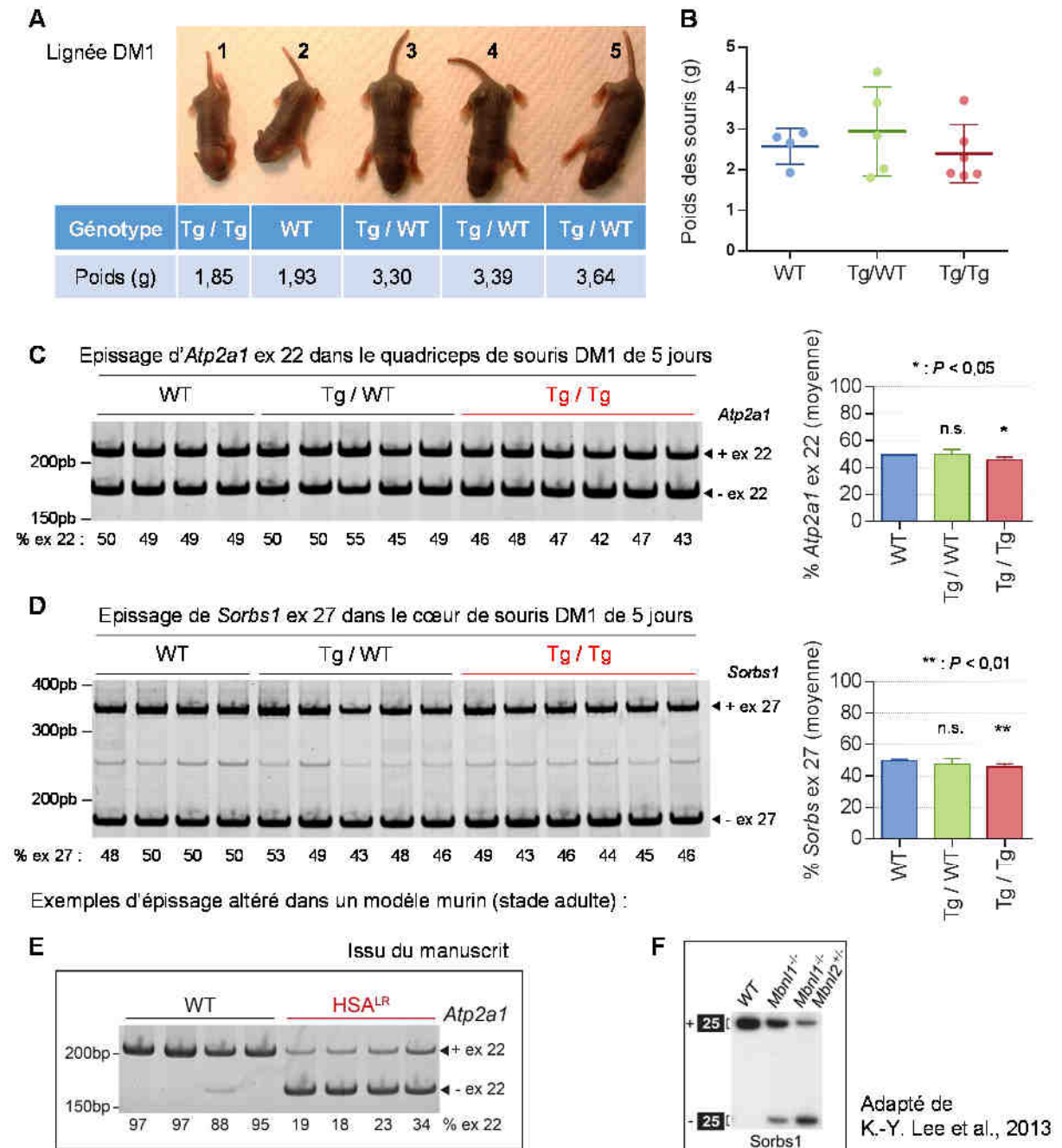


Figure 53 : Analyse du poids et de l'épissage des souris DM1 de 5 jours.

(A) Comparaison de la taille et du poids de 5 souriceaux issus de la même portée et âgés de 5 jours. (B) Analyse approfondie du poids des souriceaux DM1 de 5 jours. (C) RT-PCR d'*Atp2a1* exon 22 dans le quadriceps de souriceaux âgés de 5 jours sauvages (WT) ou transgéniques DM1 hétérozygote (Tg / WT) ou homozygotes (Tg/ Tg, rouge). (D) Test d'épissage de *Sorbs1* exon 27 dans le cœur de ces mêmes souris. *Atp2a1* et *Sorbs* sont des épissages connus pour être altérés chez les patients DM1 et dans les souris modèles de la DM1, comme c'est le cas pour les souris HSA^{LR} avec *Atp2a1* (E) et double knock-out *Mbn1*+*Mbnl2* avec *Sorbs1* (F, adapté de K.-Y. Lee et al., 2013).

II.G.1) Etude à l'état post-natal des souris DM1

Après avoir obtenu les premières portées de souris transgéniques de la lignée DM1, nous nous sommes aperçu que certains souriceaux étaient de plus petite taille comparés à leurs frères et sœurs, comme montré en **Figure 53A** (souris n°1 et 2 comparées aux autres). Cependant, nous n'avons pas été en mesure de relier ce défaut de taille avec un effet du transgène DM1. En réalité, après génotypage de ces souriceaux plus petit, nous avons obtenus à la fois des WT et des transgéniques, dont des hétérozygotes et homozygotes. Une analyse plus complète du poids, avec un plus grand nombre de souriceaux a montré que ce défaut de taille n'était effectivement pas lié au génotype (**Figure 53B**).

Néanmoins, nous avons poursuivi l'étude de ces souriceaux en analysant l'épissage de marqueurs connus de la DM1 tels que l'épissage de *Serca* (*Atp2a1*) pour le muscle squelettique (**Figure 53C**) et de *Sorbs1* pour le cœur (**Figure 53D**). Pour cela nous avons sacrifié plusieurs souris de chaque génotype (WT, hétérozygote et homozygote) à l'âge de 5 jours. Toutefois, nous n'avons observé que des altérations faibles, voire très faibles, de l'épissage alternatif dans ces souris. Au contraire, les souris HSA^{LR}, portant 250 répétitions CTG (**Figure 53E**) ou les souris invalidées pour les protéines Mbnl dans le muscle (**Figure 53F**), montrent bien un changement d'épissage alternatif entre WT et souris modèle. Ces résultats suggèrent donc que nos souris transgéniques DM1 âgées de 5 jours n'ont pas de phénotype observable, ni au niveau du poids, ni au niveau de l'épissage.

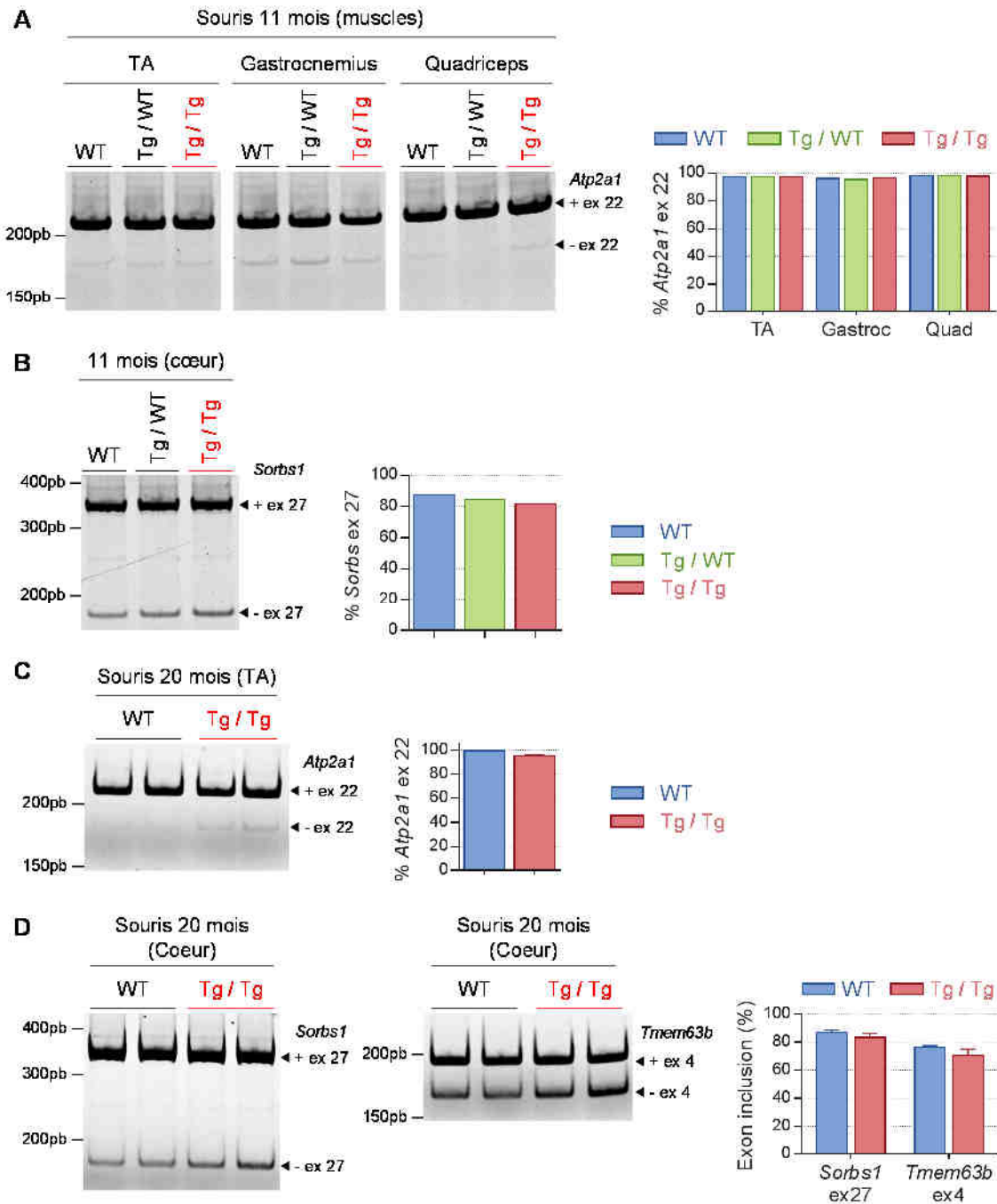


Figure 54 : Test d'épissage sur souris transgéniques DM1 adultes.

(A) RT-PCR d'*Atp2a1* exon 22 dans le TA de souris âgées de 11 mois (WT) ou transgéniques DM1 hétérozygote (Tg / WT) ou homozygotes (Tg/ Tg, rouge). (B) Test d'épissage de *Sorbs1* exon 27 dans le cœur de ces mêmes souris. (C) Epissage d'*Atp2a1* exon 22 dans le TA de souris âgées de 20 mois. (D) Test d'épissage de *Sorbs1* exon 27 et *Tmem63b* exon 4 dans le cœur de ces souris de 20 mois. A droite des gels apparaissent les pourcentages d'inclusion des exons correspondants.

II.G.2) Etude à l'âge adulte

Nous nous sommes alors intéressés aux souris transgéniques DM1 et DM2 plus âgées. Toutefois, les muscles TA, gastrocnemius, quadriceps et cardiaque de souris DM1 âgées de 11 mois ne montrent pas d'altérations d'épissage significative (**Figure 54A**), des résultats similaires ont été obtenus pour les souris DM2. Nous avons alors réalisé l'étude de souris encore plus âgées, c'est-à-dire de 20 mois, en espérant que l'accumulation des répétitions CUG ou CCUG sur une longue période de temps puisse conduire à des altérations de l'épissage. Cependant, cette fois encore, nous n'avons observé aucune différence significative pour les souris DM1 (**Figure 54B, C et D**) et DM2. Nous avons aussi étudié, mais sans succès, l'épissage de l'exon 4 de *Tmem63b*, de l'exon 29 de *Cacna1s*, des exons 7 et 11 de *Bin1*, de l'exon 2 de *Ryr2* et de l'exon 5 de *cTnT*. Devant ces résultats peu concluants nous avons toutefois confirmé la présence de petits et rares agrégats d'ARN CUG nucléaires par hybridation *in situ* (RNA FISH) et la co-localisation de la protéine MBNL1 avec ces foci d'ARN. Enfin, nous n'observons aucun phénotype évident dans ces souris transgénique âgées, comparées aux contrôles.

**Discussion
et
Perspectives**

Chapitre I. Discussion sur *BIN1* exon 7 et son implication dans la DM1

I.A. Inclusion anormale de l'exon 7 dans le muscle DM1

L'étude préalable de l'épissage de *BIN1* a montré que l'exon 7 était inclus de façon anormale dans le muscle de patients DM1, au contraire de l'exon 11, qui voit son inclusion diminuer dans la maladie (Fugier et al., 2011). De même, notre analyse de séquençage ARN, montre une altération de l'épissage de l'exon 7 de *BIN1* avec une différence d'épissage dans le muscle DM1 par rapport au muscle contrôle (Δ -psi) de 8% et un Z-score de 1,74. Nous avons confirmé cette altération par RT-PCR, et montré que l'inclusion de l'exon 7 était anormalement élevée dans des échantillons de muscle squelettique de patients DM1 adultes (moyenne de 18% avec 7 patients) et CDM1 (moyenne de 50% avec 6 patients) ainsi que dans des modèles murins de la maladie (Cf. Figure 2 du manuscrit). Concernant la régulation de cet épissage, nous avons montré, à l'aide d'un rapporteur d'épissage, que la protéine MBNL1 réprimait l'inclusion de l'exon 7 de *BIN1*. De plus, grâce à des expériences d'affinité ARN / protéine, nous avons mis en évidence que la protéine MBNL1 se liait à l'ARNm *BIN1* au niveau de motifs CUG localisés en amont de l'exon 7 (Cf. Figure 3 du manuscrit). Ces résultats montrent qu'en condition normale, MBNL1 inhibe l'inclusion de l'exon 7 dans le muscle adulte. Cependant, chez les patients DM1, MBNL1 est séquestrée par les répétitions CUG, ce qui va mener à une inclusion anormale de l'exon 7 de *BIN1*. De ce fait, nous avons émis l'hypothèse que l'exon 7, qui est normalement absent du tissu musculaire adulte, puisse être à l'origine d'un gain de fonction dans la DM. Cette hypothèse est consolidée par des données d'interactomique, suggérant que la présence de l'exon 7 de *BIN1* renforce l'interaction de la protéine BIN1 avec d'autres partenaires tels que la dynamine 2 (Ellis et al., 2012).

I.B. Conséquences de l'inclusion de l'exon 7 de *BIN1*

I.B.1) Faiblesse musculaire

Jusqu'à présent, les altérations d'épissage proposées pour participer au phénotype de faiblesse musculaire qui touche les patients DM sont celles de *DHPR* (*CACNA1S*), *RYR1*, *SERCA* (*ATP2A1*) *DMD* et *BIN1* exon 11 (Kimura et al., 2009 ; Fugier et al., 2011 ; Tang et al., 2012 ; Nakamori et al., 2013 ; Rau et al., 2015).

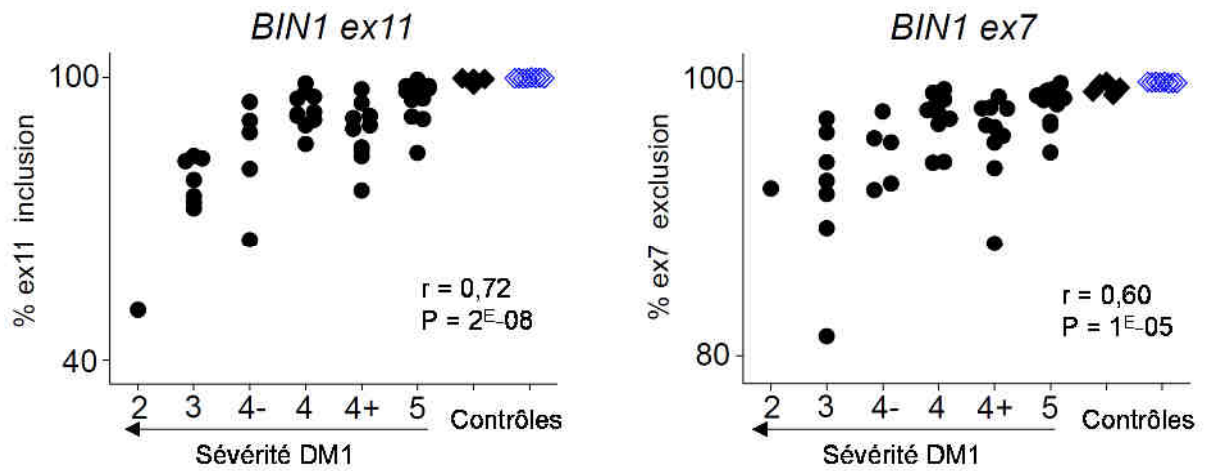


Figure 55 : Corrélation entre faiblesse musculaire et épissage dans la DM1

Représentation graphique de la corrélation entre faiblesse musculaire des patients DM1 et l'épissage des exons 7 et 11 de *BIN1*. Extrait de (Nakamori et al., 2013).

De plus, afin d'identifier des marqueurs potentiels de la maladie et de sa sévérité, notamment en ce qui concerne les problèmes musculaires, une corrélation entre la faiblesse musculaire et les dérégulations d'épissage de plusieurs ARN a été réalisée (Nakamori et al., 2013). Les candidats dont l'altération d'épissage corrèle le mieux avec la faiblesse musculaire sont les exons 7 et 11 de *BIN1* (Figure 55), l'exon 78 de *DMD* et les exons 11a et 12 de *DTNA* (dystrobrevin). Il est intéressant de noter que cette étude a aussi révélé que certains épissages fortement altérés dans la maladie, n'étaient pas reliés avec la faiblesse musculaire. Il s'agit des épissages d'*INSR*, *TTN* (titin), *RYR1* (ryanodine receptor), *CAMK2B* (calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2B) et *ARFGAP2* (ADP-ribosylation factor GTPase activating protein 2) qui seraient donc affectés de façon précoce, avant l'apparition des problèmes musculaires (Nakamori et al., 2013). Concernant l'exon 7 de *BIN1*, une altération d'épissage de seulement 5% est suffisante pour obtenir une corrélation avec la faiblesse musculaire, indiquant qu'une faible altération de son épissage pourrait contribuer aux altérations musculaires des patients DM1 (communication personnelle avec Charles Thornton). De plus, l'inclusion de l'exon 7 semble aussi corrélée avec la faiblesse musculaire dans les souris invalidées pour les protéines MBNL. En effet, chez les souris invalidées à la fois pour *Mbnl1* et *Mbnl2* dans le muscle, on observe une forte inclusion de l'exon 7 (80%, Cf. Figure 3 du manuscrit), en combinaison d'une atteinte musculaire sévère (K.-Y. Lee et al., 2013). Au contraire, les souris uniquement invalidées pour le gène *Mbnl1* développent des problèmes musculaires limités, c'est-à-dire une myotonie, mais peu de faiblesse musculaire. Ce phénotype est couplé à une inclusion de l'exon 7 de moins de 10% (Kanadia, Johnstone, et al., 2003). Par conséquent, les résultats obtenus à l'aide de ces souris modèles, mettent en avant une possible corrélation entre le niveau d'inclusion de l'exon 7 et la faiblesse musculaire. Pour confirmer cette théorie et connaître la vraie implication de l'épissage de l'exon 7 de *BIN1* dans l'affection musculaire de ces souris, il serait intéressant d'essayer une approche de saut d'exon en utilisant des ASO. En effet, forcer l'exclusion de l'exon 7 dans ces souris modèles de la DM1, afin de rétablir l'épissage normal de celui-ci, permettrait d'étudier si le phénotype musculaire est aussi rétabli.

Pour l'heure, nous avons évalué l'effet de l'exon 7 à l'aide d'injections de virus adéno-associés (AAV), exprimant différentes isoformes de *BIN1*, dans le muscle de souris sauvages. Ces expériences nous ont permis de mettre en évidence que les

souris injectées avec une construction de BIN1 contenant l'exon 7, développaient une faiblesse musculaire comparées aux souris injectées avec du PBS ou avec BIN1 sans exon 7. De plus, nous avons prouvé que cette diminution de force était indépendante à la diminution de la masse musculaire. Cela montre donc que l'expression forcée de l'exon 7 dans le muscle, va mener à une altération de la fonction musculaire. Pour rappel, l'inclusion de l'exon 7 est corrélée avec la faiblesse musculaire chez les patients DM1 (Nakamori et al., 2013), ainsi que dans les souris modèles de la maladie (Kanadia, Johnstone, et al., 2003 ; K.-Y. Lee et al., 2013). Enfin, des mutations dans le gène *BIN1* sont à l'origine de la myopathie centronucléaire (CNM), dont les caractéristiques histopathologiques sont similaires à celles de la DM1, notamment concernant la faiblesse et l'atrophie musculaire (Nicot et al., 2007 ; Böhm et al., 2013, 2014). Ces résultats, en plus de nos observations obtenues avec les AAV-BIN1, montrent donc que l'exon 7 est un candidat prometteur pour participer à la faiblesse musculaire touchant les patients DM1 et les souris modèles. Toutefois, il reste à déterminer les mécanismes moléculaires et cellulaires conduisant à cette faiblesse musculaire. L'atrophie des fibres musculaires et l'implication de BIN1 dans la genèse et le maintien des tubules-T, structures essentielles au couplage excitation-contraction, étant nos hypothèses principales, elles sont détaillées ci-dessous.

I.B.2) Taille des fibres musculaires

Au niveau histologique, les muscles des souris injectés avec les AAV-BIN1 montrent des fibres de taille réduite lorsqu'ils expriment une isoforme de BIN1 contenant l'exon 7. Au contraire, la surexpression de l'isoforme musculaire normale de BIN1 (-7+11), n'a pas d'effet sur la taille des fibres. De plus, une légère augmentation des noyaux centraux a été mise en évidence dans les muscles des souris, après l'injection d'AAV-BIN1 avec exon 7 (Cf. Figure 5 du manuscrit). La présence de noyaux centraux, en l'absence de régénération, est une caractéristique de la dystrophie myotonique ainsi que de la myopathie centronucléaire. Pour renforcer ces observations, l'équipe du Dr. Alan Beggs (Boston) a réalisé des études complémentaires à l'aide de poissons zèbres (zebrafish). Ces animaux ont, au préalable, été invalidés pour le gène *bin1* endogène, grâce à des oligonucléotides antisens (morpholinos ; MO), puis ont été complétés par différentes isoformes de *BIN1* humain. L'expression de BIN1 contenant l'exon 7 ne permet pas de corriger les altérations musculaires, au contraire des isoformes sans exon 7 (Fig. 4 du manuscrit).

Il est aussi intéressant de noter que, tout comme les souris exprimant BIN1 avec exon 7, les zebrafish ayant une diminution d'expression de *bin1* endogène suite au traitement par morpholinos, montrent une atrophie et une augmentation du taux de fibres avec des noyaux centraux. Ces résultats confirment donc nos données d'injection chez la souris et indiquent que l'inclusion de l'exon 7 dans BIN1 conduit à une protéine inadaptée à la physiologie du muscle adulte, qui pourrait notamment participer à l'atrophie et à la localisation anormalement centrale des noyaux au sein des fibres musculaires.

Les patients atteints de dystrophie myotonique possèdent eux aussi des fibres musculaires de plus petite taille, ainsi que des noyaux centraux. Pour rappel, chez les patients atteints de la forme conventionnelle de DM1, l'exon 7 est inclus à hauteur de 10 à 20%, alors que chez les patients souffrant de la forme sévère CDM1, cette inclusion atteint près de 50%. Il serait donc intéressant d'identifier si seules les fibres atrophiées expriment fortement l'exon 7, ou s'il s'agit plutôt d'une expression faible dans toutes les fibres. Nous avons initiés une telle approche en produisant un anticorps dirigé spécifiquement contre le peptide encodé par l'exon 7 de *BIN1*. Aussi, à l'aide de la collaboration avec des cliniciens Italiens (Dr. Giovanni Meola), nous avons testé cet anticorps sur des coupes musculaires de patients DM. Cependant, ces expériences sont restées infructueuses, en effet, notre anticorps contre l'exon 7 utilisé en immunohistochimie marque les noyaux de façon non spécifique, à la fois sur des coupes paraffinées de patients contrôles ou DM. Une autre possibilité serait de détecter l'inclusion de l'exon 7 au niveau ARN par des expériences de RNA-FISH ou de RT-PCR *in situ* sur des coupes musculaires de patients DM ou de souris modèles, afin de détecter les zones qui expriment le transcrit *BIN1* contenant l'exon 7. Une solution complémentaire à la RT-PCR *in situ*, serait de procéder à la dissection de fibres musculaires isolées, en réunissant d'un côté, les fibres atrophiées DM1, et de l'autre, les fibres normales. Par la suite, la réalisation d'un test d'épissage de *BIN1* exon 7, au sein de chaque population de fibre, permettra de montrer s'il y a ou non, une plus forte expression de cet exon au sein des fibres atrophiées.

I.B.3) Altération des tubules-T

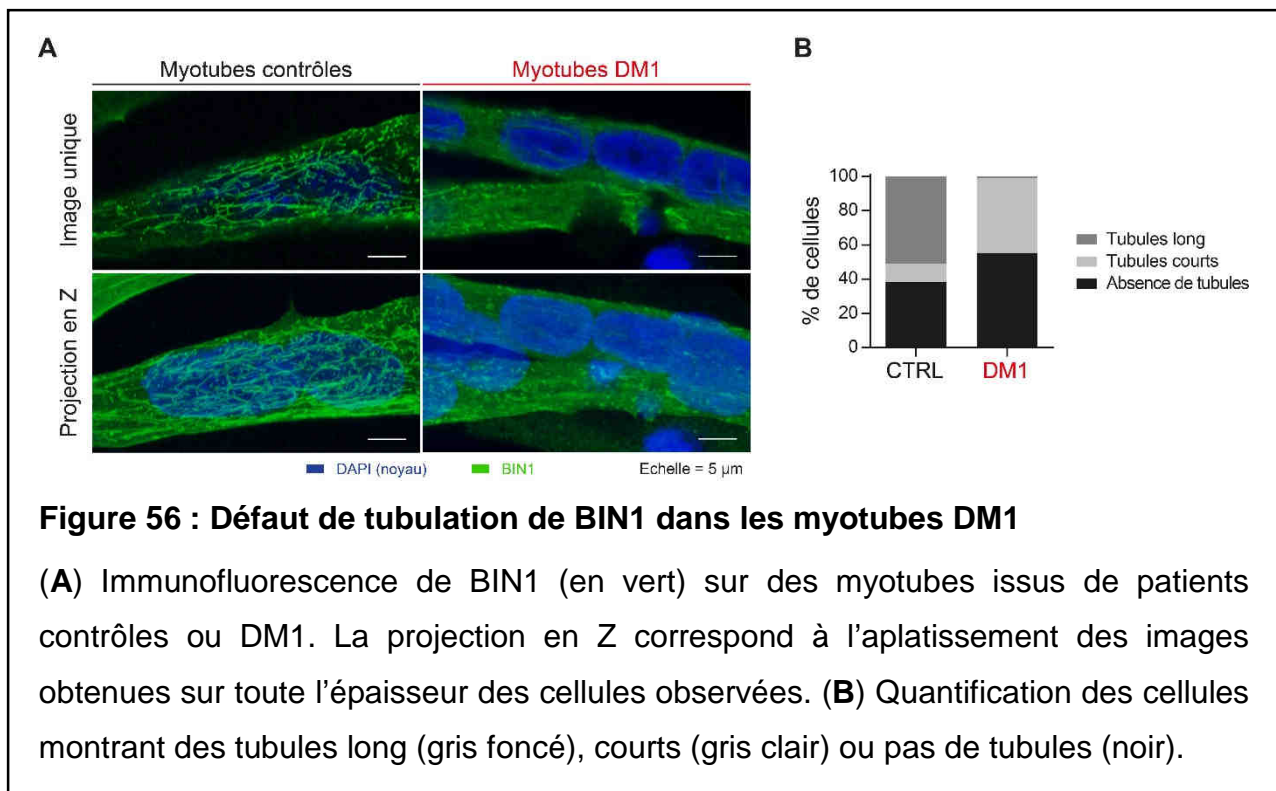
Nous avons cherché à comprendre l'origine de la faiblesse musculaire provoquée par l'expression de l'exon 7. En effet, comme démontré plus haut, l'expression forcée de l'exon 7 par injection d'AAV-BIN1, induit une atrophie et une faiblesse musculaire chez les souris, par rapport aux injections contrôles. De plus, nous avons discuté de la corrélation qui existe entre l'inclusion de l'exon 7 et la faiblesse musculaire des patients DM1 et des souris modèles de la maladie (Nakamori et al., 2013 ; K.-Y. Lee et al., 2013 ; Kanadia, Johnstone, et al., 2003). Cependant, le mécanisme par lequel l'inclusion de l'exon 7 dans BIN1 conduit à une atrophie et une faiblesse musculaire reste inconnu. Néanmoins, en sachant que BIN1 est impliqué dans la génération et la maintenance des tubules-T, qui sont d'importantes structures membranaires pour la fonction du muscle, nous avons étudié par microscopie électronique l'état des tubules-T après injection des AAV-BIN1 chez la souris. Ces expériences ont été réalisées à l'aide du Dr. Nadia Messadeq de la plateforme de microscopie électronique de l'IGBMC. Nous avons ainsi observé une difformité des tubules-T spécifiquement dans les muscles où l'exon 7 est exprimé. En effet, les muscles disséqués 1 ou 3 mois après l'injection d'une construction de BIN1 contenant l'exon 7, présentent des tubules-T anormalement orientées, enflées et même ramifiées. Alors qu'en temps normal, dans le muscle sain, les tubules-T sont longues et droites. Il est intéressant de noter que ces anomalies des tubules-T sont similaires à celles observées dans des modèles de drosophile, de zebrafish, de chien et de souris où l'expression de *BIN1* est diminuée (Razzaq, 2001; Tjondrokoesoemo et al., 2011; Böhm et al., 2013; Smith et al., 2014), indiquant ainsi que l'expression anormale de l'exon 7 de BIN1 dans le muscle squelettique induit probablement une perte de fonction de BIN1 endogène, sans doute par un mécanisme de type dominant négatif. Ainsi, ces tubules-T déformées pourraient être la cause de la force musculaire diminuée chez les souris injectées avec BIN1 exon 7, qui serait liée à une contraction musculaire sous-optimale.

Pour essayer de mieux comprendre les causes moléculaires menant à cette déformation des tubules-T, nous nous sommes concentrés sur le fait que l'exon 7 favorise l'interaction de BIN1 avec la DNM2. En effet, d'après des résultats d'interactomique à grande échelle, obtenus dans l'équipe du Professeur Blencowe (Ellis et al., 2012), et que nous avons validé par co-immunoprécipitation, la présence

de l'exon 7 renforce l'interaction de BIN1 avec la DNM2 (Cf. Figure 6 du manuscrit). De plus, ces expériences de co-immunoprecipitation montrent aussi que le domaine SH3 de BIN1 renforce l'interaction de BIN1 avec la DNM2, ce qui est déjà connu et admis (Owen et al., 1998). Ces résultats questionnent l'importance de l'exon 7 pour l'interaction de BIN1 avec la DNM2. Cependant, des expériences de pull-down avec des protéines recombinantes purifiées montrent que le domaine BAR contenant l'exon 7, est capable d'interagir avec la DNM2, tout comme la protéine de pleine taille (BIN1) contenant l'exon 7 (Cf. Figure 6 du manuscrit). Or, le domaine BAR recombinant que nous avons cloné, correspond à la partie N-terminale de BIN1, il ne contient donc pas le domaine SH3 qui est en C-terminal. De ce fait, nos résultats de pull-down suggèrent qu'en conditions *in vitro*, l'exon 7 de BIN1 suffit pour permettre l'interaction de BIN1 avec la DNM2, et ceci même en l'absence du domaine SH3. Il est donc probable que l'exon 7 et le domaine SH3 contribuent simultanément à l'interaction de BIN1 avec la DNM2.

Cette interaction entre la DNM2 et BIN1 est attendue dans le système nerveux, où l'exon 7 est naturellement exprimé. Cependant, dans le muscle des patients DM1, l'inclusion anormale de l'exon 7 pourrait déclencher une interaction forcée entre BIN1 et la DNM2, conduisant ainsi à un « gain de fonction » dans cette maladie. En effet, la DNM2 possède une activité de fission des membranes, de ce fait, un recrutement anormal de la DNM2 au niveau des tubules-T pourrait potentiellement mener à une altération de celles-ci. Nous avons partiellement confirmé cette hypothèse à l'aide d'expériences d'immunofluorescence. En effet, dans le muscle, en temps normal, et dans le cas de l'injection contrôle de BIN1 -7+11, le marquage de BIN1 s'organise sous la forme d'une double bande transversale, qui est distinct du marquage correspondant à la DNM2, présent sous forme d'une simple bande transversale. En revanche, lors de l'expression de BIN1 contenant l'exon 7, une délocalisation de la DNM2 est visible au microscope confocal, car celle-ci adopte aussi une double bande transversale co-localisant avec BIN1. Cette proximité anormale des deux marquages pourrait donc être liée à l'interaction entre ces deux protéines provoquée par l'exon 7. Le rapprochement de la DNM2 vers la protéine BIN1, qui est localisée au niveau des tubules-T, pourrait ainsi permettre à la DNM2 d'altérer les tubules-T. Toutefois, le mécanisme pathologique responsable des altérations des tubules-T dans les muscles des souris injectées avec les AAV-BIN1 est probablement plus complexe qu'une simple

coupure de celles-ci, car dans ces muscles injectés nous observons des tubules-T déformées, allongées, ramifiées, et pas simplement plus courtes. Cela pourrait être causé par une resynthèse des tubules-T, après leur coupure par la DNM2, mis à part que cette nouvelle synthèse semble être mal régulée du fait de l'altération de la fonction de BIN1. A l'inverse, dans des myotubes en culture issus de patients DM1, l'immunomarquage de BIN1 montre des formes tubulaires beaucoup plus courtes que dans des cellules contrôles (**Figure 56**). Or, ces cellules ne sont pas organisées à un niveau tissulaire, et restent relativement immatures comparées à un muscle adulte. Cela peut donc expliquer la différence observée vis-à-vis des muscles injectés avec BIN1 exon 7 qui possèdent des tubules-T allongées et déformées.



L'hypothèse de la coupure de ces tubules-T par la DNM2 dans les cellules musculaires des patients DM est donc possible, toutefois le marquage de la DNM2 dans les myotubes en culture n'a pas fonctionné, nous ne pouvons donc pas confirmer cette hypothèse. De plus, il reste à expliquer la façon dont la DNM2 couperait ces tubules-T. En effet, le diamètre des tubules-T semble incompatible avec le diamètre maximal de l'hélice formée par la polymérisation des protéines DNM2, qui va entourer les membranes, afin d'induire leur coupure. Plutôt qu'un simple modèle de coupure des tubules-T par la DNM2, nous préférons donc proposer que la présence de l'exon

7 dans BIN1 renforce son interaction avec la DNM2 et conduit à une altération de la fonction de BIN1 dans la genèse et le maintien des tubules-T membranaires. Cette hypothèse, est renforcée par la découverte que des mutations dans la *DNM2* sont liées à la myopathie centronucléaire (Bitoun et al., 2005), une pathologie présentant des similarités avec la DM1, notamment concernant l'altération des tubules-T, la faiblesse et l'atrophie musculaire. Ces mutations conduiraient à un gain de fonction de l'activité de la DNM2 (Chin et al., 2015), ce qui concorde avec notre hypothèse d'un recrutement anormal de la DNM2 par l'exon 7 de BIN1.

Afin de tester une implication directe de la DNM2 dans la déformation des tubules-T, nous avons voulu mener une expérience de restauration des tubules au sein des myotubes en culture issus de patients DM1. En effet, comme introduit plus haut, dans les myotubes DM1, les structures tubulaires formées par BIN1, et révélées par l'immunomarquage de cette protéine, sont raccourcies et peu abondantes comparés à des myotubes contrôles (Cf. **Figure 56** en page précédente). Une possibilité serait que, dans les myotubes DM1, l'exon 7 est exprimé, ce qui va permettre l'interaction de BIN1 avec la DNM2, qui va alors cliver et déformer directement les tubules (peu probable, du fait de la diamètre des tubules), ou participer à altérer la fonction de BIN1 (hypothèse la plus probable). Notre approche consistait soit à abolir l'expression de la DNM2 à l'aide de siARN, soit à inhiber son activité de fission des membranes à l'aide de composés chimiques. Ainsi, la perte d'expression ou de fonction de la DNM2 aurait permis d'éviter l'effet délétère de cette protéine et aurait conduit à la restauration des structures tubulaires dans les myotubes DM1. Cette approche est directement inspirée de la publication montrant la correction de la morphologie des tubules-T, mais aussi l'amélioration de l'atrophie et de la faiblesse musculaire dans des souris modèles pour la myopathie centronucléaire (souris *Mtm1^{-/-}*) grâce à l'invalidation du gène de la *Dnm2* (Cowling et al., 2014). Cependant, nous ne sommes pas parvenus à induire une différenciation convenable des myotubes transfectés avec les siARN ou traités avec les inhibiteurs de la DNM2. Nous n'avons donc pas réussi à observer un changement du taux de tubulation entre les myotubes DM1 traités ou non. Cela laisse donc une incertitude quant-au rôle de la DNM2 dans l'altération des tubules-T.

Une autre interrogation est la manière dont la forme de BIN1 +7-11 injectée peut-elle avoir un effet sur les tubules-T. En effet, les isoformes de BIN1 ne contenant

pas l'exon 11, qui encode un domaine de liaison aux phosphoinositides, sont peu recrutées au niveau de la membrane des tubules-T (Lee et al., 2000 ; Fugier et al., 2011). Néanmoins, il est à noter que nos injections sont réalisées dans des souris contrôles, qui expriment donc la protéine Bin1 endogène. Par conséquent, puisque BIN1 s'organise en dimère (Peter et al., 2004; Casal et al., 2006), on peut imaginer que l'isoforme BIN1 +7-11 injectée pourrait dimériser avec la protéine Bin1 endogène au muscle de souris, et donc être recrutée à la membrane des tubules-T. Cette hypothèse est soutenue par nos expériences d'immunofluorescence qui montrent que l'isoforme BIN1 +7-11 injectée se localise normalement dans le muscle des souris (Cf. Figure 6 du manuscrit). Il semble donc que les protéines BIN1 +7-11 injectées puissent se lier aux membranes, même en l'absence de l'exon 11, et ceci probablement du fait d'une dimérisation avec la protéine Bin1 endogène. De plus, nous avons observé en microscopie électronique, un effet délétère accru de la construction BIN1 +7+11, sur les tubules-T. En effet, cette construction contient d'un côté, l'exon 11, qui va permettre à la protéine d'être localisée au niveau des tubules-T, et de l'autre, elle possède l'exon 7, qui va permettre l'interaction avec la DNM2. Ainsi la toxicité accrue de cette isoforme, sur les tubules-T, s'expliquerait par le fait qu'elle peut être directement recrutée vers celles-ci, à la place d'être dépendante de la dimérisation avec les protéines Bin1 endogènes.

I.C. Propriétés physiques de BIN1 en présence de l'exon 7

Nous avons aussi réalisé des études sur le comportement biophysique de la protéine BIN1, et notamment de son domaine BAR. Avec l'aide du Dr. Catherine Birck, de la plateforme de biologie structurale de l'IGBMC, nous avons mené une analyse par gel-filtration suivie par une ultracentrifugation analytique des protéines recombinantes du domaine BAR, avec ou sans exon 7. Nous avons mis en évidence que le domaine BAR sans exon 7 formait principalement des dimères, ce qui était attendu (Peter et al., 2004; Casal et al., 2006). A l'inverse, le domaine BAR contenant l'exon 7 était capable de former des tétramères ainsi que des oligomères supérieurs (Cf. Figure supplémentaire n°6 du manuscrit). Cet état oligomérique serait potentiellement inadapté à une protéine qui fonctionne en tant que dimère. Cette différence de comportement structural pourrait donc contribuer aux défauts des tubules-T, dans le muscle des souris injectées avec l'AAV-BIN1 contenant l'exon 7 et le muscle des patients DM1.

Enfin, des interactions intramoléculaires entre les différents domaines de BIN1 ont été décrites auparavant comme un mécanisme d'auto-inhibition, afin d'empêcher l'interaction de BIN1 avec ses partenaires, lorsque celui-ci n'est pas localisé à la membrane (Kojima et al., 2004; T. Wu & Baumgart, 2014). De ce fait, nous avons testé si la présence de l'exon 7 conduisait à l'altération des interactions intramoléculaires de BIN1. Des expériences de pull-down avec les domaines SH3 et BAR (contenant ou non l'exon 7) de BIN1 recombinants et purifiés, montrent ainsi que l'exon 7 inhibe la liaison du domaine SH3 au domaine BAR (Cf. Figure supplémentaire n°6 du manuscrit). Par conséquent, en présence de l'exon 7, le mécanisme d'auto-inhibition de BIN1 n'existerait pas et cette protéine serait alors capable d'interagir avec ses partenaires de façon incontrôlée. Nous ne pouvons donc pas exclure qu'un défaut d'auto-inhibition de la protéine BIN1, lorsqu'elle contient l'exon 7, soit à l'origine des défauts de tubules-T.

En conclusion, nos données cellulaires et moléculaires indiquent que l'inclusion de l'exon 7 de *BIN1* conduit à plusieurs altérations de BIN1, dont l'altération de ses propriétés de dimérisation, d'interaction intramoléculaire entre ses domaines BAR et SH3 et enfin intermoléculaire avec une augmentation de la capacité de BIN1 à interagir avec la protéine DNM2. Toutefois, nos données n'ont pas permis de définir précisément parmi ces altérations moléculaires laquelle ou lesquelles conduisaient aux altérations cellulaires, et notamment à la déformation des tubules-T. Il est aussi tout à fait possible, voire probable, que ces altérations cellulaires soient la résultante de plusieurs altérations moléculaires de BIN1, dont certaines sont encore inconnues.

I.D. Contribution de l'exon 7 par rapport à la perte de l'exon 11

Outre l'inclusion anormale de son exon 7, l'ARN messager de BIN1 présente aussi une diminution de l'inclusion de l'exon 11 dans les muscles des patients DM (Fugier et al., 2011 ; Nakamori et al., 2013). Ces deux altérations d'épissage corrélient avec la faiblesse musculaire chez les patients DM (Nakamori et al., 2013). De plus, la perte de l'exon 11, codant pour un domaine de liaison aux phosphoinositides, conduit à une délocalisation partielle de BIN1 des tubules-T (Fugier et al., 2011), ce qui pourrait expliquer l'altération de ces structures membranaires chez ces patients. Il est donc important de tenter de comprendre le rôle et l'importance respective des exons 7 et 11

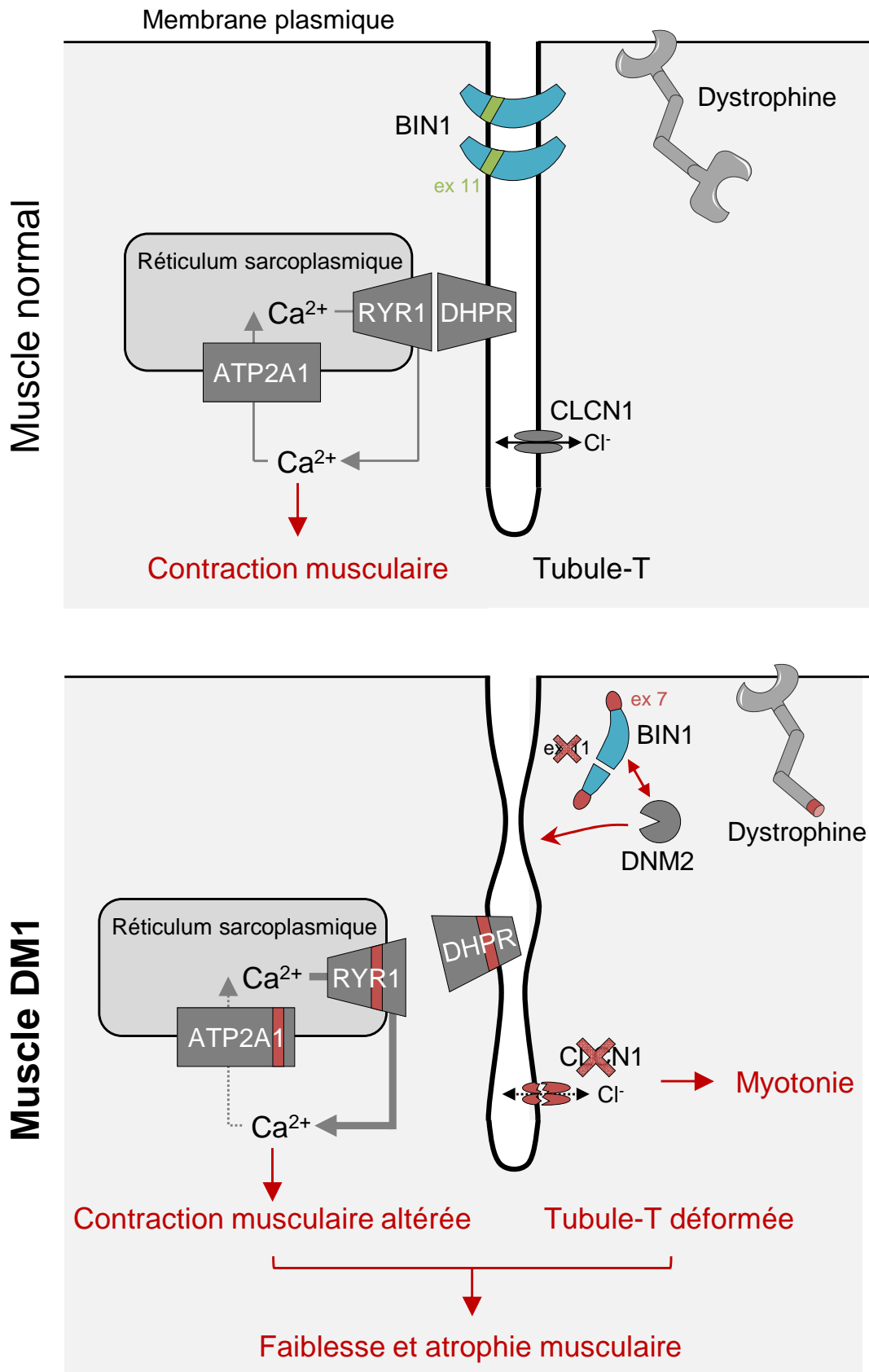


Figure 57 : Altérations d'épissages qui contribuent aux problèmes musculaires dans la DM1.

dans la DM. Toutefois, il est à noter que la perte de l'exon 11 de *Bin1* chez la souris ne conduit qu'à une faiblesse musculaire modérée, sans atrophie musculaire ou noyaux centraux notables (Fugier et al., 2011). De même, chez l'homme si une perte complète de l'exon 11 de *BIN1* conduit à une myopathie centronucléaire, une diminution de 50%, qui est plus proche des niveaux observés chez les patients DM, ne semble pas avoir d'effet délétère notable (Böhm et al., 2013). Au contraire, chez le zebrafish ou la souris, l'expression d'isoforme de BIN1 contenant l'exon 7 est suffisante pour induire une atrophie et une faiblesse musculaire, peut-être par un mécanisme de type gain de fonction, faisant appel au recrutement de la protéine DNM2. Nous proposons donc que l'inclusion anormale de l'exon 7 de *BIN1* dans la DM est une altération moléculaire importante pour comprendre l'atrophie et la faiblesse musculaire dans cette maladie. De plus, les épissages des exons 7 et 11 étant simultanément altérés dans le muscle des patients DM1, il est plus que probable qu'il existe une combinaison de plusieurs mécanismes pathologiques faisant appel à la fois à la perte de liaison aux phosphoinositides, due à la diminution d'inclusion de l'exon 11, et à un gain de fonction délétère dû au recrutement de la DNM2 causé par l'inclusion anormale de l'exon 7. Cette combinaison de perte et de gain de fonction de BIN1 contribuant *in fine* à l'altération des tubules-T. On notera aussi que l'épissage alternatif des canaux calciques CACNA1S (DHPR) situés sur les tubules-T et RYR1 localisé au niveau du réticulum sarcoplasmique, ainsi que celui de la pompe ATPase ATP2A1 (SERCA) sont altérés chez les patients DM, conduisant ainsi à une altération globale des protéines impliquées dans le couplage excitation-contraction du muscle squelettique. Ces altérations prises de façon isolées conduisent à de faibles altérations pathologiques du muscle dans des modèles murins (Kimura et al., 2009 ; Fugier et al., 2011 ; Tang et al., 2012 ; Sultana et al., 2016). Néanmoins, il est probable que la somme de ces altérations (BIN1, DHPR, RYR1, SERCA), conduise à un couplage excitation-contraction déficient qui puisse contribuer, ou même causer, l'atrophie et la faiblesse musculaire observée dans les dystrophies myotoniques (voir modèle proposé en **Figure 57**).

De façon générale, mes résultats ont donc permis de clarifier l'importance de l'expression anormale de l'exon 7 de *BIN1* dans la faiblesse et l'atrophie musculaire des patients DM. Ainsi, cette découverte complète celle d'autres travaux faisant le lien entre épissage altéré dans la DM1 et symptômes musculaire.

Chapitre II. Discussion sur les autres résultats

II.A. Dégradation du transcrit *DMPK* par une enzyme ADN

L'utilisation d'un ribozyme-ARN (ARN qui porte une activité de coupure de l'ARN), avait déjà été démontrée comme efficace pour la dégradation de l'ARN *DMPK* toxique dans des myoblastes DM1 en culture (Langlois et al., 2003). Cette étude montre aussi une diminution des foci ARN formées par les répétitions CUG, ainsi qu'une légère amélioration de l'épissage du récepteur à l'insuline INSR suite à l'utilisation de ces ribozymes-ARN. Cependant, l'utilisation d'un ADN à activité ribozyme (ou « enzyme ADN » ; DNAzyme), n'avait pas encore été testée pour une approche thérapeutique dans la DM1. Nous avons donc mis au point 3 DNAzymes ciblant l'ARN *DMPK* et avons montré leur efficacité pour dégrader cet ARN dans des myoblastes de patients DM1. Toutefois, la reproduction de ces expériences avec des DNAzymes mutées et inactives pour leur activité ribozyme, menait à la même efficacité de dégradation du transcrit *DMPK*. Ces résultats indiquent donc que l'activité ribozyme de ces molécules n'est pas impliquée dans la dégradation de l'ARN *DMPK*, mais utilise probablement la RNase H, qui reconnaît le duplex DNAzyme/ARN, pour digérer l'ARN. La reconnaissance de ce duplex ADN/ARN par la RNase H est possible car seuls les nucléotides terminaux de nos DNAzymes portent des modifications 2'-O-Methyl, leur partie centrale reste donc accessible à la RNase H. Pour contourner ce problème, et empêcher l'action de la RNase H, il faudrait donc modifier chimiquement chaque nucléotide de nos DNAzymes, pour ensuite tester à nouveau la dégradation de l'ARN *DMPK* en modèle cellulaire puis murin. Toutefois, la modification chimique de l'ensemble de la séquence des DNAzymes est une méthode qui risque de diminuer l'efficacité de l'activité ribozyme de ces oligonucléotides. En conclusion, une approche DNAzyme pourrait s'avérer plus risquée que les approches gapmères déjà développées chez la souris et le primate non humain (J. E. Lee et al., 2012; Wheeler et al., 2012; Pandey et al., 2015).

II.B. Modèles murins des Dystrophies Myotoniques

II.B.1) Conclusion

Nos souris transgéniques DM1 et DM2 présentent des foci nucléaires de répétitions d'ARN CUG ou CCUG. De plus, la séquestration de la protéine Mbnl1, au sein de ces foci, a été confirmée par immunofluorescence couplée à un FISH-ARN. Malgré ces résultats indiquant un début de processus pathologique similaire aux dystrophies myotoniques, ces souris transgéniques ne développent pas de phénotype évident, comparées aux souris contrôles. En effet, nous n'observons pas d'altération musculaire, de retard de croissance significatif, de différence de mortalité ou de longévité, de cataracte et pas d'altération d'épissage au stade néonatal ou à l'âge adulte. Bien que Mbnl1 soit présent dans les foci nucléaires, il est probable que sa séquestration soit insuffisante pour diminuer significativement sa fraction libre. Cette absence d'altération moléculaire ou physiologique pourrait être due à un nombre insuffisant de répétitions CTG ou CCTG, une trop faible expression ou une instabilité ARN de notre transgène.

II.B.2) Perspectives pour le modèle murin de la DM1

Il est à noter que chez les souris HSA^{LR}, qui portent un transgène exprimant 250 répétitions CUG, il existe plusieurs sites d'insertion du transgène, ce qui a pour effet de démultiplier son expression (Mankodi et al., 2000). De plus, le fond génétique des souris HSA^{LR} est du type FVB/n, à la différence de nos souris de fond Black6 (C57BL/6). Il serait éventuellement possible que le fond FVB soit plus sensible à l'expression de répétitions CUG que le fond C57BL/6. Nous avons donc comparé le taux d'expression des transcrits *Mbnl1* et *2* dans des souris sauvages issues de ces deux types de fond génétiques. Toutefois, comme le montrent les graphiques en **Figure 58**, ci-après, il n'y a apparemment pas de différence d'expression de *Mbnl1* dans le muscle TA ou de différence d'expression de *Mbnl1* et *Mbnl2* dans le cœur, entre ces deux types de souris.

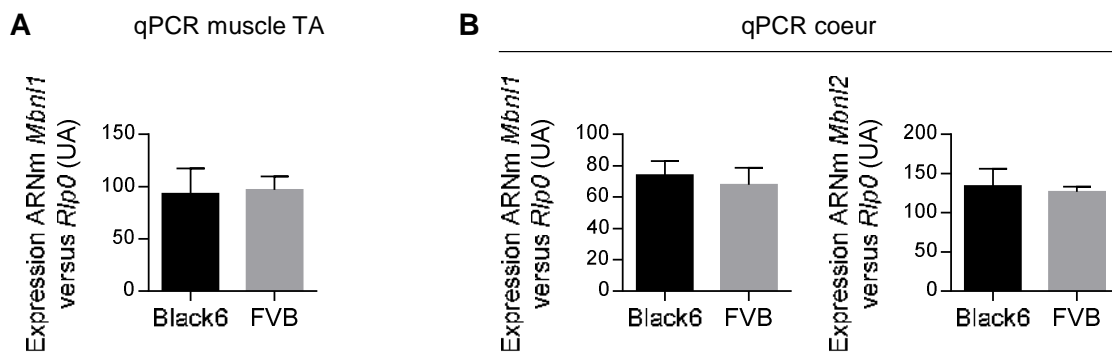


Figure 58 : Analyse de l'expression de *Mbn1* selon le fond génétique.

(A) Résultat de RT-PCR quantitative (qPCR) pour l'ARNm *Mbn1* par rapport à l'ARNm *Rlp0* dans le muscle TA de souris issues du fond génétique Black6 (noir) et FVB (gris clair). (B) qPCR pour étudier l'expression de *Mbn1* et *Mbn2* dans le cœur de ces mêmes souris. Résultats exprimés en unités arbitraires, en tant que moyenne, sur 3 souris différentes pour chaque fond génétique.

Le taux d'expression de *Mbn1* et *Mbn2* ne justifie donc pas une différence de sensibilité aux répétitions CUG entre les fonds FVB et Black6. Néanmoins, nous avons décidé de changer le fond génétique des souris transgéniques DM1 Black6 en fond FVB/n. Après 5 croisements successifs, nous avons obtenu des souris avec un fond génétique essentiellement FVB (c'est-à-dire 3,1% Black6 et 96,9% FVB). Toutefois, compte tenu du temps nécessaire pour ces croisements, nous obtenons seulement maintenant les premières souris transgéniques homozygotes dans le fond génétique FVB. Nous testerons dès que possible l'altération de l'épissage de ces souris. Enfin, nous souhaitons comparer l'expression de notre transgène avec celui des souris HSA^{LR}, mais compte tenu des différences entre les constructions utilisées, une approche par qPCR n'est pas envisageable. Nous devons donc utiliser une technique de northern blotting avec une hybridation de la sonde directement sur les répétitions CUG (seule partie commune à nos souris et aux souris HSA^{LR}), ce qui pose de sérieuses difficultés techniques dues à la structure secondaire adoptée par ces répétitions et à l'important bruit de fond caractéristique de l'analyse des répétitions nucléotidiques.

Références

Bibliographiques

- Adereth, Y., Dammai, V., Kose, N., Li, R., & Hsu, T. (2005). RNA-dependent integrin alpha3 protein localization regulated by the Muscleblind-like protein MLP1. *Nature Cell Biology*, 7(12), 1240–7.
- Artero, R., Prokop, a, Paricio, N., Begemann, G., Pueyo, I., Mlodzik, M., Perez-Alonso, M., & Baylies, M. K. (1998). The muscleblind gene participates in the organization of Z-bands and epidermal attachments of *Drosophila* muscles and is regulated by Dmef2. *Developmental Biology*, 195(2), 131–143.
- Baldanzi, S., Cecchi, P., Fabbri, S., Pesaresi, I., Simoncini, C., Angelini, C., Bonuccelli, U., Cosottini, M., & Siciliano, G. (2016). Relationship between neuropsychological impairment and grey and white matter changes in adult-onset myotonic dystrophy type 1. *NeuroImage. Clinical*, 12, 190–7.
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2), 215–33.
- Batra, R., Charizanis, K., Manchanda, M., Mohan, A., Li, M., Finn, D. J., Goodwin, M., Zhang, C., Sobczak, K., Thornton, C. A., & Swanson, M. S. (2014). Loss of MBNL leads to disruption of developmentally regulated alternative polyadenylation in RNA-mediated disease. *Molecular Cell*, 56(2), 311–322.
- Batten, F. E., & Gibb, H. P. (1909). MYOTONIA ATROPHICA. *Brain*, 32(2), 187–205.
- Begemann, G., Paricio, N., Artero, R., Kiss, I., Pérez-Alonso, M., & Mlodzik, M. (1997). muscleblind, a gene required for photoreceptor differentiation in *Drosophila*, encodes novel nuclear Cys3His-type zinc-finger-containing proteins. *Development (Cambridge, England)*, 124(21), 4321–31.
- Bennett, C. F., & Swayze, E. E. (2010). RNA Targeting Therapeutics: Molecular Mechanisms of Antisense Oligonucleotides as a Therapeutic Platform. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 50(1), 259–293.
- Bitoun, M., Maugenre, S., Jeannet, P.-Y., Lacène, E., Ferrer, X., Laforêt, P., Martin, J.-J., Laporte, J., Lochmüller, H., Beggs, A. H., Fardeau, M., Eymard, B., Romero, N. B., & Guicheney, P. (2005). Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nature Genetics*, 37(11), 1207–9.
- Böhm, J., Biancalana, V., Malfatti, E., Dondaine, N., Koch, C., Vasli, N., Kress, W., Strittmatter, M., Taratuto, A. L., Gonorazky, H., Laforêt, P., Maisonobe, T., Olivé, M., ... Laporte, J. (2014). Adult-onset autosomal dominant centronuclear myopathy due to BIN1 mutations. *Brain: A Journal of Neurology*, 137(Pt 12), 3160–70.
- Böhm, J., Vasli, N., Maurer, M., Cowling, B., Shelton, G. D., Kress, W., Toussaint, A., Prokic, I., Schara, U., Anderson, T. J., Weis, J., Tiret, L., & Laporte, J. (2013). Altered splicing of the BIN1 muscle-specific exon in humans and dogs with highly progressive centronuclear myopathy. *PLoS Genetics*, 9(6), e1003430.
- Bondy-Chorney, E., Crawford Parks, T. E., Ravel-Chapuis, A., Klinck, R., Rocheleau, L., Pelchat, M., Chabot, B., Jasmin, B. J., & Côté, J. (2016). Staufen1 Regulates Multiple Alternative Splicing Events either Positively or Negatively in DM1 Indicating Its Role as a Disease Modifier. *PLoS Genetics*, 12(1), 1–22.

- 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. (1992). Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell*, 68(4), 799–808.
- Butler, M. H., David, C., Ochoa, G. C., Freyberg, Z., Daniell, L., Grabs, D., Cremona, O., & De Camilli, P. (1997). Amphiphysin II (SH3P9; BIN1), a member of the amphiphysin/Rvs family, is concentrated in the cortical cytomatrix of axon initial segments and nodes of ranvier in brain and around T tubules in skeletal muscle. *The Journal of Cell Biology*, 137(6), 1355–67.
- Cardani, R., Mancinelli, E., Rotondo, G., Sansone, V., & Meola, G. (2006). Muscleblind-like protein 1 nuclear sequestration is a molecular pathology marker of DM1 and DM2. *European Journal of Histochemistry : EJH*, 50(3), 177–82.
- Carpentier, C., Ghanem, D., Fernandez-Gomez, F. J., Jumeau, F., Philippe, J. V., Freyermuth, F., Labudeck, A., Eddarkaoui, S., Dhaenens, C. M., Holt, I., Behm-Ansmant, I., Marmier-Gourrier, N., Branlant, C., ... Caillet-Boudin, M. L. (2014). Tau exon 2 responsive elements deregulated in myotonic dystrophy type I are proximal to exon 2 and synergistically regulated by MBNL1 and MBNL2. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1842(4), 654–64.
- Carrell, S. T., Carrell, E. M., Auerbach, D., Pandey, S. K., Bennett, C. F., Dirksen, R. T., & Thornton, C. A. (2016). Dmpk Gene Deletion or Antisense Knockdown Does Not Compromise Cardiac or Skeletal Muscle Function in Mice. *Human Molecular Genetics*, 0(0), ddw266.
- Casal, E., Federici, L., Zhang, W., Fernandez-Recio, J., Priego, E., Miguel, R. N., DuHadaway, J. B., Prendergast, G. C., Luisi, B. F., & Laue, E. D. (2006). The Crystal Structure of the BAR Domain from Human Bin1/Amphiphysin II and Its Implications for Molecular Recognition †. *Biochemistry*, 45(43), 12917–12928.
- Chang, M. Y., Boulden, J., Sutanto-Ward, E., Duhadaway, J. B., Soler, A. P., Muller, A. J., & Prendergast, G. C. (2007). Bin1 ablation in mammary gland delays tissue remodeling and drives cancer progression. *Cancer Research*, 67(1), 100–7.
- Chapuis, J., Hansmannel, F., Gistelink, M., Mounier, a, Van Cauwenberghe, C., Kolen, K. V, Geller, F., Sottejeau, Y., Harold, D., Dourlen, P., Grenier-Boley, B., Kamatani, Y., Delepine, B., ... Lambert, J.-C. (2013). Increased expression of BIN1 mediates Alzheimer genetic risk by modulating tau pathology. *Molecular Psychiatry*, 18(11), 1225–34.
- Charizanis, K., Lee, K., Batra, R., & Goodwin, M. (2012). Muscleblind-like 2-mediated alternative splicing in the developing brain and dysregulation in myotonic dystrophy. *Neuron*, 75(3), 437–450.
- Charlet-B, N., Savkur, R. S., Singh, G., Philips, A. V, Grice, E. a, & Cooper, T. a. (2002). Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Molecular Cell*, 10(1), 45–53.
- Childs-Disney, J. L., Hoskins, J., Rzuczek, S. G., Thornton, C. A., & Disney, M. D. (2012). Rationally designed small molecules targeting the RNA that causes myotonic dystrophy type 1 are potently

bioactive. *ACS Chemical Biology*, 7(5), 856–62.

Childs-Disney, J. L., Stepniak-Konieczna, E., Tran, T., Yildirim, I., Park, H., Chen, C. Z., Hoskins, J., Southall, N., Marugan, J. J., Patnaik, S., Zheng, W., Austin, C. P., Schatz, G. C., ... Disney, M. D. (2013). Induction and reversal of myotonic dystrophy type 1 pre-mRNA splicing defects by small molecules. *Nature Communications*, 4, 2044.

Chin, Y.-H., Lee, A., Kan, H.-W., Laiman, J., Chuang, M.-C., Hsieh, S.-T., & Liu, Y.-W. (2015). Dynamin-2 mutations associated with centronuclear myopathy are hypermorphic and lead to T-tubule fragmentation. *Human Molecular Genetics*, 24(19), ddv285.

Clarke, N. R., Kelion, A. D., Nixon, J., Hilton-Jones, D., & Forfar, J. C. (2001). Does cytosine-thymine-guanine (CTG) expansion size predict cardiac events and electrocardiographic progression in myotonic dystrophy? *Heart (British Cardiac Society)*, 86(4), 411–6.

Coonrod, L. A., Nakamori, M., Wang, W., Carrell, S., Hilton, C. L., Bodner, M. J., Siboni, R. B., Docter, A. G., Haley, M. M., Thornton, C. A., & Berglund, J. A. (2013). Reducing levels of toxic RNA with small molecules. *ACS Chemical Biology*, 8(11), 2528–37.

Cowling, B. S., Chevremont, T., Prokic, I., Kretz, C., Ferry, A., Coirault, C., Koutsopoulos, O., Laugel, V., Romero, N. B., & Laporte, J. (2014). Reducing dynamin 2 expression rescues X-linked centronuclear myopathy. *Journal of Clinical Investigation*, 124(3), 1350–1363.

Curschmann, H. (1936). Myotonische Dystrophie (atrophische Myotonie). In Springer (Ed.), *O. Bumke, O. Förster (Eds.) Handbuch der Neurologie* (8th ed., pp. 465–485). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

D'Alessandro, M., Hnia, K., Gache, V., Koch, C., Gavriilidis, C., Rodriguez, D., Nicot, A.-S., Romero, N. B., Schwab, Y., Gomes, E., Labouesse, M., & Laporte, J. (2015). Amphiphysin 2 Orchestrates Nucleus Positioning and Shape by Linking the Nuclear Envelope to the Actin and Microtubule Cytoskeleton. *Developmental Cell*, 35(2), 186–98.

Dansithong, W., Paul, S., Comai, L., & Reddy, S. (2005). MBNL1 is the primary determinant of focus formation and aberrant insulin receptor splicing in DM1. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(7), 5773–80.

Daum, B., Auerswald, A., Gruber, T., Hause, G., Balbach, J., Kühlbrandt, W., & Meister, A. (2016). Supramolecular organization of the human N-BAR domain in shaping the sarcolemma membrane. *Journal of Structural Biology*, 194(3), 375–82.

David, C., McPherson, P. S., Mundigl, O., & de Camilli, P. (1996). A role of amphiphysin in synaptic vesicle endocytosis suggested by its binding to dynamin in nerve terminals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(1), 331–5.

Day, J. W., Ricker, K., Jacobsen, J. F., Rasmussen, L. J., Dick, K. A., Kress, W., Schneider, C., Koch, M. C., Beilman, G. J., Harrison, A. R., Dalton, J. C., & Ranum, L. P. W. (2003). Myotonic dystrophy type 2: molecular, diagnostic and clinical spectrum. *Neurology*, 60(4), 657–64.

- De Jager, P. L., Srivastava, G., Lunnon, K., Burgess, J., Schalkwyk, L. C., Yu, L., Eaton, M. L., Keenan, B. T., Ernst, J., McCabe, C., Tang, A., Raj, T., Replogle, J., ... Bennett, D. A. (2014). Alzheimer's disease: early alterations in brain DNA methylation at ANK1, BIN1, RHBDF2 and other loci. *Nature Neuroscience*, 17(9), 1156–63.
- Demonbreun, A. R., & McNally, E. M. (2014). Dynamin 2 the rescue for centronuclear myopathy. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(3), 976–8.
- Derghal, A., Djelloul, M., Trouslard, J., & Mounien, L. (2016). An Emerging Role of micro-RNA in the Effect of the Endocrine Disruptors. *Frontiers in Neuroscience*, 10(June), 318.
- Dhaenens, C. M., Tran, H., Frandemiche, M.-L., Carpentier, C., Schraen-Maschke, S., Sistiaga, A., Goicoechea, M., Eddarkaoui, S., Van Brussels, E., Obriot, H., Labudeck, A., Gevaert, M. H., Fernandez-Gomez, F., ... Sergeant, N. (2011). Mis-splicing of Tau exon 10 in myotonic dystrophy type 1 is reproduced by overexpression of CELF2 but not by MBNL1 silencing. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1812(7), 732–42.
- Di Paolo, G., Sankaranarayanan, S., Wenk, M. R., Daniell, L., Perucco, E., Caldarone, B. J., Flavell, R., Picciotto, M. R., Ryan, T. A., Cremona, O., & De Camilli, P. (2002). Decreased synaptic vesicle recycling efficiency and cognitive deficits in amphiphysin 1 knockout mice. *Neuron*, 33(5), 789–804.
- Dixon, D. M., Choi, J., El-Ghazali, A., Park, S. Y., Roos, K. P., Jordan, M. C., Fishbein, M. C., Comai, L., & Reddy, S. (2015). Loss of muscleblind-like 1 results in cardiac pathology and persistence of embryonic splice isoforms. *Scientific Reports*, 5, 9042.
- Du, H., Cline, M. S., Osborne, R. J., Tuttle, D. L., Clark, T. a, Donohue, J. P., Hall, M. P., Shiue, L., Swanson, M. S., Thornton, C. A., & Ares, M. (2010). Aberrant alternative splicing and extracellular matrix gene expression in mouse models of myotonic dystrophy. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(2), 187–193.
- Du, L., & Gatti, R. A. (2009). Progress toward therapy with antisense-mediated splicing modulation. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 11(2), 116–23.
- Ellis, J. D., Barrios-Rodiles, M., Colak, R., Irimia, M., Kim, T., Calarco, J. a, Wang, X., Pan, Q., O'Hanlon, D., Kim, P. M., Wrana, J. L., & Blencowe, B. J. (2012). Tissue-specific alternative splicing remodels protein-protein interaction networks. *Molecular Cell*, 46(6), 884–92.
- Falcone, S., Roman, W., Hnia, K., Gache, V., Didier, N., Lainé, J., Auradé, F., Marty, I., Nishino, I., Charlet-Berguerand, N., Romero, N. B., Marazzi, G., Sassoon, D., ... Gomes, E. R. (2014). N-WASP is required for Amphiphysin-2/BIN1-dependent nuclear positioning and triad organization in skeletal muscle and is involved in the pathophysiology of centronuclear myopathy. *EMBO Molecular Medicine*, 6(11), 1455–75.
- Fardaei, M., Larkin, K., Brook, J. D., & Hamshere, M. G. (2001). In vivo co-localisation of MBNL protein with DMPK expanded-repeat transcripts. *Nucleic Acids Research*, 29(13), 2766–71.
- Feng, H.-Z., & Jin, J.-P. (2010). Coexistence of cardiac troponin T variants reduces heart efficiency. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 299(1), H97–H105.

- Fernandez-Costa, J. M., Garcia-Lopez, A., Zuñiga, S., Fernandez-Pedrosa, V., Felipo-Benavent, A., Mata, M., Jaka, O., Aiastui, A., Hernandez-Torres, F., Aguado, B., Perez-Alonso, M., Vilchez, J. J., Lopez de Munain, A., & Artero, R. D. (2013). Expanded CTG repeats trigger miRNA alterations in *Drosophila* that are conserved in myotonic dystrophy type 1 patients. *Human Molecular Genetics*, *22*(4), 704–16.
- Fernandez-Costa, J. M., Llamusi, B., Bargiela, A., Zulaica, M., Alvarez-Abril, M. C., Perez-Alonso, M., Lopez de Munain, A., Lopez-Castel, A., & Artero, R. (2016). Six Serum miRNAs Fail to Validate as Myotonic Dystrophy Type 1 Biomarkers. *PloS One*, *11*(2), e0150501.
- Fish, L., Pencheva, N., Goodarzi, H., Tran, H., Yoshida, M., & Tavazoie, S. F. (2016). Muscleblind-like 1 suppresses breast cancer metastatic colonization and stabilizes metastasis suppressor transcripts. *Genes and Development*, *30*(4), 386–398.
- Floyd, S., Butler, M. H., Cremona, O., David, C., Freyberg, Z., Zhang, X., Solimena, M., Tokunaga, A., Ishizu, H., Tsutsui, K., & De Camilli, P. (1998). Expression of amphiphysin I, an autoantigen of paraneoplastic neurological syndromes, in breast cancer. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, *4*(1), 29–39.
- François, V., Klein, A. F., Beley, C., Jollet, A., Lemercier, C., Garcia, L., & Furling, D. (2011). Selective silencing of mutated mRNAs in DM1 by using modified hU7-snrRNAs. *Nature Structural & Molecular Biology*, *18*(1), 85–7.
- Franke, C., Iaizzo, P. A., Hatt, H., Spittelmeister, W., Ricker, K., & Lehmann-Horn, F. (1991). Altered Na⁺ channel activity and reduced Cl⁻ conductance cause hyperexcitability in recessive generalized myotonia (Becker). *Muscle & Nerve*, *14*(8), 762–70.
- Freyermuth, F., Rau, F., Kokunai, Y., Linke, T., Sellier, C., Nakamori, M., Kino, Y., Arandel, L., Jollet, A., Thibault, C., Philipps, M., Vicaire, S., Jost, B., ... Charlet-Berguerand, N. (2016). Splicing misregulation of SCN5A contributes to cardiac-conduction delay and heart arrhythmia in myotonic dystrophy. *Nature Communications*, *7*, 11067.
- Fu, Y., Pizzuti, A., Fenwick, R., King, J., Rajnarayan, S., Dunne, P., Dubel, J., Nasser, G., Ashizawa, T., de Jong, P., & Et, A. (1992). An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science*, *255*(5049), 1256–1258.
- Fugier, C., Klein, A. F., Hammer, C., Vassilopoulos, S., Ivarsson, Y., Toussaint, A., Tosch, V., Vignaud, A., Ferry, A., Messaddeq, N., Kokunai, Y., Tsuburaya, R., de la Grange, P., ... Charlet-Berguerand, N. (2011). Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy. *Nature Medicine*, *17*(6), 720–5.
- Furling, D., Coiffier, L., Mouly, V., Barbet, J. P., St Guily, J. L., Taneja, K., Gourdon, G., Junien, C., & Butler-Browne, G. S. (2001). Defective satellite cells in congenital myotonic dystrophy. *Human Molecular Genetics*, *10*(19), 2079–87.
- Gao, Z., & Cooper, T. A. (2013a). Antisense oligonucleotides: rising stars in eliminating RNA toxicity in myotonic dystrophy. *Hum Gene Ther*, *24*(5), 499–507.

- Gao, Z., & Cooper, T. A. (2013b). Reexpression of pyruvate kinase M2 in type 1 myofibers correlates with altered glucose metabolism in myotonic dystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(33), 13570–5.
- Goers, E., Purcell, J., & Voelker, R. (2010). MBNL1 binds GC motifs embedded in pyrimidines to regulate alternative splicing. *Nucleic Acids ...*, 38(7), 2467–2484.
- Gomes, A. V., Venkatraman, G., Davis, J. P., Tikunova, S. B., Engel, P., Solaro, R. J., & Potter, J. D. (2004). Cardiac troponin T isoforms affect the Ca²⁺ sensitivity of force development in the presence of slow skeletal troponin I: insights into the role of troponin T isoforms in the fetal heart. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(48), 49579–87.
- Gomes-Pereira, M., Cooper, T. A., & Gourdon, G. (2011). Myotonic dystrophy mouse models: towards rational therapy development. *Trends in Molecular Medicine*, 17(9), 506–17.
- Gomes-Pereira, M., Foiry, L., Nicole, A., Huguet, A., Junien, C., Munnich, A., & Gourdon, G. (2007). CTG trinucleotide repeat “big jumps”: Large expansions, small mice. *PLoS Genetics*, 3(4), 0488–0491.
- Goodwin, M., Mohan, A., Batra, R., Lee, K. Y., Charizanis, K., Fernández Gómez, F. J., Eddarkaoui, S., Sergeant, N., Buée, L., Kimura, T., Clark, H. B., Dalton, J., Takamura, K., ... Swanson, M. S. (2015). MBNL Sequestration by Toxic RNAs and RNA Misprocessing in the Myotonic Dystrophy Brain. *Cell Reports*, 12(7), 1159–1168.
- Gourdon, G., Radvanyi, F., Lia, A.-S., Duros, C., Blanche, M., Abitbol, M., Junien, C., & Hofmann-Radvanyi, H. (1997). Moderate intergenerational and somatic instability of a 55-CTG repeat in transgenic mice. *Nature Genetics*, 15(2), 190–192.
- Greenfield, J. (1911). Notes on a family of “myotonia atrophica” and early cataract, with a report on an additional case of myotonia atrophica. *Rev Neurol Psych*, 9, 169–181.
- 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., Zipes, D. P., & Pascuzzi, R. M. (2008). Electrocardiographic abnormalities and sudden death in myotonic dystrophy type 1. *The New England Journal of Medicine*, 358(25), 2688–97.
- Harley, H. G., Brook, J. D., Rundle, S. a, Crow, S., Reardon, W., Buckler, a J., Harper, P. S., Housman, D. E., & Shaw, D. J. (1992). Expansion of an unstable DNA region and phenotypic variation in myotonic dystrophy. *Nature*, 355(6360), 545–546.
- Harper, P. S. (1973). Pre-symptomatic detection and genetic counselling in myotonic dystrophy. *Clinical Genetics*, 4(2), 134–40.
- Harper, P. S. (1975). Congenital myotonic dystrophy in Britain. II. Genetic basis. *Archives of Disease in Childhood*, 50(7), 514–21.
- Harper, P. S. (1989). *Myotonic dystrophy (second edition)*. Saunders, Philadelphia and London.
- Harper, P. S. (2001). *Myotonic Dystrophy: Majors Problems in Neurology. (3rd edn)*. (W. . Saunders, Ed.) (3rd ed.). Philadelphia.

- Hayward, L. J., Kim, J. S., Lee, M.-Y., Zhou, H., Kim, J. W., Misra, K., Salajegheh, M., Wu, F., Matsuda, C., Reid, V., Cros, D., Hoffman, E. P., Renaud, J.-M., ... Brown, R. H. (2008). Targeted mutation of mouse skeletal muscle sodium channel produces myotonia and potassium-sensitive weakness. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(4), 1437–49.
- Herrendorff, R., Faleschini, M. T., Stiefvater, A., Erne, B., Wiktorowicz, T., Kern, F., Hamburger, M., Potterat, O., Kinter, J., & Sinnreich, M. (2016). Identification of Plant-derived Alkaloids with Therapeutic Potential for Myotonic Dystrophy Type I. *Journal of Biological Chemistry*, jbc.M115.710616.
- Ho, T. H., Charlet-B, N., Poulos, M. G., Singh, G., Swanson, M. S., & Cooper, T. a. (2004). Muscleblind proteins regulate alternative splicing. *The EMBO Journal*, 23(15), 3103–12.
- Hohendahl, A., Roux, A., & Galli, V. (2016). Structural insights into the centronuclear myopathy-associated functions of BIN1 and dynamin 2. *Journal of Structural Biology*.
- Holt, I., Jacquemin, V., Fardaei, M., Sewry, C. A., Butler-Browne, G. S., Furling, D., Brook, J. D., & Morris, G. E. (2009). Muscleblind-Like Proteins. *The American Journal of Pathology*, 174(1), 216–227.
- Hoskins, J. W., Ofori, L. O., Chen, C. Z., Kumar, A., Sobczak, K., Nakamori, M., Southall, N., Patnaik, S., Marugan, J. J., Zheng, W., Austin, C. P., Disney, M. D., Miller, B. L., & Thornton, C. A. (2014). Lomofungin and dilomofungin: inhibitors of MBNL1-CUG RNA binding with distinct cellular effects. *Nucleic Acids Research*, 42(10), 6591–602.
- Huguet, A., Medja, F., Nicole, A., Vignaud, A., Guiraud-Dogan, C., Ferry, A., Decostre, V., Hogrel, J.-Y., Metzger, F., Hoeflich, A., Baraibar, M., Gomes-Pereira, M., Puymirat, J., ... Gourdon, G. (2012). Molecular, physiological, and motor performance defects in DMSXL mice carrying >1,000 CTG repeats from the human DM1 locus. *PLoS Genetics*, 8(11), e1003043.
- Isaka, Y. (2007). DNAzymes as potential therapeutic molecules. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 9(2), 132–6.
- Jahromi, A. H., Honda, M., Zimmerman, S. C., & Spies, M. (2013). Single-molecule study of the CUG repeat-MBNL1 interaction and its inhibition by small molecules. *Nucleic Acids Research*, 41(13), 6687–97.
- Jansen, G., Groenen, P. J., Bächner, D., Jap, P. H., Coerwinkel, M., Oerlemans, F., van den Broek, W., Gohlsch, B., Pette, D., Plomp, J. J., Molenaar, P. C., Nederhoff, M. G., van Echteld, C. J., ... Wieringa, B. (1996). Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice. *Nature Genetics*, 13(3), 316–24.
- Jones, K., Wei, C., Schoser, B., Meola, G., Timchenko, N., & Timchenko, L. (2015). Reduction of toxic RNAs in myotonic dystrophies type 1 and type 2 by the RNA helicase p68/DDX5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(26), 8041–5.
- Jungbluth, H., Wallgren-Pettersson, C., & Laporte, J. (2008). Centronuclear (myotubular) myopathy. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 3(1), 26.
- Kalsotra, A., Singh, R. K., Gurha, P., Ward, A. J., Creighton, C. J., & 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), 336–45.

Kalsotra, A., Xiao, X., Ward, A. J., Castle, J. C., Johnson, J. M., Burge, C. B., & Cooper, T. a. (2008). A postnatal switch of CELF and MBNL proteins reprograms alternative splicing in the developing heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(51), 20333–8.

Kanadia, R. N., Johnstone, K. a, Mankodi, A., Lungu, C., Thornton, C. A., Esson, D., Timmers, A. M., Hauswirth, W. W., & Swanson, M. S. (2003). A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5652), 1978–80.

Kanadia, R. N., Shin, J., Yuan, Y., Beattie, S. G., Wheeler, T. M., Thornton, C. A., & Swanson, M. S. (2006). Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscleblind overexpression in a mouse poly(CUG) model for myotonic dystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(31), 11748–53.

Kanadia, R. N., Urbinati, C. R., Crusselle, V. J., Luo, D., Lee, Y.-J., Harrison, J. K., Oh, S. P., & Swanson, M. S. (2003). Developmental expression of mouse muscleblind genes Mbnl1, Mbnl2 and Mbnl3. *Gene Expression Patterns*, 3(4), 459–462.

Kim, D. H., Langlois, M. A., Lee, K. B., Riggs, A. D., Puymirat, J., & 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), 3866–3874.

Kimura, T., Lueck, J. D., Harvey, P. J., Pace, S. M., Ikemoto, N., Casarotto, M. G., Dirksen, R. T., & Dulhunty, A. F. (2009). Alternative splicing of RyR1 alters the efficacy of skeletal EC coupling. *Cell Calcium*, 45(3), 264–74.

Kimura, T., Nakamori, M., Lueck, J. D., Pouliquin, P., Aoike, F., Fujimura, H., Dirksen, R. T., Takahashi, M. P., Dulhunty, A. F., & Sakoda, S. (2005). Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in myotonic dystrophy type 1. *Human Molecular Genetics*, 14(15), 2189–2200.

Kino, Y., Washizu, C., Kurosawa, M., Oma, Y., Hattori, N., Ishiura, S., & Nukina, N. (2015). Nuclear localization of MBNL1: splicing-mediated autoregulation and repression of repeat-derived aberrant proteins. *Human Molecular Genetics*, 24(3), 740–756.

Kino, Y., Washizu, C., Oma, Y., Onishi, H., Nezu, Y., Sasagawa, N., Nukina, N., & Ishiura, S. (2009). MBNL and CELF proteins regulate alternative splicing of the skeletal muscle chloride channel CLCN1. *Nucleic Acids Research*, 37(19), 6477–90.

Klein, A. F., Dastidar, S., Furling, D., & Chuah, M. K. (2015). Therapeutic Approaches for Dominant Muscle Diseases: Highlight on Myotonic Dystrophy. *Current Gene Therapy*, 15(4), 329–337.

Klinck, R., Fourrier, A., Thibault, P., Toutant, J., Durand, M., Lapointe, E., Caillet-Boudin, M.-L., Sergeant, N., Gourdon, G., Meola, G., Furling, D., Puymirat, J., & Chabot, B. (2014). RBF0X1 cooperates with MBNL1 to control splicing in muscle, including events altered in myotonic dystrophy type 1. *PloS One*, 9(9), e107324.

- Kojima, C., Hashimoto, A., Yabuta, I., Hirose, M., Hashimoto, S., Kanaho, Y., Sumimoto, H., Ikegami, T., & Sabe, H. (2004). Regulation of Bin1 SH3 domain binding by phosphoinositides. *The EMBO Journal*, *23*(22), 4413–22.
- Kole, R., Krainer, A. R., & Altman, S. (2012). RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *11*(2), 125–40.
- Konieczny, P., Stepniak-Konieczna, E., & Sobczak, K. (2014). MBNL proteins and their target RNAs, interaction and splicing regulation. *Nucleic Acids Research*, *42*(17), 10873–87.
- Koshelev, M., Sarma, S., Price, R. E., Wehrens, X. H. T., & Cooper, T. A. (2010). Heart-specific overexpression of CUGBP1 reproduces functional and molecular abnormalities of myotonic dystrophy type 1. *Human Molecular Genetics*, *19*(6), 1066–75.
- Koutsoulidou, A., Kyriakides, T. C., Papadimas, G. K., Christou, Y., Kararizou, E., Papanicolaou, E. Z., & Phylactou, L. A. (2015). Elevated Muscle-Specific miRNAs in Serum of Myotonic Dystrophy Patients Relate to Muscle Disease Progress. *PloS One*, *10*(4), e0125341.
- Kuyumcu-Martinez, N. M., Wang, G. S., & Cooper, T. A. (2007). Increased Steady-State Levels of CUGBP1 in Myotonic Dystrophy 1 Are Due to PKC-Mediated Hyperphosphorylation. *Molecular Cell*, *28*(1), 68–78.
- Ladd, A. N., Charlet, N., & Cooper, T. a. (2001). The CELF family of RNA binding proteins is implicated in cell-specific and developmentally regulated alternative splicing. *Molecular and Cellular Biology*, *21*(4), 1285–96.
- Lambert, J.-C., Zelenika, D., Hiltunen, M., Chouraki, V., Combarros, O., Bullido, M. J., Tognoni, G., Fiévet, N., Boland, A., Arosio, B., Coto, E., Del Zompo, M., Mateo, I., ... Amouyel, P. (2011). Evidence of the association of BIN1 and PICALM with the AD risk in contrasting European populations. *Neurobiology of Aging*, *32*(4), 756.e11–5.
- Langlois, M.-A., Boniface, C., Wang, G., Alluin, J., Salvaterra, P. M., Puymirat, J., Rossi, J. J., & Lee, N. S. (2005). Cytoplasmic and nuclear retained DMPK mRNAs are targets for RNA interference in myotonic dystrophy cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(17), 16949–54.
- Laporte, J., Bedez, F., Bolino, A., & Mandel, J.-L. (2003). Myotubularins, a large disease-associated family of cooperating catalytically active and inactive phosphoinositides phosphatases. *Human Molecular Genetics*, *12 Spec No*(2), R285–92.
- Lau, J. K., Sy, R. W., Corbett, A., & Kritharides, L. (2015). Myotonic dystrophy and the heart: A systematic review of evaluation and management. *International Journal of Cardiology*, *184*(1), 600–8.
- Laurent, F.-X., Sureau, A., Klein, A. F., Trouslard, F., Gasnier, E., Furling, D., & Marie, J. (2012). New function for the RNA helicase p68/DDX5 as a modifier of MBNL1 activity on expanded CUG repeats. *Nucleic Acids Research*, *40*(7), 3159–71.
- Lazarus, A., Varin, J., Babuty, D., Anselme, F., Coste, J., & 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), 1645–52.

Lee, E., Marcucci, M., Daniell, L., Pypaert, M., Weisz, O. A., Ochoa, G.-C., Farsad, K., Wenk, M. R., & De Camilli, P. (2002). Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5584), 1193–6.

Lee, J. E., Bennett, C. F., & Cooper, T. a. (2012). RNase H-mediated degradation of toxic RNA in myotonic dystrophy type 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(11), 4221–6.

Lee, K.-Y., Li, M., Manchanda, M., Batra, R., Charizanis, K., Mohan, A., Warren, S. a, Chamberlain, C. M., Finn, D., Hong, H., Ashraf, H., Kasahara, H., Ranum, L. P. W., & Swanson, M. S. (2013). Compound loss of muscleblind-like function in myotonic dystrophy. *EMBO Molecular Medicine*, 5(12), 1887–900.

Leger, A. J., Mosquea, L. M., Clayton, N. P., Wu, I.-H., Weeden, T., Nelson, C. a, Phillips, L., Roberts, E., Piepenhagen, P. a, Cheng, S. H., & Wentworth, B. M. (2013). Systemic Delivery of a Peptide-Linked Morpholino Oligonucleotide Neutralizes Mutant RNA Toxicity in a Mouse Model of Myotonic Dystrophy. *Nucleic Acid Therapeutics*, 00(0), 1–9.

Leprince, C., Romero, F., Cussac, D., Vayssiere, B., Berger, R., Tavitian, A., & Camonis, J. H. (1997). A new member of the amphiphysin family connecting endocytosis and signal transduction pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(24), 15101–5.

Leroy, O., Wang, J., Maurage, C. A., Parent, M., Cooper, T., Buée, L., Sergeant, N., Andreadis, A., & Caillet-Boudin, M. L. (2006). Brain-specific change in alternative splicing of Tau exon 6 in myotonic dystrophy type 1. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1762(4), 460–467.

Lin, X., Miller, J. W., Mankodi, A., Kanadia, R. N., Yuan, Y., Moxley, R. T., Swanson, M. S., & Thornton, C. A. (2006). Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy. *Human Molecular Genetics*, 15(13), 2087–97.

Liquori, C. L., Ricker, K., Moseley, M. L., Jacobsen, J. F., Kress, W., Naylor, S. L., Day, J. W., & Ranum, L. P. (2001). Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5531), 864–7.

Löw, C., Weininger, U., Lee, H., Schweimer, K., Neundorf, I., Beck-Sickinger, A. G., Pastor, R. W., & Balbach, J. (2008). Structure and dynamics of helix-0 of the N-BAR domain in lipid micelles and bilayers. *Biophysical Journal*, 95(9), 4315–23.

Mahadevan, M. S., Yadava, R. S., Yu, Q., Balijepalli, S., Frenzel-McCardell, C. D., Bourne, T. D., & Phillips, L. H. (2006). Reversible model of RNA toxicity and cardiac conduction defects in myotonic dystrophy. *Nature Genetics*, 38(9), 1066–70.

Mankodi, A., Logigian, E., Callahan, L., McClain, C., White, R., Henderson, D., Krym, M., & Thornton, C. A. (2000). Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science (New York, N.Y.)*, 289(5485), 1769–73.

Mankodi, A., Takahashi, M. P., Jiang, H., Beck, C. L., Bowers, W. J., Moxley, R. T., Cannon, S. C., &

- Thornton, C. A. (2002). Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of CIC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. *Molecular Cell*, 10(1), 35–44.
- Mankodi, A., Urbinati, C. R., Yuan, Q. P., Moxley, R. T., Sansone, V., Krym, M., Henderson, D., Schalling, M., Swanson, M. S., & Thornton, C. A. (2001). Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2. *Human Molecular Genetics*, 10(19), 2165–70.
- Marquis, J., Paillard, L., Audic, Y., Cosson, B., Danos, O., Le Bec, C., & Osborne, H. B. (2006). CUG-BP1/CELF1 requires UGU-rich sequences for high-affinity binding. *The Biochemical Journal*, 400(2), 291–301.
- Marteyn, A., Maury, Y., Gauthier, M. M., Lecuyer, C., Vernet, R., Denis, J. A., Pietu, G., Peschanski, M., & Martinat, C. (2011). Mutant human embryonic stem cells reveal neurite and synapse formation defects in type 1 myotonic dystrophy. *Cell Stem Cell*, 8(4), 434–444.
- Martorell, L., Monckton, D. G., Gamez, J., Johnson, K. J., Gich, I., Lopez de Munain, A., & Baiget, M. (1998). Progression of somatic CTG repeat length heterogeneity in the blood cells of myotonic dystrophy patients. *Human Molecular Genetics*, 7(2), 307–12.
- Mathieu, J., Allard, P., Potvin, L., Prévost, C., & Bégin, P. (1999). A 10-year study of mortality in a cohort of patients with myotonic dystrophy. *Neurology*, 52(8), 1658–62.
- Meola, G., & Cardani, R. (2015). Myotonic dystrophies: An update on clinical aspects, genetic, pathology, and molecular pathomechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1852(4), 594–606.
- Meola, G., & Sansone, V. (1996). A newly-described myotonic disorder (proximal myotonic myopathy--PROMM): personal experience and review of the literature. *Italian Journal of Neurological Sciences*, 17(5), 347–53.
- Miller, J. W., Urbinati, C. R., Teng-Umnuay, P., Stenberg, M. G., Byrne, B. J., Thornton, C. A., & Swanson, M. S. (2000). Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy. *The EMBO Journal*, 19(17), 4439–4448.
- Miyagawa, T., Ebinuma, I., Morohashi, Y., Hori, Y., Young Chang, M., Hattori, H., Maehara, T., Yokoshima, S., Fukuyama, T., Tsuji, S., Iwatsubo, T., Prendergast, G. C., & Tomita, T. (2016). BIN1 regulates BACE1 intracellular trafficking and amyloid- β production. *Human Molecular Genetics*.
- Monckton, D. G., Wong, L. J., Ashizawa, T., & Caskey, C. T. (1995). Somatic mosaicism, germline expansions, germline reversions and intergenerational reductions in myotonic dystrophy males: small pool PCR analyses. *Human Molecular Genetics*, 4(1), 1–8.
- Moxley, R. T., Corbett, A. J., Minaker, K. L., & Rowe, J. W. (1984). Whole body insulin resistance in myotonic dystrophy. *Annals of Neurology*, 15(2), 157–62.
- Moxley, R. T., Meola, G., Udd, B., & Ricker, K. (2002). Report of the 84th ENMC workshop: PROMM (proximal myotonic myopathy) and other myotonic dystrophy-like syndromes: 2nd workshop. 13-15th October, 2000, Loosdrecht, The Netherlands. *Neuromuscular Disorders : NMD*, 12(3), 306–17.

- Mulders, S. A. M., van den Broek, W. J. a a, Wheeler, T. M., Croes, H. J. E., van Kuik-Romeijn, P., de Kimpe, S. J., Furling, D., Platenburg, G. J., Gourdon, G., Thornton, C. a, Wieringa, B., & Wansink, D. G. (2009). Triplet-repeat oligonucleotide-mediated reversal of RNA toxicity in myotonic dystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(33), 13915–13920.
- Mulders, S. A. M., van Engelen, B. G. M., Wieringa, B., & Wansink, D. G. (2010). Molecular therapy in myotonic dystrophy: Focus on RNA gain-of-function. *Human Molecular Genetics*, *19*(R1), 90–97.
- Muller, A. J., Baker, J. F., DuHadaway, J. B., Ge, K., Farmer, G., Donover, P. S., Meade, R., Reid, C., Grzanna, R., Roach, A. H., Shah, N., Soler, A. P., & Prendergast, G. C. (2003). Targeted disruption of the murine Bin1/Amphiphysin II gene does not disable endocytosis but results in embryonic cardiomyopathy with aberrant myofibril formation. *Molecular and Cellular Biology*, *23*(12), 4295–306.
- Mussini, I., Di Mauro, S., & Angelini, C. (1970). Early ultrastructural and biochemical changes in muscle in dystrophia myotonica. *Journal of the Neurological Sciences*, *10*(6), 585–604.
- Nakamori, M., Sobczak, K., Puwanant, A., Welle, S., Eichinger, K., Pandya, S., Dekdebrun, J., Heatwole, C. R., McDermott, M. P., Chen, T., Cline, M., Tawil, R., Osborne, R. J., ... Thornton, C. A. (2013). Splicing biomarkers of disease severity in myotonic dystrophy. *Annals of Neurology*, *74*(6), 862–72.
- Nakamori, M., Taylor, K., Mochizuki, H., Sobczak, K., & Takahashi, M. P. (2016). Oral administration of erythromycin decreases RNA toxicity in myotonic dystrophy. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, *3*(1), 42–54.
- Nguyen, L., Luu, L. M., Peng, S., Serrano, J. F., Chan, H. Y. E., & Zimmerman, S. C. (2015). Rationally designed small molecules that target both the DNA and RNA causing myotonic dystrophy type 1. *Journal of the American Chemical Society*, *137*(44), 14180–9.
- Nicot, A.-S., Toussaint, A., Tosch, V., Kretz, C., Wallgren-Pettersson, C., Iwarsson, E., Kingston, H., Garnier, J.-M., Biancalana, V., Oldfors, A., Mandel, J.-L., & Laporte, J. (2007). Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy. *Nature Genetics*, *39*(9), 1134–9.
- Orengo, J. P., Chambon, P., Metzger, D., Mosier, D. R., Snipes, G. J., & Cooper, T. A. (2008). Expanded CTG repeats within the DMPK 3' UTR causes severe skeletal muscle wasting in an inducible mouse model for myotonic dystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(7), 2646–51.
- Osborne, R. J., Lin, X., Welle, S., Sobczak, K., O'Rourke, J. R., Swanson, M. S., & Thornton, C. A. (2009). Transcriptional and post-transcriptional impact of toxic RNA in myotonic dystrophy. *Human Molecular Genetics*, *18*(8), 1471–81.
- Owen, D. J., Wigge, P., Vallis, Y., Moore, J. D. A., Evans, P. R., & McMahon, H. T. (1998). Crystal structure of the amphiphysin-2 SH3 domain and its role in the prevention of dynamin ring formation. *EMBO Journal*, *17*(18), 5273–5285.
- Paillard, L., Legagneux, V., & 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), 107–13.

Pan, K., Liang, X., Zhang, H., Zhao, J., Wang, D., Li, J., Lian, Q., Chang, A. E., Li, Q., & Xia, J. (2012). Characterization of bridging integrator 1 (BIN1) as a potential tumor suppressor and prognostic marker in hepatocellular carcinoma. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 18(3), 507–18.

Panaite, P.-A., Gantelet, E., Kraftsik, R., Gourdon, G., Kuntzer, T., & Barakat-Walter, I. (2008). Myotonic dystrophy transgenic mice exhibit pathologic abnormalities in diaphragm neuromuscular junctions and phrenic nerves. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 67(8), 763–72.

Pandey, S. K., Wheeler, T. M., Justice, S. L., Kim, A., Younis, H. S., Gattis, D., Jauvin, D., Puymirat, J., Swayze, E. E., Freier, S. M., Bennett, C. F., Thornton, C. A., & MacLeod, A. R. (2015). Identification and characterization of modified antisense oligonucleotides targeting DMPK in mice and nonhuman primates for the treatment of myotonic dystrophy type 1. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 355(2), 329–340.

Paul, S., Dansithong, W., Kim, D., Rossi, J., Webster, N. J. G., Comai, L., & Reddy, S. (2006). Interaction of muscleblind, CUG-BP1 and hnRNP H proteins in DM1-associated aberrant IR splicing. *The EMBO Journal*, 25(18), 4271–83.

Pelargonio, G., Dello Russo, A., Sanna, T., De Martino, G., & Bellocchi, F. (2002). Myotonic dystrophy and the heart. *Heart (British Cardiac Society)*, 88(6), 665–70.

Pelletier, R., Hamel, F., Beaulieu, D., Patry, L., Haineault, C., Tarnopolsky, M., Schoser, B., & Puymirat, J. (2009). Absence of a differentiation defect in muscle satellite cells from DM2 patients. *Neurobiology of Disease*, 36(1), 181–90.

Perfetti, A., Greco, S., Bugiardini, E., Cardani, R., Gaia, P., Gaetano, C., Meola, G., & Martelli, F. (2014). Plasma microRNAs as biomarkers for myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscular Disorders: NMD*, 24(6), 509–15.

Peter, B. J., Kent, H. M., Mills, I. G., Vallis, Y., Butler, P. J. G., Evans, P. R., & McMahon, H. T. (2004). BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5657), 495–9.

Pettersson, O. J., Aagaard, L., Andrejeva, D., Thomsen, R., Jensen, T. G., & Damgaard, C. K. (2014). DDX6 regulates sequestered nuclear CUG-expanded DMPK-mRNA in dystrophia myotonica type 1. *Nucleic Acids Research*, 42(11), 7186–7200.

Philips, A. V., Timchenko, L. T., & Cooper, T. A. (1998). Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science (New York, N.Y.)*, 280(5364), 737–41.

Phillips, M. F., & Harper, P. S. (1997). Cardiac disease in myotonic dystrophy. *Cardiovascular Research*, 33(1), 13–22.

Picas, L., Viaud, J., Schauer, K., Vanni, S., Hnia, K., Fraissier, V., Roux, A., Bassereau, P., Gaits-Iacovoni, F., Payrastre, B., Laporte, J., Manneville, J.-B., & Goud, B. (2014). BIN1/M-Amphiphysin2

induces clustering of phosphoinositides to recruit its downstream partner dynamin. *Nature Communications*, 5(May), 5647.

Poulos, M. G., Batra, R., Charizanis, K., & Swanson, M. S. (2011). Developments in RNA splicing and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(1), a000778.

Poulos, M. G., Batra, R., Li, M., Yuan, Y., Zhang, C., Darnell, R. B., & Swanson, M. S. (2013). Progressive impairment of muscle regeneration in muscleblind-like 3 isoform knockout mice. *Human Molecular Genetics*, 22(17), 3547–58.

Ramjaun, A. R., & McPherson, P. S. (1998). Multiple amphiphysin II splice variants display differential clathrin binding: identification of two distinct clathrin-binding sites. *Journal of Neurochemistry*, 70(6), 2369–76.

Ramjaun, A. R., Philie, J., de Heuvel, E., & McPherson, P. S. (1999). The N terminus of amphiphysin II mediates dimerization and plasma membrane targeting. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(28), 19785–91.

Ranum, L. P. W., & Cooper, T. A. (2006). RNA-mediated neuromuscular disorders. *Annual Review of Neuroscience*, 29(1), 259–77.

Rau, F., Freyermuth, F., Fugier, C., Villemin, J.-P., Fischer, M.-C., Jost, B., Dembele, D., Gourdon, G., Nicole, A., Duboc, D., Wahbi, K., Day, J. W., Fujimura, H., ... Charlet-Berguerand, N. (2011). Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(7), 840–5.

Rau, F., Lainé, J., Ramanoudjame, L., Ferry, A., Arandel, L., Delalande, O., Jollet, A., Dingli, F., Lee, K.-Y., Peccate, C., Lorain, S., Kabashi, E., Athanasopoulos, T., ... Furling, D. (2015). Abnormal splicing switch of DMD's penultimate exon compromises muscle fibre maintenance in myotonic dystrophy. *Nature Communications*, 6(May), 7205.

Ravel-Chapuis, A., Bélanger, G., Yadava, R. S., Mahadevan, M. S., DesGroseillers, L., Côté, J., & Jasmin, B. J. (2012). The RNA-binding protein Stauf1 is increased in DM1 skeletal muscle and promotes alternative pre-mRNA splicing. *The Journal of Cell Biology*, 196(6), 699–712.

Razzaq, A. (2001). Amphiphysin is necessary for organization of the excitation-contraction coupling machinery of muscles, but not for synaptic vesicle endocytosis in *Drosophila*. *Genes & Development*, 15(22), 2967–2979.

Reardon, W., Newcombe, R., Fenton, I., Sibert, J., & Harper, P. S. (1993). The natural history of congenital myotonic dystrophy: mortality and long term clinical aspects. *Archives of Disease in Childhood*, 68(2), 177–81.

Reddy, S., Smith, D. B., Rich, M. M., Leferovich, J. M., Reilly, P., Davis, B. M., Tran, K., Rayburn, H., Bronson, R., Cros, D., Balice-Gordon, R. J., & Housman, D. (1996). Mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase develop a late onset progressive myopathy. *Nature Genetics*, 13(3), 325–35.

Ricker, K., Koch, M. C., Lehmann-Horn, F., Pongratz, D., Speich, N., Reiners, K., Schneider, C., &

- Moxley, R. T. (1995). Proximal myotonic myopathy. Clinical features of a multisystem disorder similar to myotonic dystrophy. *Archives of Neurology*, 52(1), 25–31.
- Rönblom, A., Forsberg, H., & Danielsson, A. (1996). Gastrointestinal symptoms in myotonic dystrophy. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 31(7), 654–7.
- Rosman, N. P., & Rebeiz, J. J. (1967). The cerebral defect and myopathy in myotonic dystrophy. A comparative clinicopathological study. *Neurology*, 17(11), 1106–12.
- Royer, B., Hnia, K., Gavriilidis, C., Tronchère, H., Tosch, V., & Laporte, J. (2013). The myotubularin-amphiphysin 2 complex in membrane tubulation and centronuclear myopathies. *EMBO Reports*, 14(August), 907–15.
- Rüdel, R., Ruppertsberg, J. P., & Spittelmeister, W. (1989). Abnormalities of the fast sodium current in myotonic dystrophy, recessive generalized myotonia, and adynamia episodica. *Muscle & Nerve*, 12(4), 281–7.
- Rzuczek, S. G., Southern, M. R., & Disney, M. D. (2015). Studying a Drug-like, RNA-Focused Small Molecule Library Identifies Compounds That Inhibit RNA Toxicity in Myotonic Dystrophy. *ACS Chemical Biology*, 10(12), 2706–15.
- Sakamuro, D., Elliott, K. J., Wechsler-Reya, R., & Prendergast, G. C. (1996). BIN1 is a novel MYC-interacting protein with features of a tumour suppressor. *Nature Genetics*, 14(1), 69–77.
- Sakamuro, D., & Prendergast, G. C. (1999). New Myc-interacting proteins: a second Myc network emerges. *Oncogene*, 18(19), 2942–54.
- Salisbury, E., Schoser, B., Schneider-Gold, C., Wang, G.-L., Huichalaf, C., Jin, B., Sirito, M., Sarkar, P., Krahe, R., Timchenko, N. A., & Timchenko, L. T. (2009). Expression of RNA CCUG repeats dysregulates translation and degradation of proteins in myotonic dystrophy 2 patients. *The American Journal of Pathology*, 175(2), 748–62.
- Santoro, S. W., & Joyce, G. F. (1997). A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(9), 4262–6.
- Sarkar, P. S., Appukuttan, B., Han, J., Ito, Y., Ai, C., Tsai, W., Chai, Y., Stout, J. T., & Reddy, S. (2000). Heterozygous loss of Six5 in mice is sufficient to cause ocular cataracts. *Nature Genetics*, 25(1), 110–4.
- Savkur, R. S., Philips, a V., & Cooper, T. a. (2001). Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nature Genetics*, 29(1), 40–47.
- Schara, U., & Schoser, B. G. H. (2006). Myotonic dystrophies type 1 and 2: a summary on current aspects. *Seminars in Pediatric Neurology*, 13(2), 71–9.
- Schröder, J. M., & Adams, R. D. (1968). The ultrastructural morphology of the muscle fiber in myotonic dystrophy. *Acta Neuropathologica*, 10(3), 218–41.
- Sergeant, N., Sablonnière, B., Schraen-Maschke, S., Ghestem, A., Maurage, C. a, Watzet, A., Vermersch, P., & Delacourte, A. (2001). Dysregulation of human brain microtubule-associated tau

- mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Human Molecular Genetics*, 10(19), 2143–55.
- Seshadri, S., Fitzpatrick, A. L., Ikram, M. A., DeStefano, A. L., Gudnason, V., Boada, M., Bis, J. C., Smith, A. V., Carassquillo, M. M., Lambert, J. C., Harold, D., Schrijvers, E. M. C., Ramirez-Lorca, R., ... EADI1 Consortium. (2010). Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. *JAMA*, 303(18), 1832–40.
- Seznec, H., Agbulut, O., Sergeant, N., Savouret, C., Ghestem, a, Tabti, N., Willer, J. C., Ourth, L., Duros, C., Brisson, E., Fouquet, C., Butler-Browne, G., Delacourte, a, ... Gourdon, G. (2001). Mice transgenic for the human myotonic dystrophy region with expanded CTG repeats display muscular and brain abnormalities. *Human Molecular Genetics*, 10(23), 2717–2726.
- Seznec, H., Lia-Baldini, S., Duros, C., Fouquet, C., Lacroix, C., Hofmann-Radvanyi, H., Junien, C., & Gourdon, G. (2000). Transgenic mice carrying large human genomic sequences with expanded CTG repeat mimic closely the DM CTG repeat intergenerational and somatic instability. *Human Molecular Genetics*, 9(8), 1185–1194.
- Siboni, R. B., Bodner, M. J., Khalifa, M. M., Docter, A. G., Choi, J. Y., Nakamori, M., Haley, M. M., & Berglund, J. A. (2015). Biological Efficacy and Toxicity of Diamidines in Myotonic Dystrophy Type 1 Models. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(15), 5770–80.
- Siboni, R. B., Nakamori, M., Wagner, S. D., Struck, A. J., Coonrod, L. A., Harriott, S. A., Cass, D. M., Tanner, M. K., & Berglund, J. A. (2015). Actinomycin D Specifically Reduces Expanded CUG Repeat RNA in Myotonic Dystrophy Models. *Cell Reports*, 13(11), 2386–94.
- Smith, L. L., Gupta, V. a, & Beggs, A. H. (2014). Bridging integrator 1 (Bin1) deficiency in zebrafish results in centronuclear myopathy. *Human Molecular Genetics*, 23(13), 3566–78.
- Sobczak, K., Wheeler, T. M., Wang, W., & Thornton, C. A. (2013). RNA interference targeting CUG repeats in a mouse model of myotonic dystrophy. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 21(2), 380–7.
- Steinert, H. (1909). Über das klinische und anatomische bild des muskelschwundes der myotoniker. *Deutsche Zeitschrift Fur Nervenheilkunde*, 37, 38,1909.
- Sultana, N., Dienes, B., Benedetti, A., Tuluc, P., Szentesi, P., Sztretye, M., Rainer, J., Hess, M. W., Schwarzer, C., Obermair, G. J., Csernoch, L., & Flucher, B. E. (2016). Restricting calcium currents is required for correct fiber type specification in skeletal muscle. *Development (Cambridge, England)*, 143(9), 1547–59.
- Takahashi, M. P., Nakamori, M., & Mochizuki, H. (2014). [Therapeutic development in myotonic dystrophy]. *Rinshō Shinkeigaku = Clinical Neurology*, 54(12), 1077–9.
- Taliaferro, J. M., Vidaki, M., Oliveira, R., Olson, S., Zhan, L., Saxena, T., Wang, E. T., Graveley, B. R., Gertler, F. B., Swanson, M. S., & Burge, C. B. (2016). Distal Alternative Last Exons Localize mRNAs to Neural Projections. *Molecular Cell*, 61(6), 821–833.
- Taneja, K. L., McCurrach, M., Schalling, M., Housman, D., & Singer, R. H. (1995). Foci of trinucleotide

- repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues. *The Journal of Cell Biology*, 128(6), 995–1002.
- Tang, Z. Z., Yarotsky, V., Wei, L., Sobczak, K., Nakamori, M., Eichinger, K., Moxley, R. T., Dirksen, R. T., & Thornton, C. A. (2012). Muscle weakness in myotonic dystrophy associated with misregulated splicing and altered gating of Ca(V)1.1 calcium channel. *Human Molecular Genetics*, 21(6), 1312–24.
- Teplova, M., & Patel, D. J. (2008). Structural insights into RNA recognition by the alternative-splicing regulator muscleblind-like MBNL1. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(12), 1343–1351.
- Teplova, M., Song, J., Gaw, H. Y., Teplov, A., & Patel, D. J. (2010). Structural insights into RNA recognition by the alternate-splicing regulator CUG-binding protein 1. *Structure (London, England: 1993)*, 18(10), 1364–77.
- Timchenko, L. T., Timchenko, N. A., Caskey, C. T., & Roberts, R. (1996). Novel proteins with binding specificity for DNA CTG repeats and RNA CUG repeats: Implications for myotonic dystrophy. *Human Molecular Genetics*, 5(1), 115–121.
- Timchenko, N. A., Cai, Z. J., Welm, A. L., Reddy, S., Ashizawa, T., & Timchenko, L. T. (2001). RNA CUG repeats sequester CUGBP1 and alter protein levels and activity of CUGBP1. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(11), 7820–6.
- Timchenko, N. A., Wang, G.-L., & Timchenko, L. T. (2005). RNA CUG-binding protein 1 increases translation of 20-kDa isoform of CCAAT/enhancer-binding protein beta by interacting with the alpha and beta subunits of eukaryotic initiation translation factor 2. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(21), 20549–57.
- Tjondrokoesoemo, A., Park, K. H., Ferrante, C., Komazaki, S., Lesniak, S., Brotto, M., Ko, J.-K., Zhou, J., Weisleder, N., & Ma, J. (2011). Disrupted membrane structure and intracellular Ca²⁺ signaling in adult skeletal muscle with acute knockdown of Bin1. *PLoS One*, 6(9), e25740.
- Tortora, G., & Derrickson, B. (2007). Le tissu musculaire. In *Principes d'anatomie et de physiologie* (4e edition, pp. 310–347). de boeck.
- Toussaint, A., Cowling, B. S., Hnia, K., Mohr, M., Oldfors, A., Schwab, Y., Yis, U., Maisonobe, T., Stojkovic, T., Wallgren-Pettersson, C., Laugel, V., Echaniz-Laguna, A., Mandel, J.-L., ... Laporte, J. (2011). Defects in amphiphysin 2 (BIN1) and triads in several forms of centronuclear myopathies. *Acta Neuropathologica*, 121(2), 253–66.
- Tran, H., Gourrier, N., Lemerrier-Neuillet, C., Dhaenens, C.-M., Vautrin, A., Fernandez-Gomez, F. J., Arandel, L., Carpentier, C., Obriot, H., Eddarkaoui, S., Delattre, L., Van Brussels, E., Holt, I., ... Sergeant, N. (2011). Analysis of exonic regions involved in nuclear localization, splicing activity, and dimerization of Muscleblind-like-1 isoforms. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(18), 16435–46.
- Tsutsui, K., Maeda, Y., Tsutsui, K., Seki, S., & Tokunaga, A. (1997). cDNA cloning of a novel amphiphysin isoform and tissue-specific expression of its multiple splice variants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 236(1), 178–83.

- Turner, C., & Hilton-Jones, D. (2010). The myotonic dystrophies: diagnosis and management. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 81(4), 358–67.
- Ueda, H., Shimokawa, M., Yamamoto, M., Kameda, N., Mizusawa, H., Baba, T., Terada, N., Fujii, Y., Ohno, S., Ishiura, S., & Kobayashi, T. (1999). Decreased expression of myotonic dystrophy protein kinase and disorganization of sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle of myotonic dystrophy. *Journal of the Neurological Sciences*, 162(1), 38–50.
- Vermersch, P., Sergeant, N., Ruchoux, M. M., Hofmann-Radvanyi, H., Wattez, A., Petit, H., Dwailly, P., & Delacourte, A. (1996). Specific tau variants in the brains of patients with myotonic dystrophy. *Neurology*, 47(3), 711–7.
- Vlasova, I. A., & Bohjanen, P. R. (2008). Posttranscriptional regulation of gene networks by GU-rich elements and CELF proteins. *RNA Biology*, 5(4), 201–7.
- Wahbi, K., Algalarrondo, V., Bécane, H. M., Fressart, V., Beldjord, C., Azibi, K., Lazarus, A., Berber, N., Radvanyi-Hoffman, H., Stojkovic, T., Béhin, A., Laforêt, P., Eymard, B., ... Duboc, D. (2013). Brugada syndrome and abnormal splicing of SCN5A in myotonic dystrophy type 1. *Archives of Cardiovascular Diseases*, 106(12), 635–643.
- Wahbi, K., Meune, C., Porcher, R., Bécane, H. M., Lazarus, A., Laforêt, P., Stojkovic, T., Béhin, A., Radvanyi-Hoffmann, H., Eymard, B., & Duboc, D. (2012). Electrophysiological study with prophylactic pacing and survival in adults with myotonic dystrophy and conduction system disease. *JAMA*, 307(12), 1292–301.
- Wang, E., Cody, N., Jog, S., & Biancolella, M. (2012). Transcriptome-wide regulation of pre-mRNA splicing and mRNA localization by muscleblind proteins. *Cell*, 150(4), 710–724.
- Wang, E., Ward, A. J., Cherone, J. M., Giudice, J., Wang, T. T., Treacy, D. J., Lambert, N. J., Freese, P., Saxena, T., Cooper, T. A., & Burge, C. B. (2015). Antagonistic regulation of mRNA expression and splicing by CELF and MBNL proteins. *Genome Research*, 25(6), 858–71.
- Wang, G.-S., Kearney, D. L., De Biasi, M., Taffet, G., & Cooper, T. A. (2007). Elevation of RNA-binding protein CUGBP1 is an early event in an inducible heart-specific mouse model of myotonic dystrophy. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(10), 2802–11.
- Wang, G.-S., Kuyumcu-Martinez, M. N., Sarma, S., Mathur, N., Wehrens, X. H. T., & Cooper, T. A. (2009). PKC inhibition ameliorates the cardiac phenotype in a mouse model of myotonic dystrophy type 1. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(12), 3797–806.
- Wansink, D. G., & Wieringa, B. (2003). Transgenic mouse models for myotonic dystrophy type 1 (DM1). *Cytogenetic and Genome Research*, 100(1-4), 230–242.
- Ward, A. J., Rimer, M., Killian, J. M., Dowling, J. J., & Cooper, T. A. (2010). CUGBP1 overexpression in mouse skeletal muscle reproduces features of myotonic dystrophy type 1. *Human Molecular Genetics*, 19(18), 3614–22.
- Warf, M. B., & Berglund, J. A. (2007). MBNL binds similar RNA structures in the CUG repeats of

- myotonic dystrophy and its pre-mRNA substrate cardiac troponin T MBNL binds similar RNA structures in the CUG repeats of myotonic dystrophy and its pre-mRNA substrate cardiac troponin T, (Zuker 2003), 2238–2251.
- Warf, M. B., Nakamori, M., Matthys, C. M., Thornton, C. a, & Berglund, J. A. (2009). Pentamidine reverses the splicing defects associated with myotonic dystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(44), 18551–6.
- Wechsler-Reya, R. J., Elliott, K. J., & Prendergast, G. C. (1998). A role for the putative tumor suppressor Bin1 in muscle cell differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, 18(1), 566–75.
- Wheeler, T. M., Leger, A. J., Pandey, S. K., MacLeod, a R., Nakamori, M., Cheng, S. H., Wentworth, B. M., Bennett, C. F., & Thornton, C. A. (2012). Targeting nuclear RNA for in vivo correction of myotonic dystrophy. *Nature*, 488(7409), 111–5.
- Wheeler, T. M., Lueck, J. D., Swanson, M. S., Dirksen, R. T., & Thornton, C. A. (2007). Correction of CIC-1 splicing eliminates chloride channelopathy and myotonia in mouse models of myotonic dystrophy. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(12), 3952–7.
- Wheeler, T. M., Sobczak, K., Lueck, J. D., Osborne, R. J., Lin, X., Dirksen, R. T., & Thornton, C. a. (2009). Reversal of RNA dominance by displacement of protein sequestered on triplet repeat RNA. *Science (New York, N.Y.)*, 325(5938), 336–339.
- Wojtkowiak-Szlachcic, A., Taylor, K., Stepniak-Konieczna, E., Sznajder, L. J., Mykowska, A., Sroka, J., Thornton, C. A., & Sobczak, K. (2015). Short antisense-locked nucleic acids (all-LNAs) correct alternative splicing abnormalities in myotonic dystrophy. *Nucleic Acids Research*, 43(6), 3318–31.
- Wu, T., & Baumgart, T. (2014). BIN1 membrane curvature sensing and generation show autoinhibition regulated by downstream ligands and PI(4,5)P2. *Biochemistry*, 53(46), 7297–309.
- Wu, Y., Yu, L., McMahon, R., Rossi, J. J., Forman, S. J., & Snyder, D. S. (1999). Inhibition of bcr-abl oncogene expression by novel deoxyribozymes (DNAzymes). *Human Gene Therapy*, 10(17), 2847–57.
- Yadava, R. S., Frenzel-McCardell, C. D., Yu, Q., Srinivasan, V., Tucker, A. L., Puymirat, J., Thornton, C. A., Prall, O. W., Harvey, R. P., & Mahadevan, M. S. (2008). RNA toxicity in myotonic muscular dystrophy induces NKX2-5 expression. *Nature Genetics*, 40(1), 61–8.
- Yang, S., Liu, T., Li, S., Zhang, X., Ding, Q., Que, H., Yan, X., Wei, K., & Liu, S. (2008). Comparative proteomic analysis of brains of naturally aging mice. *Neuroscience*, 154(3), 1107–1120.
- Yu, L., Chibnik, L. B., Srivastava, G. P., Pochet, N., Yang, J., Xu, J., Kozubek, J., Obholzer, N., Leurgans, S. E., Schneider, J. A., Meissner, A., De Jager, P. L., & Bennett, D. A. (2015). Association of Brain DNA methylation in SORL1, ABCA7, HLA-DRB5, SLC24A4, and BIN1 with pathological diagnosis of Alzheimer disease. *JAMA Neurology*, 72(1), 15–24.
- Yuan, Y., Compton, S. A., Sobczak, K., Stenberg, M. G., Thornton, C. A., Griffith, J. D., & Swanson, M. S. (2007). Muscleblind-like 1 interacts with RNA hairpins in splicing target and pathogenic RNAs. *Nucleic Acids Research*, 35(16), 5474–5486.


CV du candidat


Michel NEY


PhD, Molecular Biology



 (+33) 6 22 10 37 50

 michelney89@gmail.com

 linkedin.com/in/michelney89

 IGBMC, 1 rue Laurent Fries
67404 ILLKIRCH - FRANCE

Nationality : French
Date of Birth : Sep - 09 - 1989
Languages : French (native)
English (TOEIC 965 / 990pt.)

01. Education

2012 - 2016 PhD in Life Sciences at IGBMC (Strasbourg) / [2012-15: Regional grant ; 2016: AFM-Telethon funding]
2015 - 2016 Inter-university diploma (French DIU), Rare diseases: From research to treatment / Fondation Maladies Rares
2010 - 2012 Master degree in Health & Biology / Faculty of Sciences (Nancy - France) / [Mean grade of 15.2 / 20]

02. Scientific Experience

2012 - 2016 Thesis in Life Sciences at IGBMC (Strasbourg) / Supervisor: Dr. N. CHARLET
Title: « Molecular mechanisms of Myotonic Dystrophy disease »
2012 (7 months) Master 2nd year internship at IMoPA (Nancy) / Supervisor: Pr. Y. MOTORIN
Title: « Detection of methylated residues m⁵C in yeast rRNA »

03. Scientific Communications

June 2015 Oral presentation: « Implication of BIN1 in Myotonic Dystrophy », International myotonic dystrophy consortium (IDMC-10) / Paris - France
Dec. 2014 High school intervention for AFM-Telethon: « A genetic disease, the example of Duchenne muscular dystrophy »
Oct. 2013 Oral presentation: « BIN1 exon 7 alteration in DM1 », International myotonic dystrophy consortium (IDMC-9) / Spain

04. Skills

Management Supervisor of 6 different internships trainees including 3 foreigners for a cumulative time of 14 months
Function included the supervision at the bench, help in writing of the report, coaching for the oral presentation

Molecular biology Immunoprecipitation, PCR, cloning, reverse transcription, quantitative PCR, western blot, GST/His-tagged recombinant proteins expression and purification, radioactivity (in vitro transcription, UV-crosslink and EMSA)

Cell culture Culture and maintenance of cell lines (COS-1, Neuro-2A, HeLa, C2C12, HEK), DNA / siRNA transfection, RNA extraction, protein lysate preparation, culture and maintenance of primary culture from patients (myoblast) and differentiation

Imagery Immunofluorescence, FISH-IF. Competent with the use of ImageJ and Fiji softwares
Autonomous with the use of the Nanozoomer digital slide scanner, Fluorescent microscope, Confocal microscope (sp8)

Animal research Hold a French accreditation for animal experimentation. Maintenance of transgenic mouse lines, breeding, numbering, genotyping, dissection, injection (IP and intramuscular), whole animal fixation via PFA heart perfusion

Information & Technology IT and internet certificate (French C2i) level 1. Beginner with Perl and Python languages
Software used: Illustrator, SeqBuilder, GraphPad Prism, Mendeley, Word, Excel and PowerPoint

Social Volunteer during Telethon 2014 (French fund-raising event) organized by AFM-Telethon, member of the IGBMC student association, responsible of the Journal club activity and organizer of one student retreat

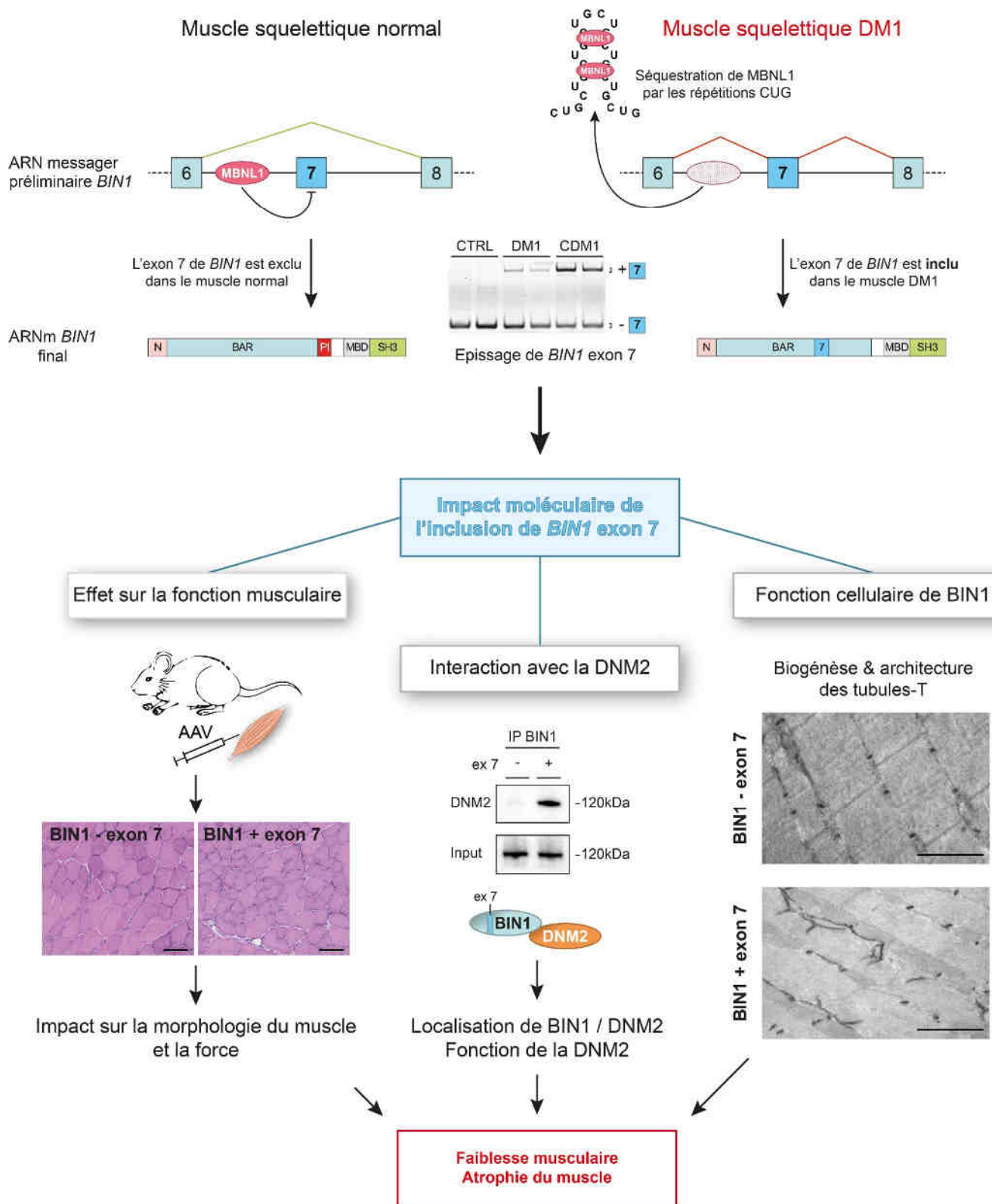
05. Publications

Ney M., Smith L., Nakamori M., Chautard E., Lee K.-Y., Gaucherot A., Messaddeq N., Koebel P., Vicaire S., Jost B., Oulad-Abdelghani M., Lopez de Munain A., Udd B., Schoser B., Meola G., Auboeuf D., Swanson M.S., Wang E., Takahashi M.P., Furling D., Beggs A.H., Hnia K. and Charlet-Berguerand N. « Splicing misregulation of *BIN1* exon 7 contributes to muscle weakness and atrophy in Myotonic Dystrophy »

July 2015 - PLoS One:

Bourgeois G.*, **Ney M.***, Gaspar I., Aigueperse C., Schaeffer M., Kellner S., Helm M. and Motorin Y. « Eukaryotic rRNA Modification by Yeast 5-Methylcytosine-Methyltransferases and Human Proliferation-Associated Antigen p120 ». PubMed PMID: 26196125 [* co-first authors].

Rôle de l'inclusion de l'exon 7 de *BIN1* dans la faiblesse musculaire des patients atteints de dystrophie myotonique.



Rôle de l'inclusion de l'exon 7 de *BIN1* dans la faiblesse musculaire des patients atteints de dystrophie myotonique.

La dystrophie myotonique de type 1 (DM1), est une maladie génétique héréditaire affectant environ 1/8000 personnes. Les patients souffrant de DM1 développent essentiellement des troubles musculaires tels qu'une faiblesse et une atrophie musculaire. La cause de la DM1 est expliquée par la mutation du gène "*DMPK*".

Lors de ma thèse, j'ai pu démontrer que l'épissage de l'ARNm *BIN1* était altéré dans le muscle DM1. En effet, l'exon 7 de *BIN1*, qui est absent du muscle normal, est exprimé de façon aberrante chez les patients DM1. En utilisant un modèle murin, j'ai prouvé que l'expression forcée de l'exon 7 de *BIN1* altérerait simultanément la structure et la fonction du muscle. Nous avons notamment observés une diminution de la taille des fibres musculaires et une augmentation de la faiblesse musculaire, comparé à des souris normales. Par conséquent, ce travail aidera à la compréhension du mécanisme de la maladie et pourrait expliquer les causes de la faiblesse musculaire et de l'atrophie.

Mots clés :

BIN1 ; *DNM2* ; dystrophie myotonique de type 1 ; DM1 ; ARN ; épissage alternatif ; AAV ; faiblesse musculaire ; Biologie moléculaire ; Maladie rare

The aberrant inclusion of *BIN1* exon 7 in DM1 muscle contribute to the muscle weakness and atrophy of the patients.

Myotonic dystrophy of type 1 (DM1), is an inherited genetic disease affecting around 1 in 8000 person. Patients suffering from DM1 develop essentially muscle disorders such as muscle weakness, muscle loss and atrophy. The cause of DM1 is explained by the mutation of a gene called "*DMPK*".

During my thesis, I discovered that the alternative splicing of *BIN1* mRNA was altered in the muscle of DM1 patients. Indeed, the *BIN1* exon 7, which is normally absent in healthy muscle, is aberrantly expressed in DM1 muscle. By using a mouse model, I found that the forced expression of *BIN1* exon 7 was responsible of the alteration of both muscle structure and function. Notably, we found a decrease in muscle fibers area (atrophy) and an increase of muscle weakness, compared to wild-type mice. Therefore, this work will help in the understanding of the disease mechanism and could explain the causes of muscle weakness and atrophy, which have never been elucidated to this date.

Keywords :

BIN1 ; *DNM2* ; Myotonic dystrophy of type 1 ; DM1 ; RNA ; Alternative splicing ; AAV ; Muscle weakness ; Molecular biology ; Rare disease