



HAL
open science

Les agrégats de PABPN1 dans la dystrophie musculaire oculopharyngée

Fanny Roth

► **To cite this version:**

Fanny Roth. Les agrégats de PABPN1 dans la dystrophie musculaire oculopharyngée. Biologie moléculaire. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS342 . tel-03162426

HAL Id: tel-03162426

<https://theses.hal.science/tel-03162426>

Submitted on 8 Mar 2021

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.

Sorbonne Université

Complexité du Vivant - ED515

Centre de Recherche en Myologie – U974

Les agrégats de PABPN1 dans la dystrophie musculaire oculopharyngée

Par Fanny Roth

Thèse de doctorat en sciences du Vivant

Dirigée par Capucine Trollet et Gillian Butler-Browne

Présentée et soutenue publiquement le 18 Juin 2019

Devant un jury composé de :

| | |
|--|---------------------|
| Dr Bernard Brais, Directeur de recherche, McGill, Canada | Rapporteur |
| Dr Vincent Gache, Chargé de recherche, Inserm, Lyon | Rapporteur |
| Dr Dominique Weil, Directrice de recherche, CNRS, Paris | Examinatrice |
| Dr Cécile Voisset, Chargée de recherche, Inserm, Brest | Examinatrice |
| Dr Capucine Trollet, Chargée de recherche, Inserm, Paris | Directrice de thèse |
| Dr Gillian Butler-Browne, Directrice de recherche, Inserm, Paris | Directrice de thèse |

Remerciements

Je souhaiterais adresser mes premiers remerciements à messieurs Bernard Brais et Vincent Gache pour avoir accepté de relire et d'évaluer mon manuscrit de thèse ainsi qu'à mesdames Dominique Weil et Cécile Voisset pour avoir accepté de faire parti du jury de thèse en tant qu'examinatrices.

Merci à Vincent et à Gill pour votre enthousiasme et tous vos précieux conseils scientifiques à nos nombreuses réunions du Jeudi matin. Gill, merci d'avoir été ma directrice de thèse. Je suis très fière d'avoir été ta dernière doctorante avant une retraite bien méritée ...

Capucine, je ne sais pas vraiment par où commencer pour te remercier... Ta passion et ton enthousiasme pour la science sont un véritable moteur qui, combinés à une curiosité débordante, nous embarque dans une multitude de projets passionnants. Il y a un proverbe qui dit que « seul on va plus vite mais ensemble on va plus loin » et je crois qu'il te correspond bien. Tu as une capacité à unifier les forces en motivant et en mettant en valeur chacun d'entre nous qui rend le travail d'équipe efficace et agréable pour tous. Alors, merci de m'avoir autant impliquée dans tes projets et dans la vie de l'équipe, merci pour les nombreux congrès et les opportunités de collaborations à Londres et à Santiago et surtout merci de m'avoir autant fait confiance. J'aurai énormément évolué à tes côtés et je t'en suis très reconnaissante.

Merci bien évidemment à tout le reste de l'équipe 3 : Anne, Elisa, Jamila, Mona, Laura, Kamel, Alix, Yann et Justine. Ca a été super de travailler avec vous, j'ai beaucoup appris ! Un merci tout particulier à toi Jamila, qui m'a apporté une aide indéfectible et qui t'es démenée pour effectuer avec brio plein de manips sur mes différents projets. Je suis très heureuse d'avoir travaillé avec toi, ton énergie et ta bonne humeur vont me manquer ! Merci également à tous les anciens de l'équipe : Gonzalo, qui a toujours été là pour répondre à toutes mes questions, Pierre qui m'a passé le flambeau d'une partie de ses projets (et de ses cellules... ahhh ces H2k...) et de sa mission d'enseignement qui m'aura beaucoup enrichie, Victor, Alison, Marie-Cécile et Julien avec qui j'ai passé de super moments.

Merci à toutes les autres personnes que j'ai pu côtoyer pendant ces 3 années et demi dans les couloirs de Babinski. Je ne vais pas pouvoir tous vous citer mais vous avez tous participés à la réussite de ma thèse, d'une manière ou d'une autre et je vous en suis reconnaissante. Une pensée toute particulière à mes collègues de bureau : Kamel avec toutes tes blagues et tes petites histoires, Michel avec tes délicieux gâteaux dont tu nous gâtait, Ludo

pour toutes les discussions crossfit et autres et Magda pour toutes nos discussions matinales, les gossips, la danse, le squash, le yoga et j'en passe... Tout ça va me manquer !

Un merci particulier également à Isabelle pour ta bienveillance, à Valérie pour toutes nos discussions cinéma et littérature et à Gisèle pour m'avoir accueillie au sein de ton équipe lors de mon stage de M2.

Enfin merci à tous ceux avec lesquels on a partagé plus que de la science lors des afterworks, des soirées et des congrès : Astrid, Blanca, Margot, Anaïs, Jordan, Jean-François, Nico, Francesco, Lorenzo, Enzo.

D'un point de vu plus personnel, j'aimerais en premier lieu remercier toute ma famille, et en particulier mes parents, ma sœur Didou et mon beau-frère Clément : vous êtes les piliers solides sur lesquels je me suis construite. C'est grâce à votre présence et à votre soutien que j'en suis ici aujourd'hui ! A Antoine, merci de m'avoir portée (et supportée parfois, il faut bien le dire...) depuis presque 4 ans, tu es mon équilibre, merci pour tout... Un dernier petit merci à toi Marion, parce que tu nous as préparé de bons petits plats tous les soirs pendant 6 mois et que tu as été suffisamment patiente pour supporter mes bouderies de la fin de l'écriture du manuscrit...

Merci à ceux qui sont toujours là, chaque fois que je rentre « chez nous », qui sont toujours disponibles pour qu'on passe des soirées ensemble à mourir de rire. Merci à Geoffrey, Mélissa, Jerem et Axelle.

Et puis il y a les nouveaux, qui ne le sont plus tant que ça maintenant: Ilan, Laura Marine, Lisa, Clarisse, Nico, Clémence, Maxence, Anne, Antoine, Renaud et les autres. Merci pour tous les moments qu'on a vécu ensemble avant et pendant la thèse, vous êtes géniaux ! Merci particulièrement à Louise, ma Loulou, parce qu'en plus d'être mon amie tu auras été ma collègue pendant quelques mois, merci pour tous les cafés partagés tous les matins pendant l'écriture de ma thèse où tu auras écouté toutes mes élucubrations et tous mes doutes et où tu auras su me rassurer sur un certain nombre de points, je t'en suis très reconnaissante !

Sommaire

| | |
|--|-----------|
| Liste des figures | 6 |
| Liste des tableaux..... | 6 |
| Abréviations | 7 |
| Avant-propos..... | 10 |
| Introduction | 11 |
| I. OPMD : une dystrophie musculaire..... | 11 |
| 1) Le muscle strié squelettique..... | 11 |
| 2) Les dystrophies musculaires..... | 14 |
| 3) Dystrophie musculaire oculopharyngée | 15 |
| 3.a) Historique et épidémiologie | 15 |
| 3.b) Clinique..... | 16 |
| 3.c) Les restrictions d'atteintes musculaires..... | 17 |
| 3.c)i Le muscle cricopharyngien..... | 17 |
| 3.c)ii Le muscle releveur de la paupière..... | 18 |
| II. OPMD : une maladie à expansion de triplets | 19 |
| 1) Génétique de l'OPMD..... | 19 |
| 2) Les maladies à expansion de triplets..... | 25 |
| 2.a) Généralités..... | 25 |
| 2.b) Comparaison des maladies polyAla et polyQ..... | 27 |
| III. Structure, localisation et fonctions de PABPN1..... | 30 |
| 1) Structure..... | 30 |
| 1.a) Structure du gène..... | 30 |
| 1.b) Régulation des transcrits de <i>PABPN1</i> | 32 |
| 1.c) Structure de la protéine..... | 34 |
| 1.d) Localisation | 35 |
| 2) Fonctions | 36 |
| 2.a) Rôle dans la polyadénylation des ARNm..... | 36 |
| 2.b) Contrôle de la taille de la queue poly(A) des ARNm | 37 |
| 2.c) Rôle de PABPN1 dans l'export nucléaire | 38 |
| 2.d) Rôle dans le choix du site de polyadénylation | 39 |
| 2.e) Rôle dans l'hyperadénylation et la dégradation des ARN | 40 |
| 2.f) Rôle dans la régulation de l'épissage des ARNm..... | 41 |
| 2.g) Rôle dans la formation des paraspeckles | 42 |
| 2.h) Rôle dans la myogenèse..... | 43 |
| IV. Les agrégats dans l'OPMD..... | 44 |
| 1) Les agrégats de PABPN1 | 44 |
| 1.a) Structure et localisation..... | 44 |
| 1.b) Composition | 46 |
| 1.c) Agrégation et domaines structuraux de PABPN1 | 50 |
| 1.d) Dynamique de formation..... | 53 |
| 1.e) Rôles..... | 54 |
| 1.f) Les agrégats dans d'autres maladies à expansions polyalanine..... | 56 |
| 2) Agrégats et propriétés d'agrégation | 57 |

| | |
|---|------------|
| V. Physiopathologie de l'OPMD..... | 62 |
| 1) Les modèles d'étude de l'OPMD..... | 62 |
| 1.a) Les modèles cellulaires | 62 |
| 1.b) Les modèles animaux | 64 |
| 2. Mécanismes moléculaires de l'OPMD | 67 |
| 2.a) Dérégulation des systèmes de dégradation..... | 67 |
| 2.b) Des défauts mitochondriaux..... | 69 |
| 2.c) Des signes d'apoptose | 70 |
| 2.d) Un vieillissement prématuré | 70 |
| 2.e) Des dérégulations du métabolisme des ARN | 71 |
| VI. Thérapies..... | 72 |
| 1. Interventions médicales..... | 72 |
| 2. Thérapie cellulaire | 73 |
| 3. Thérapie génique..... | 74 |
| 3.a) Les virus associés à l'adénovirus (AAV) | 75 |
| 3.b) Thérapie génique pour l'OPMD..... | 76 |
| 4. Stratégies anti-agrégats :..... | 78 |
| Résultats | 81 |
| Pharmacological modulation of the ER stress response ameliorates | |
| oculopharyngeal muscular dystrophy | 82 |
| I. Mise en contexte de l'étude : | 83 |
| II. Discussion et résultats complémentaires | 111 |
| Discussion générale..... | 115 |
| Annexes..... | 122 |
| Contribution : | 123 |
| Bibliographie..... | 199 |

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1: Structure et contraction de la fibre musculaire..... | 12 |
| Figure 2: Myogenèse du muscle squelettique..... | 13 |
| Figure 3: Distribution des faiblesses musculaires au sein des différents types de dystrophies musculaires. | 14 |
| Figure 4: Compartiments cellulaires affectés dans les dystrophies musculaires. | 15 |
| Figure 5: Morphologie du muscle cricopharyngien..... | 18 |
| Figure 6: Morphologie du muscle releveur de la paupière..... | 19 |
| Figure 7: Expansion de triplets dans <i>PABPN1</i> | 20 |
| Figure 8: Phénotypes cliniques observés chez les patients OPMD..... | 23 |
| Figure 9: Corrélation entre l'âge du diagnostic et le génotype chez les patients OPMD..... | 24 |
| Figure 10: Maladies à expansions de triplets..... | 25 |
| Figure 11: Structure du gène <i>PABPN1</i> et de ses transcrits..... | 32 |
| Figure 12: Le niveau d'expression de PABPN1 est faible dans le muscle..... | 33 |
| Figure 13: Structure de la protéine PABPN1..... | 35 |
| Figure 14: PABPN1 contrôle la taille de la queue poly(A) dans les cellules musculaires..... | 38 |
| Figure 15: PABPN1 est importante pour le transport des ARNm..... | 39 |
| Figure 16: PABPN1 inhibe l'utilisation du site de polyadénylation proximal..... | 40 |
| Figure 17: PABPN1 aide au recrutement de l'exosome nucléaire..... | 40 |
| Figure 18: Fonctions nucléaires de PABPN1..... | 44 |
| Figure 19: Agrégats pathologiques dans les noyaux musculaires de patients OPMD..... | 46 |
| Figure 20: Composition des agrégats..... | 48 |
| Figure 21: Dynamique moléculaire de PABPN1 sauvage et muté..... | 52 |
| Figure 22: Fibrilles et feuillets β | 58 |
| Figure 23: Mécanisme de formation des agrégats..... | 60 |
| Figure 24: PABPN1 contient des domaines à faible complexité..... | 62 |
| Figure 25: Le système ubiquitine-protéasome..... | 67 |
| Figure 26: La thérapie cellulaire autologue améliore la déglutition dans l'OPMD..... | 74 |
| Figure 27: Production de virus par triple transfection..... | 76 |
| Figure 28: Constructions pour thérapie génique dans l'OPMD..... | 77 |
| Figure 29: L'intégrité des agrégats de PABPN1 dépend des ARN Erreur ! Signet non défini. | |
| Figure 30: Guanabenz (wystensin)..... | 83 |
| Figure 31: Repliement assisté des protéines par l'activité PFAR de l'ARNr..... | 85 |
| Figure 32: Activation des 3 voies UPR en réponse à un stress de l'ER..... | 87 |
| Figure 33: Stress de l'ER dans l'OPMD chez l'homme..... Erreur ! Signet non défini. | |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 1: Maladies polyalanine vs maladies polyglutamine..... | 30 |
| Tableau 2: Composition des agrégats de PABPN1..... | 50 |
| Tableau 3: Modèles cellulaires de l'OPMD..... | 63 |
| Tableau 4: Modèles animaux de l'OPMD..... | 66 |

Abréviations

Les abréviations utilisées dans ce manuscrit sont listées ci-dessous. Les termes en français correspondent à des traductions littérales communément acceptées dans la communauté scientifique.

| Abréviations | Correspondances |
|--------------|---|
| 3'UTR | 3' untranslated region |
| 5'UTR | 5' untranslated region |
| 6AP | 6-aminophenanthridine |
| AAV | Associated adenovirus |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ADP | Adénosine diphosphate |
| ALS | Slérose latérale amyotrophique |
| arcRNA | Architectural RNA |
| ARN | Acide ribonucléique |
| ATF4/6 | Activating transcription factor 4/6 |
| ATG | Autophagy-related genes |
| ATP | Adénosine triphosphate |
| ATXN | Ataxin |
| BCL2 | B-cell lymphoma 2 |
| BIP | Binding immunoglobulin protein |
| CCD | Dysplasie cleidocraniale |
| CPM | Muscle cricopharyngien |
| CPSF | cleavage and polyadénylation specificity factor |
| DDIT3 | DNA damage-inducible transcript 3 |
| DM | Dystrophie musculaire |
| DM1 | Dystrophie myotonique de type 1 |
| DMPK | Myotonin-protein kinase |
| DRPLA | Atrophie dentalo-rubro-pallido-luysienne |
| EMA | Agence européenne du médicament |
| ER | Reticulum endoplasmique |
| ERAD | Endoplasmic reticulum-associated degradation |
| FDA | US food and drug administration |
| FGS | Syndrome main-pied-utérus |
| FISH | Fluorescent <i>in situ</i> hybridation |
| FLIP | Fluorescence loss in photobleaching |
| FRAP | Fluorescence recovery after photobleaching |
| GA | Guanabenz |
| GFP | Green fluorescent protein |
| GRP 78/94 | Glucose-regulated protein 78/94 |
| HD | Maladie de Huntington |
| HPE | Holoprosencéphalie |
| HSA | Human skeletal actin |
| HSP | Heat-shock protein |

| | |
|-----------|--|
| HTT | Huntingtin |
| HUR | Human antigen R |
| IBM | Myosites à inclusions |
| IQ | Imiquimod |
| IRE1 | Inositol-requiring protein 1 |
| KD | Knock-down |
| kDA | Kilodalton |
| LCD | Low complexity domain |
| LLPS | Liquid-liquid phase separation |
| lncRNA | Long non coding RNA |
| MBNL | Muscleblind-like |
| MEC | Matrice extracellulaire |
| MJD | Maladie de Joseph Macado |
| MRF4 | Myogenic regulatory factor 4 |
| MYF5 | Myogenic factor 5 |
| MYHC | Myosin heavy chain |
| MYOD | Myoblast determination protein 1 |
| NADH | Nicotinamide adenosine dinucleotide |
| NEAT1 | Nuclear Enriched Abundant Transcript 1 |
| NLS | Nuclear localization signal |
| OD | Oligomerization domain |
| OPMD | Dystrophie musculaire oculopharyngée |
| PABPN1 | Poly(A) binding protein nuclear 1 |
| PAP | Poly(A) polymerase |
| PAS | Polyadenylation signal |
| PAX 7/3 | Paired box 7/3 |
| PERK | Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase |
| PFAR | Protein folding activity of the ribosome |
| polyAla | Polyalanine |
| polyQ | Polyglutamine |
| PPD | PABPN1 and PAP α/γ -mediated RNA decay |
| PRMT1 | Protein arginine N-methyltransferase |
| QM | Muscle quadriceps |
| RBP | RNA binding protein |
| RPM | Muscle releveur de la paupière |
| RRM | RNA recognition motif |
| RZ | Ribozyme |
| SCA | Ataxie spinocerebelleuse |
| SCM | Muscle sterno-cléido-mastoidien |
| SMA1/SBMA | Atrophie musculaire bulbaire de type 1 liée à l'X |
| snoRNA | Small nucleolar RNA |
| snRNA | Small nuclear RNA |
| SOD | Superoxyde dismutase |
| SPD | Syndrome synpolydactyle |
| TA | Tibialis anterior |
| TNNT3 | Troponine T3 |

| | |
|----------|---|
| UPR | Unfolded protein response |
| UPS | Ubiquitin-proteasome system |
| XLMR+GHD | Retard mental lié à l’X et déficitaire en hormone de croissance |

Avant-propos

Lors de ma thèse, je me suis intéressée aux agrégats de PABPN1 (polyA binding protein nuclear 1) dans la dystrophie musculaire oculopharyngée (OPMD). Cette maladie est une dystrophie musculaire qui apparaît chez l'homme autour de 50-60 ans. Les premiers symptômes touchent principalement les muscles du pharynx et des paupières aboutissant à des difficultés de déglutition (dysphagie) et une chute des paupières (ptosis). Par la suite, des atteintes progressives des muscles proximaux peuvent être observées. D'un point de vue génétique, la maladie est causée par une mutation dans l'exon 1 du gène *PABPN1* ce qui aboutit à une expansion de 1 à 8 alanines dans la partie N-terminale de la protéine mutée. Le principal marqueur pathologique est la présence d'agrégats intranucléaires insolubles dans les muscles des patients OPMD. Bien que les agrégats aient été décrits depuis près de 40 ans, leur rôle dans la pathologie est encore discuté. Ma thèse avait pour objectif de mieux les caractériser chez les patients et également de tester une molécule anti-agrégats qui pourrait servir de molécules thérapeutiques pour traiter la maladie. Dans ce manuscrit, je commencerai par faire l'état de l'art de l'OPMD en présentant les agrégats de PABPN1 ainsi que les dérégulations moléculaires connues dans la maladie et les thérapies actuellement mises en place. Les résultats de chacun des deux objectifs seront présentés sous forme d'article puis commentés.

Mon premier objectif était de caractériser les agrégats de PABPN1 chez les patients OPMD. Dans la partie résultat, je présenterai donc tout d'abord les résultats obtenus à partir de l'étude de 72 biopsies OPMD montrant le lien entre les agrégats de PABPN1 et l'âge et le génotype des patients. Ce travail nous a permis de proposer un mécanisme de toxicité des agrégats dans les muscles OPMD cliniquement atteints. Les résultats de cette étude n'ont pas encore été publiés et l'article présenté dans ce manuscrit n'est pas la version définitive.

Mon second objectif était d'évaluer l'efficacité de la molécule anti-agrégats guanabenz sur ces modèles mammifères de l'OPMD. Les résultats montrent que cette molécule permet de diminuer la taille et le pourcentage d'agrégats dans un modèle cellulaire et murin de la maladie ainsi que d'améliorer les phénotypes musculaires chez la souris OPMD. Ce travail nous permet également de mettre en évidence du stress de réticulum endoplasmique dans l'OPMD. Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication dans la revue « Human Molecular Genetics » en 2019.

Introduction

I. OPMD : une dystrophie musculaire

1) Le muscle strié squelettique

Le muscle squelettique est l'un des tissus les plus plastique et les plus dynamique du corps humain. Ce tissu représente 40% du poids du corps et contient 50-75% des protéines. Son rôle est de convertir l'énergie chimique en énergie mécanique afin de générer de la force pour assurer la posture et pour effectuer un mouvement. Métaboliquement, son rôle est de stocker des acides aminés essentiels et des carbohydrates et de consommer la majorité de l'oxygène pour produire de l'énergie utilisée pendant un effort physique.

D'un point de vue architectural, le muscle squelettique correspond à un arrangement de fibres musculaires associées à du tissu conjonctif, des vaisseaux et des nerfs. Le tout est entouré par un tissu conjonctif appelé *épimysium*. La fibre musculaire qui peut mesurer est elle-même entourée d'une membrane appelée sarcolemme. Le sarcomère constitue l'unité contractile du muscle et s'organise avec deux principaux systèmes de filaments: les filaments épais de myosines et les filaments fins d'actines qui ensemble forment les bandes A. L'interaction de ces deux types de filaments confère à la fibre musculaire sa capacité de contraction/relaxation (**figure 1AB**).

Afin d'enclencher son mouvement volontaire, la fibre nécessite une interaction particulière avec le système nerveux central au travers de ce qu'on appelle une unité motrice. L'unité motrice correspond à la projection d'un neurone sur plusieurs fibres musculaires au niveau de la jonction neuromusculaire permettant le passage d'un potentiel d'action. Ceci permet alors l'entrée du calcium du réticulum sarcoplasmique dans le cytoplasme de la fibre entraînant le raccourcissement du sarcomère. C'est l'action de la tête de myosine sur le filament d'actine en présence d'ATP qui permet ce mouvement. Brièvement, lors de l'entrée du calcium dans la cellule, l'actine se fixe à la myosine en hydrolysant l'ATP en ADP + Pi (phosphate inositol), ce qui entraîne un changement de conformation de la tête de myosine permettant son mouvement. La contraction s'arrête lorsqu'en absence de calcium les protéines tropomyosines et troponines I qui composent le filament d'actine viennent inhiber la fixation de la tête de myosine sur le filament d'actine ([Frontera and Ochala, 2015](#)) (**Figure 1C**).

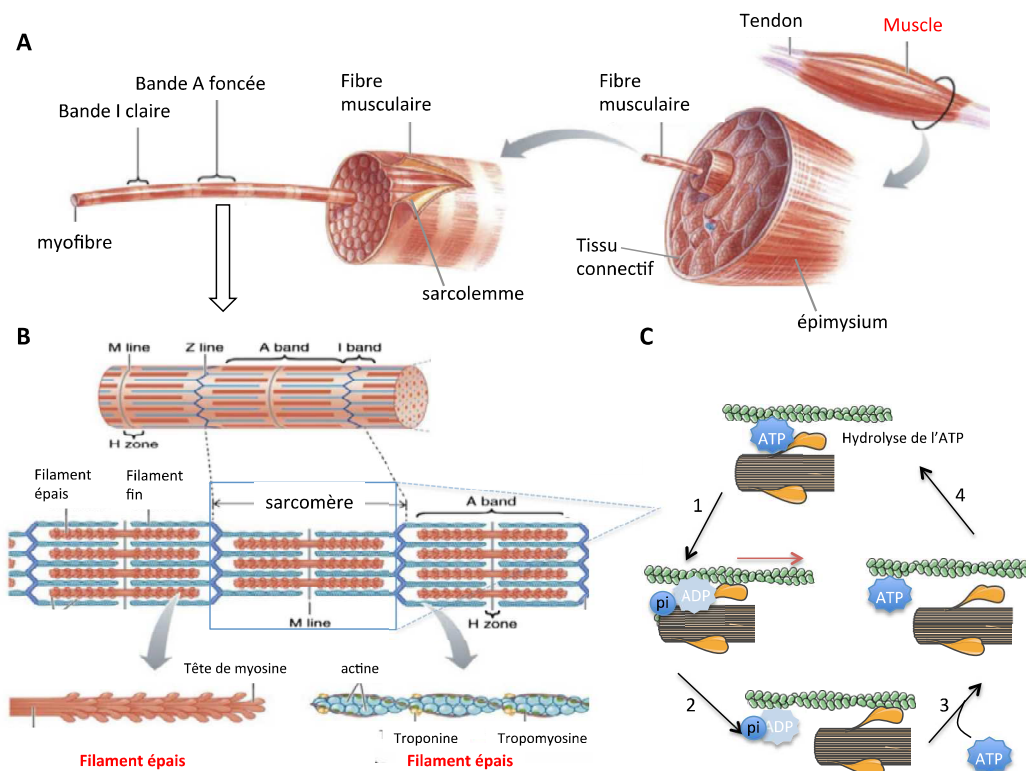


Figure 1: Structure et contraction de la fibre musculaire.

(A) structure de la fibre musculaire. (B) composition du sarcomère. (C) Cycle de contraction ATP-dépendant en réponse à un influx calcique. [Adapté de Frontera et al. 2015](#)

Le muscle squelettique est composé d'un ensemble hétérogène de types de fibres musculaires distinctes par leur capacité métabolique. Chez l'homme, deux types de fibres sont prédominants : les fibres lentes (de type I) et les fibres rapides (de type II). Les fibres lentes ont une importante capacité de résistance à la fatigue mais une vitesse et une force de contraction faible. Ces fibres sont fortement chargées en mitochondries permettant une haute capacité oxydative efficace sur le long terme. Les fibres rapides ont peu de résistance à la fatigue mais une capacité et une force de contraction élevée. Elles se divisent en 2 parties qui corrént avec leur quantité de mitochondries: les fibres oxydatives ou fibres intermédiaires (type IIa) et les fibres glycolytiques ou fibres rapides (type IIb) ([Bourdeau Julien et al., 2018](#); [Picard et al., 2012](#)).

Les différents types de fibres musculaires sont composés de différents isoformes de myosine (MyHC), codées par différents gènes. Les gènes *MYH1*, *MYH2* et *MYH4* codent respectivement les isoformes MyHC-2X, MyHC-2A et MyHC-2B qui composent les fibres de type II. Les fibres de types I sont elles majoritairement composées de l'isoforme MyHC-I codé par le gène *MYH7* ([Schiaffino and Reggiani, 2011](#); [Talbot and Maves, 2016](#)). Chez les mammifères, un seul muscle peut contenir plusieurs types de fibres et cette composition peut

varier entre muscles du même groupe. Par exemple, le muscle soléaire humain est majoritairement composé de fibres de type I alors que le triceps est majoritairement composé de fibres de type II (Johnson et al., 1973).

La myogenèse est le processus par lequel la fibre musculaire se forme au cours du développement. Les précurseurs myogéniques dans les somites expriment les protéines Pax7 et Pax3 qui sont des marqueurs de cellules souches. Lors du début de la myogenèse ces cellules se divisent et se déterminent progressivement en myoblastes exprimant les facteurs de transcriptions myogéniques MyoD et Myf5. Ces cellules vont se différencier puis fusionner en myotubes exprimant MyoD et la myogenine avant de maturer en exprimant la myogenine de manière transitoire et MRF4 (Zammit, 2017) (Figure 2). Plus récemment, les deux nouveaux marqueurs Myomixer et Myomarker ont été identifiés comme étant nécessaires à la fusion myogénique au cours du développement musculaire (Bi et al., 2017; Millay et al., 2013).

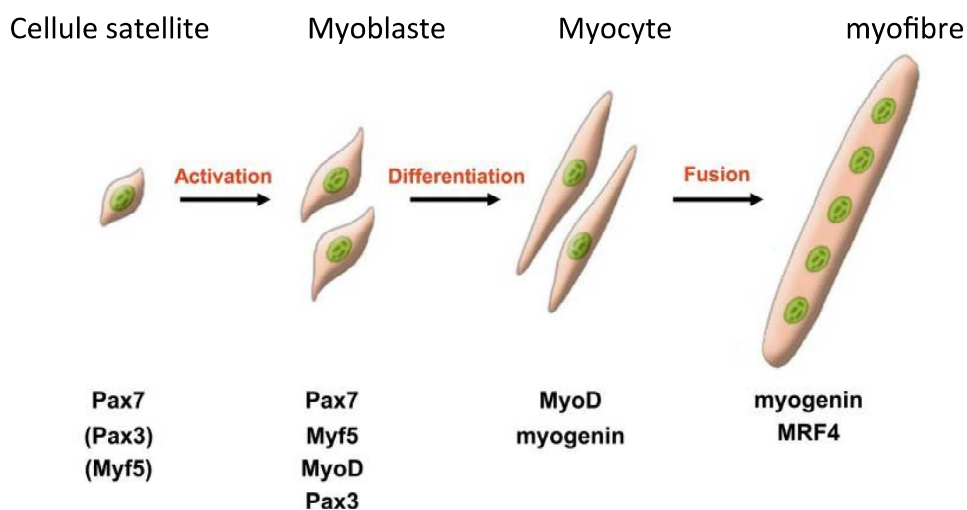


Figure 2: Myogenèse du muscle squelettique.

Adapté de (Le Grand and Rudnicki, 2007)

A l'âge adulte, le muscle squelettique est post-mitotique nécessitant peu de régénération. Cependant, suite à une blessure, ce tissu est capable de se régénérer grâce à l'activation des cellules souches musculaires nommées cellules satellites en raison de leur positionnement à la périphérie de la fibre musculaire. Ces cellules sont caractérisées par l'expression de nombreux marqueurs dont le plus utilisé est le facteur de transcription PAX7 qui est exprimé de manière ubiquitaire dans les cellules satellites qu'elles soient activées ou quiescentes (Zammit et al., 2004).

2) Les dystrophies musculaires

Les dystrophies musculaires (DM) regroupent un ensemble hétérogène d'affections musculaires caractérisées par une faiblesse musculaire progressive d'intensité et de distribution variable. Ces maladies sont souvent associées à un niveau élevé de créatine kinase, qui est une enzyme libérée dans le sang lors de lésions tissulaires (Wallace and McNally, 2009). Les DM sont hétérogènes du fait de leur présentation clinique, leur âge d'apparition, leur vitesse de progression et leur distribution d'atteintes musculaires très variables. Elles peuvent cependant être divisées en plusieurs groupes déterminés par le type de muscle atteint permettant de distinguer les dystrophies musculaires congénitales (CMD), distales, proximales, fascio scapulo humérales et oculopharyngées (Emery, 2002; Mercuri and Muntoni, 2013) (figure 3).

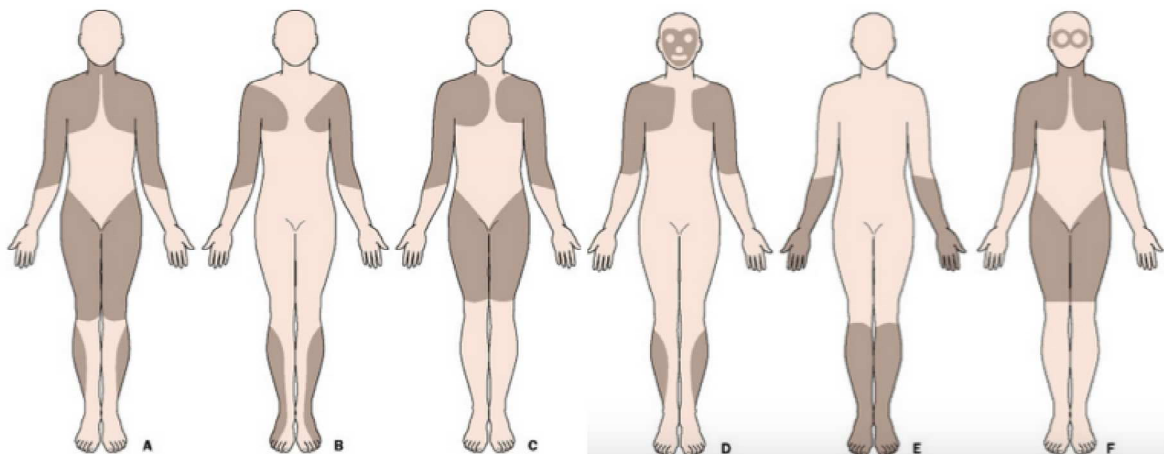


Figure 3: Distribution des faiblesses musculaires au sein des différents types de dystrophies musculaires.

A. Dystrophies musculaires de type Duchenne et Becker ; **B.** Dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss ; **C.** Dystrophie musculaire des ceintures ; **D.** Dystrophie fascio-scapulo-humérale ; **E.** Dystrophies distales ; **F.** Dystrophie oculopharyngée. Les zones foncées correspondent aux zones atteintes.

Les approches de génétique moléculaire telles que clonage positionnel et l'approche gène candidat ont permis de mieux comprendre ces dystrophies d'un point de vue moléculaire. Le premier gène à avoir été identifié comme causale d'une dystrophie est la dystrophine dans le cas de la myopathie de Duchenne (Hoffman et al., 1987; Monaco et al., 1986). Par la suite, plusieurs mutations associées à des dystrophies musculaires ont été identifiées dans des gènes essentiels à l'intégrité, la réparation et à la régénération musculaire: 1/ les protéines associées

un ptosis à apparition tardive (après 50 ans) associé à une dysphagie progressive menant à une dénutrition sévère (Taylor, 1915). A cette époque, c'était l'hypothèse d'une affection neurologique qui était privilégiée pour expliquer ce cas clinique et il faudra attendre 1962 pour que les travaux de Victor *et al.* permettent de publier un tableau clinique qui individualise l'OPMD et la classe définitivement dans la catégorie des maladies musculaires (Victor *et al.*, 1962a).

À partir de 1965, le neurologue québécois A. Barbeau commence à s'intéresser à la maladie en rassemblant toutes les familles décrites dans la littérature comme étant atteintes de ptosis et de dysphagie. Il mène des études généalogiques qui lui permettent d'établir un arbre rassemblant 249 individus atteints, originaires de plus de dix grandes familles différentes. C'est à partir de cet arbre établi en 1967 qu'est née l'idée « d'effet fondateur » pour l'OPMD expliquant la fréquence de cette maladie particulièrement élevée dans certaines provinces du Québec. Les travaux d'A. Barbeau ont contribué à comprendre que le gène responsable de l'OPMD avait probablement été introduit au Québec par 3 sœurs françaises qui ont immigré au Canada en 1648 (Bouchard, 1997).

Un effet fondateur similaire a été proposé dans la population juive de Bukhara vivant actuellement en Israël. La mutation aurait été introduit bien avant la mutation franco-canadienne, au 13^{ème} ou 14^{ème} siècle, lorsque des groupes ethniques se sont installés dans les oasis de Bukhara et Samarcande en Ouzbékistan (Blumen *et al.*, 2000).

L'OPMD est maintenant décrite dans 33 pays à travers le monde (Richard *et al.*, 2017). La prévalence de la maladie est de 1/1000 au Québec (Brais, 1998; Brunet *et al.*, 1997) et de 1/600 dans la population juive de Bukhara en Israël (Blumen *et al.*, 1993) en raison de ces effets fondateurs. Elle est de 1/100 000 en Europe et au Japon (Brais, 1998; Fan and Rouleau, 2003). Aux États-Unis, la majorité des patients sont d'origines franco-canadienne même si une partie non négligeable est soit d'origine juive (Victor *et al.*, 1962a) ou soit hispano-américaine au Texas (Becher *et al.*, 2001) et en Californie (Grewal *et al.*, 1999).

3.b) Clinique

Les manifestations cliniques de l'OPMD apparaissent autour de 50-60 ans. Les symptômes principaux sont des difficultés de déglutition (dysphagie) et une chute des paupières (ptosis) (Victor *et al.*, 1962b). Ils sont dus à une faiblesse des muscles pharyngiens et élévateurs palpébraux respectivement. En moyenne, la dysphagie et le ptosis sont observés à des âges similaires puisque le ptosis est observé en moyenne vers 48 ans (âge extrême 26-65 ans) et la dysphagie en moyenne vers 51 ans (âges extrêmes 40-63 ans) (Bouchard *et al.*,

1997). L'étude histologique des muscles OPMD révèle des défauts classiquement associés aux dystrophies musculaires comme une atrophie des fibres musculaires, une hétérogénéité dans leur taille, une augmentation du tissu fibrotique et la présence de fibres avec des noyaux centraux. Cependant, on retrouve dans l'OPMD, quelques changements moins classiques comme notamment la présence de fibres angulaires et de vacuoles bordées (Brais, 2003; Gidaro et al., 2013). Le seule caractéristique histologique propre à l'OPMD est la présence d'agrégats nucléaires dans les muscles des patients (Tomé and Fardeau, 1980). Ces agrégats seront largement décrits dans la partie IV de l'introduction. L'évolution de la maladie est lente et une atteinte progressive des muscles striés squelettiques est observée là où les muscles lisses et cardiaques sont préservés. Ainsi, les affections musculaires s'étendent progressivement aux muscles faciaux et cervicaux puis aux muscles de la ceinture pelvienne, aux muscles adducteurs et aux muscles de la loge postérieure de la cuisse (Trollet et al., 2014). A un stade avancé de la maladie, les patients peuvent nécessiter d'une assistance pour se déplacer (Brais, 2003; Richard et al., 2017; Van Der Sluijs et al., 2003).

L'éventuelle possibilité d'une atteinte neurologique a déjà été soulevée dans l'OPMD. Des perturbations cognitives sévères ont été observées chez 2 patients OPMD homozygotes (voir paragraphe « génétique de l'OPMD ») (Blumen et al., 2009) et une évaluation neuropsychologique de 11 patients hétérozygotes montre que ces derniers répondent moins bien aux tests que les patients contrôles du même âge (Dubbioso et al., 2012). Anatomiquement, une implication du système nerveux périphérique a été suggérée en montrant une diminution de fibres myélinisées au niveau des nerfs extraoculaires, pharyngés et lingual (Probst et al., 1982; Schmitt and Krause, 1981). De plus, des neuropathies axonales ont été rapportées chez des patients OPMD (Müller et al., 2001; Schober et al., 2001). Cependant, la réelle atteinte neurologique reste à démontrer et à dissocier d'éventuelles maladies neurodégénératives indépendantes liées à l'âge (Brais, 2003; Richard et al., 2016).

3.c) Les restrictions d'atteintes musculaires

Comme mentionné précédemment, les premiers symptômes cliniques observés dans l'OPMD correspondent à une dysphagie et à un ptosis dus à des atteintes des muscles du pharynx et du muscle releveur de la paupière respectivement. Ces deux muscles sont présentés ci-dessous :

3.c)i Le muscle cricopharyngien

Les muscles constricteurs forment la partie postérieure du pharynx et sont constitués de trois groupes de muscles : muscles supérieurs, moyens et inférieurs. Leur contraction va permettre le passage du bol alimentaire vers l'œsophage lors de la déglutition.

Le muscle cricopharyngien (CPM) est l'élément principal du muscle constricteur inférieur du pharynx. D'un point de vue physiologique, ce muscle va empêcher l'entrée de l'air dans le tube digestif au moment de l'inspiration, prévenant donc les éventuels reflux et protégeant ainsi les voies aériennes (Sivarao and Goyal, 2000).

Ce muscle a déjà été décrit comme ayant des propriétés propres, le distinguant des autres muscles squelettiques. En effet, il a été montré que la taille des fibres musculaires d'un CPM était plus petite que celle d'un muscle quadriceps (QM), qu'il était fortement enrichi en tissu conjonctif (fibrose) et que 82% des fibres étaient de type I et hautement oxydatives (Bonington et al., 1988; Kristmundsdottir et al., 1990). L'étude histologique du muscle CPM réalisée au laboratoire montre que dans l'OPMD, ces propriétés sont exacerbées (Gidaro et al., 2013). Par rapport à un CPM contrôle, le muscle CPM OPMD présente jusqu'à 40% de tissu fibrotique (contre 20% dans le CPM contrôle) ainsi que des fibres atrophiées avec une atteinte préférentielle des fibres de type IIa (oxydatives rapides) (figure 5).

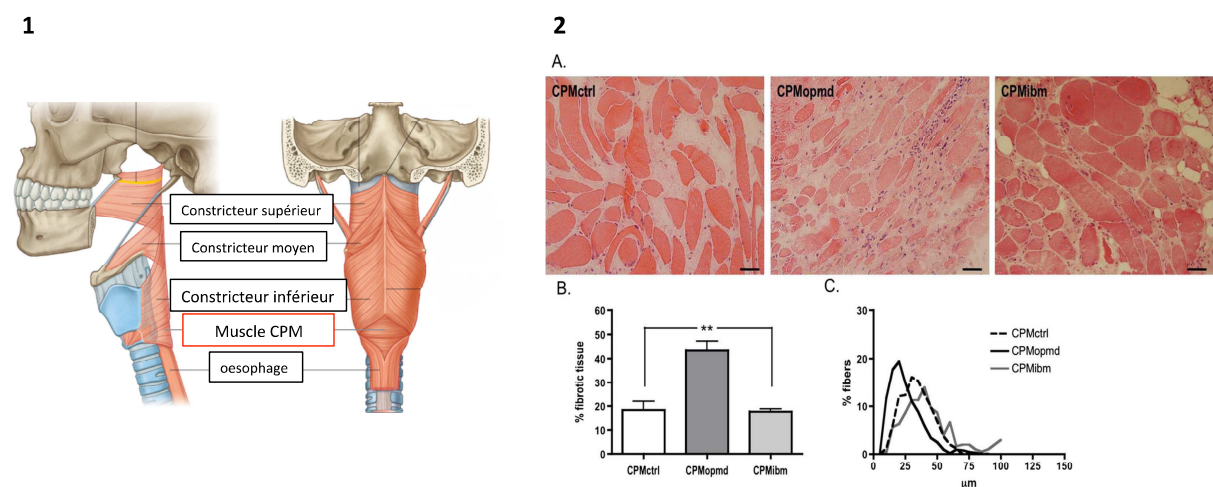


Figure 5: Morphologie du muscle cricopharyngien

1/ Représentation anatomique des muscles du pharynx. 2/ A. Coloration hématoxyline & éosine (H&E). Echelle : 50μm ; B. Pourcentage de fibrose mesuré grâce à une coloration au rouge sirius ** p< 0,01 OPMD vs contrôle et IBM; C. Quantification de la taille des fibres. CPMctrl : muscle cricopharyngien contrôle, CPMopmd : muscle cricopharyngien OPMD ; CPMibm: muscle cricopharyngien de patient atteint de myosite à inclusions (contrôle pathologique). Gidaro et al. 2013

3.c)ii Le muscle releveur de la paupière

Le muscle releveur de la paupière (RPM) est un muscle strié plat habituellement associé au muscle lisse nommé muscle de Müller. La coordination de ce muscle permet de

maintenir la tonicité de la paupière supérieure. En coloration hématoxyline éosine, ce muscle possède les caractéristiques du muscle strié squelettique avec des fibres de tailles variables dont les noyaux sont situés en périphérie et il présente un pourcentage important de tissu conjonctif (Lee et al., 2012). Par ailleurs, les auteurs comparent la morphologie du RPM sur 27 patients jeunes et âgés (allant de 21 à 73 ans) et n'observent pas d'altération avec l'âge. La comparaison d'un RPM d'un patient dystrophique et d'un patient contrôle montre que le muscle dystrophique (ici patient atteint de dystrophie myotonique de type 1) contient plus de cellules satellites que le muscle de sujet sain (Simon, 2014).

Dans l'OPMD, la faiblesse du RPM est associée à une chute des paupières (ptosis) et des études histologiques réalisées au laboratoire montrent que ce muscle est également fibrotique (figure 6).

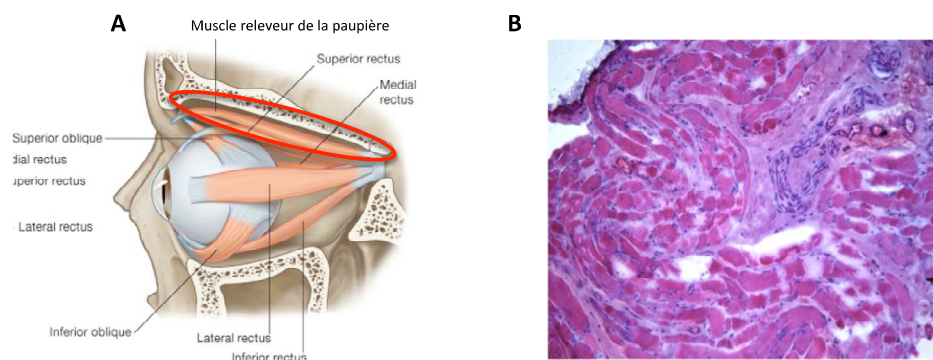


Figure 6: Morphologie du muscle releveur de la paupière

A. Représentation anatomique. B. Coloration en hématoxyline & éosine d'une coupe de RPM OPMD

II. OPMD : une maladie à expansion de triplets

1) Génétique de l'OPMD

Découverte du gène et nomenclature :

Les travaux initiaux de B. Brais et G. Rouleau ont permis de recenser 469 individus d'origine québécoise dont 73 sont diagnostiqués pour l'OPMD. Ce recensement généalogique a permis une étude de famille pour la mise en évidence d'une région génétique d'intérêt puis, par clonage positionnel, le gène *PABPN1* a été découvert comme responsable de l'OPMD (Brais, 1998; Brais et al., 1995a, 1997).

La séquence codante du gène *PABPN1* est située sur le chromosome 14, possède 7 exons et la mutation responsable de l'OPMD se trouve dans l'exon 1. Dans le gène sauvage cet exon possède 6 répétitions du triplet (GCN) suivis de 3 répétitions (GCA) et d'un triplet

(GCG) menant à une protéine possédant 10 alanines. On retrouve, chez tous les patients OPMD, une expansion de 1 à 8 triplets (GCN) aboutissant à une protéine portant de 11 à 18 alanines (**figure 7**) (Brais, 1998; Jouan et al., 2014; Richard et al., 2015).

Depuis 2013, la nomenclature des allèles a changé pour refléter l'effet de l'expansion d'alanines au niveau de la protéine plutôt que l'expansion (GCG) au niveau du gène. Ainsi, une expansion de 3 triplets GCN, précédemment notée comme (GCN)9 est maintenant notée (GCN)13/13Ala afin de tenir compte des 4 codons suivants (3(GCA)+1(GCG)) qui codent également 4 alanines (Raz et al., 2013a).

Par conséquent, dans la suite du manuscrit, les mutations sur les différents allèles seront référencées sous la nomenclature (GCN)11-18. Pour plus de clarté, les génotypes hétérozygotes seront notés (GCN)n et les génotypes homozygotes (GCN)n-n.

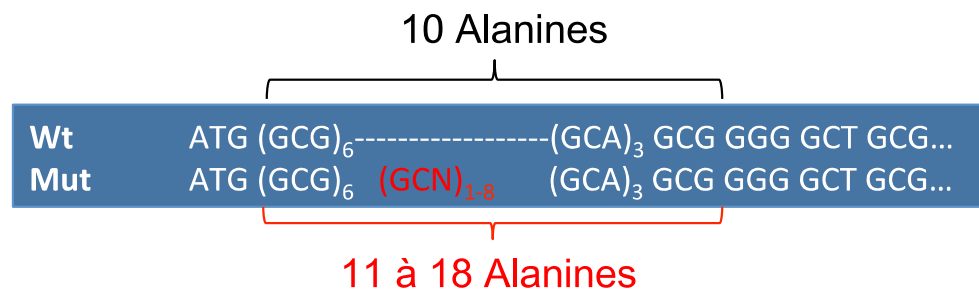


Figure 7: Expansion de triplets dans *PABPN1*

Le gène contient à l'état sauvage (wt) 9 triplets (GCN) (où N peut correspondre à une Adénosine (A) ou une guanine (G))(Robinson et al., 2005) codant pour une protéine sauvage de 10 alanines. Le gène muté (mut) contient de 1 à 8 triplets (GCN) supplémentaires codant une protéine ayant 11 à 18 alanines. D'après Jouan et al. 2014, Richard et al. 2015 et Brais et al. 1998

L'OPMD est une maladie monogénique autosomique dominante avec pénétrance complète dépendante de l'âge (Brais et al., 1999). Par opposition à la majorité des maladies à expansion de triplets comme le syndrome de l'X fragile, la maladie de Huntington ou la dystrophie myotonique de type (DM1) (McMurray, 2010) la mutation dans l'OPMD est méiotiquement stable.

Fréquence de distribution des allèles :

Dans les populations à effet fondateurs comme la population franco-canadienne ou juive de Bukhara, la plupart des familles portent l'**allèle (GCN)13** historiquement transmise dans ces régions (Blumen et al., 2000; Brais, 1998). L'étude de 175 familles et 807 individus

à travers le monde montre que cet allèle est majoritaire dans toutes les populations européennes (Hill et al., 2001; Mirabella et al., 2000; Müller et al., 2001; Raz et al., 2013a; Richard et al., 2017; Tondo et al., 2012), canadiennes, américaines et japonaises (Brais, 2003). Cependant, une étude récente montre que c'est l'allèle (GCN)16 qui est majoritaire sur les 50 patients danois étudiés (de Leeuw et al., 2018) alors que l'analyse de 102 patients mexicains montre que 65% d'entre eux possèdent l'allèle (GCN)15 (Cruz-Aguilar et al., 2017).

L'**allèle (GCN)11** a tout d'abord été décrit comme un polymorphisme, c'est-à-dire un allèle présent dans plus de 1% de la population générale mais n'étant pas pathologique. En 1998, il a été suggéré que le phénotype plus sévère observé dans 20% des patients ayant un allèle dominant (GCN)12 à 17 était due à la présence d'un allèle (GCN)11 jouant le rôle de polymorphisme modificateur (Brais, 1998). Ce type de mutation homozygote représenté par deux allèles différents est appelé hétérozygote composite. L'allèle (GCN)11 a également été proposé comme responsable d'un phénotype autosomique récessif où les patients homozygotes portant 2 allèles (GCN)11 présentaient la maladie tardivement et avaient un phénotype moyen (Garibaldi et al., 2015; Semmler et al., 2007; Brais et al., 1998). Récemment, un patient présentant une forme typique de l'OPMD et portant l'allèle (GCN)11 comme unique allèle dominant a été identifié (Richard et al., 2015). Une étude récente uniformise les précédentes en montrant qu'un allèle (GCN)11 à l'état hétérozygote traduit un phénotype mineur mais typique de la maladie et confirme qu'à l'état homozygote, cet allèle joue le rôle d'allèle modificateur aggravant (Richard et al., 2017).

Dans la majorité des cas, l'OPMD présente une transmission autosomique dominante mais certains patients portent des **mutations homozygotes** (Blumen et al., 1999). Les patients au génotype homozygote décrits sont rares et sur une cohorte de 354 patients français 2,5% sont (GCN)11-11 ; 0,6% sont (GCN)12-12 et 0,6% sont (GCN)13-13 (Richard et al., 2017).

Etudes de corrélation entre génotypes/phénotypes:

Plusieurs études se sont attardées sur le potentiel lien entre la taille de l'expansion et la sévérité de la maladie. En effet, dans plusieurs maladies à expansion de triplets comme la dystrophie cornéenne de fuchs (Soliman et al., 2015), la dystrophie myotonique de type 1

(Yum et al., 2017) ou l'ataxie de Friedreich (Alper and Narayanan, 2003), une nette corrélation entre la taille de l'expansion dans le gène responsable de la maladie et la sévérité de cette dernière a été établie. Dans l'OPMD, la relation entre génotype et phénotype a été mise en évidence par l'observation de patients hétérozygotes composites (GCN)11-13 au phénotype plus sévère que les patients hétérozygotes (GCN)13 ou homozygotes (GCN)11-11 (Brais, 1998; Hebbar et al., 2007). Des études sur des cohortes allant de 17 à 102 patients ayant exploré le lien entre génotype et phénotype ont conclues : soit à une tendance vers une corrélation entre taille de l'expansion et phénotype (Cruz-Aguilar et al., 2017; Mirabella et al., 2000) soit à une absence de corrélation entre les deux (de Leeuw et al., 2018; Müller et al., 2001; Shan et al., 2014; Tondo et al., 2012). Cependant, une étude sur une large cohorte de 354 patients français non-apparentés a permis de mettre en évidence que les manifestations cliniques (dysphagie, ptosis, faiblesse proximale) et le niveau de créatine kinase (enzyme libérée dans le sang lors de lésions tissulaires) étaient en moyenne plus élevés chez les patients portant la plus grande expansion dans *PABPN1* (Richard et al., 2017) (**figure 8**). Cette observation est supportée par le rapport de deux patients de génotype (GCN)18 au phénotype très sévère, à l'âge d'apparition précoce et présentant des troubles psychologiques (Jouan et al., 2014). Enfin, la description de cas homozygotes (GCN)13-13 ayant un phénotype sévère (Blumen et al., 1996, 1999; Brais et al., 1995b) par opposition aux patients homozygotes (GCN)11-11 peu atteints (Garibaldi et al., 2015; Richard et al., 2017; Semmler et al., 2007) appuie d'autant plus la corrélation génotype/phénotype et suggère un effet dose de la mutation.

| Genotype | N | Age at diagnosis [Years ± SD] | CK (U/L) | Clinical symptoms | | | |
|---------------------|-----|----------------------------------|--------------|---------------------|-----------|-------------------|----------------------|
| | | | | Ptosis | Dysphagia | Proximal Weakness | Cognitive Impairment |
| Heterozygous | | | | | | | |
| (GCN)10/(GCN)11 | 6 | 72±11 | <100 | +/- | + | Late | No |
| (GCN)10/(GCN)12 | 33 | 73±10 | <100 | +/- | + | Late | No |
| (GCN)10/(GCN)13 | 176 | 64±10 | <100 | + | + | Late | |
| (GCN)10/(GCN)14 | 55 | 61±8 | <300 | + | + | | |
| (GCN)10/(GCN)15 | 56 | 60±10 | [300-500] | + / Diplopia | | Yes | No |
| (GCN)10/(GCN)16 | 4 | 51±6 | [500-1000] | + / Facial weakness | ++ | Yes/ wheelchair | No |
| (GCN)10/(GCN)17 | 2 | 53±4 | [700-1000] | ++ | +++ | Yes | |
| Compound | | | | | | | |
| Heterozygous | | | | | | | |
| (GCN)11/(GCN)12 | 9 | 58±11 | [300-600] | + | + | Yes | No |
| Homozygous | | | | | | | |
| (GCN)11/(GCN)11 | 9 | 73±7 | [<100 – 500] | + | + | Yes | No |
| (GCN)12/(GCN)12 | 2 | 49±1 | [300-500] | ++ | ++ | Yes | No |
| (GCN)13/(GCN)13 | 2 | 37±9 | [300-700] | +++ | ++ | Yes | No |

N: number of patients; SD: standard deviation; CK: creatine kinase (normal value <100U/L)

Figure 8: Phénotypes cliniques observés chez les patients OPMD

Chez les patients hétérozygotes, plus la taille de la mutation est grande, plus les symptômes cliniques sont sévères. Abréviations : CK : créatine kinase (niveau normal <100 U/L) ; ± : inconstant ; + : moyennement présent ; ++ : présent ; +++ : sévère. Adapté de (Richard *et al.* 2017)

Etudes de corrélation âge/phénotype :

Il a été montré à partir de 17 patients OPMD que sans tenir compte du génotype, les patients présentant des faiblesses des membres des ceintures avaient en moyenne 73 ans alors que ceux qui n'en avaient pas avaient 61 ans en moyenne (Müller *et al.*, 2001). Dans la même lignée, il a été montré que la sévérité de la faiblesse musculaire, du ptosis et de la dysphagie corrélaient statistiquement avec l'âge des patients (de Leeuw *et al.*, 2018).

Etudes de corrélation âge/génotype :

Plusieurs études ont suggéré que l'OPMD était une maladie sous-diagnostiquée en raison de sa rareté dans certaines régions comme en Asie (Chien, 2012) ou en Suisse (Rüegg *et al.*, 2005) mais aussi parce qu'elle peut facilement être confondue avec une myopathie mitochondriale (Richard *et al.*, 2017). De plus, la dysphagie et le ptosis sont des manifestations cliniques classiquement liées à l'âge (Aslam and Vaezi, 2013).

Une étude sur 354 patients OPMD montre qu'au sein d'un même génotype, l'âge du diagnostic est très hétérogène (écart type sur la moyenne allant de 1 à 11 ans). Cependant il a été montré qu'il y avait une corrélation négative entre l'âge moyen du diagnostic et la taille de répétition : l'âge moyen du diagnostic passe de 72 ans pour un génotype (GCN)11 à 53 ans pour un génotype (GCN)17 (**figure 9**). Cette observation confirme une étude effectuée sur 31 patients anglais qui avait montré une tendance vers une corrélation entre l'âge d'apparition de la maladie et le génotype des patients (Hill et al., 2001).

Ces études de corrélation permettent donc de mieux comprendre la maladie cependant elles doivent bien sur être manipulées avec précaution. En effet, compte-tenu de l'hétérogénéité évidente de l'âge du diagnostic et des symptômes des patients OPMD, elles n'ont pas pour objectif de servir d'outils diagnostics.

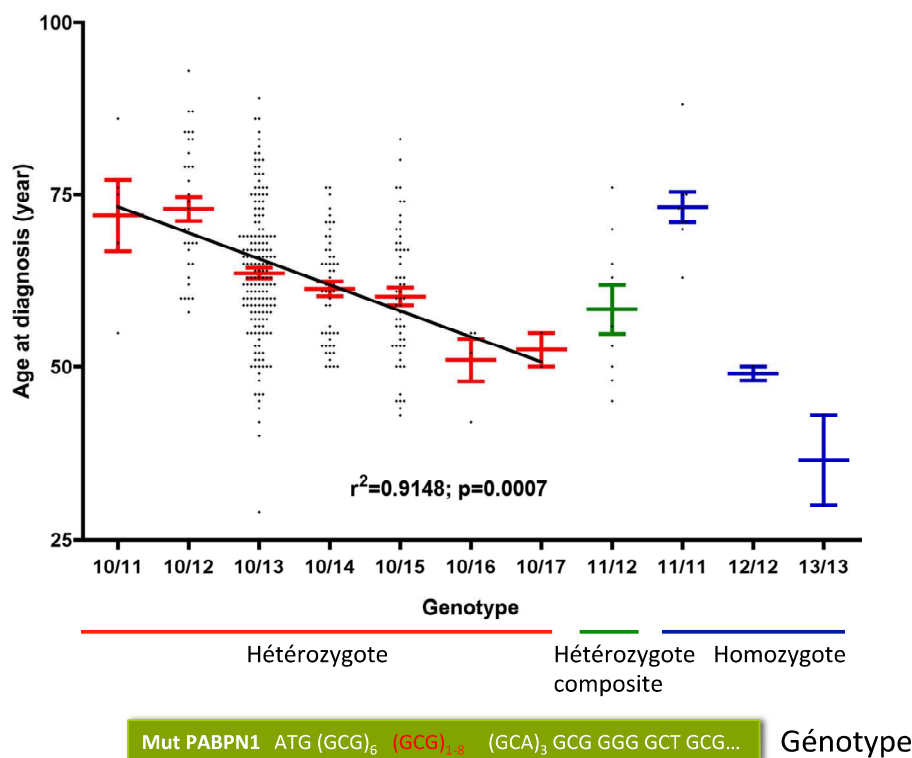


Figure 9: Corrélation entre l'âge du diagnostic et le génotype chez les patients OPMD

Corrélation négative significative entre l'âge moyen du diagnostic et le nombre de répétitions chez des patients OPMD hétérozygotes. La même tendance est observée pour les patients hétérozygotes composites et homozygotes. Chaque patient est représenté par un point noir. Adapté de Richard et al. 2017

2) Les maladies à expansion de triplets

2.a) Généralités

Les maladies à expansions correspondent à des maladies où des séquences microsatellites du génome sont anormalement répétées. Jusqu'à aujourd'hui, 26 maladies neurodégénératives et neuromusculaires ont été décrites allant de maladies congénitales comme la maladie de l'X fragile à des maladies à apparition tardive comme la maladie de Huntington. Les expansions aboutissant à ces maladies peuvent se situer dans des parties non codantes (5'UTR, 3'UTR ou introns) ou dans les régions codantes du gène qu'elles affectent (**figure 10**).

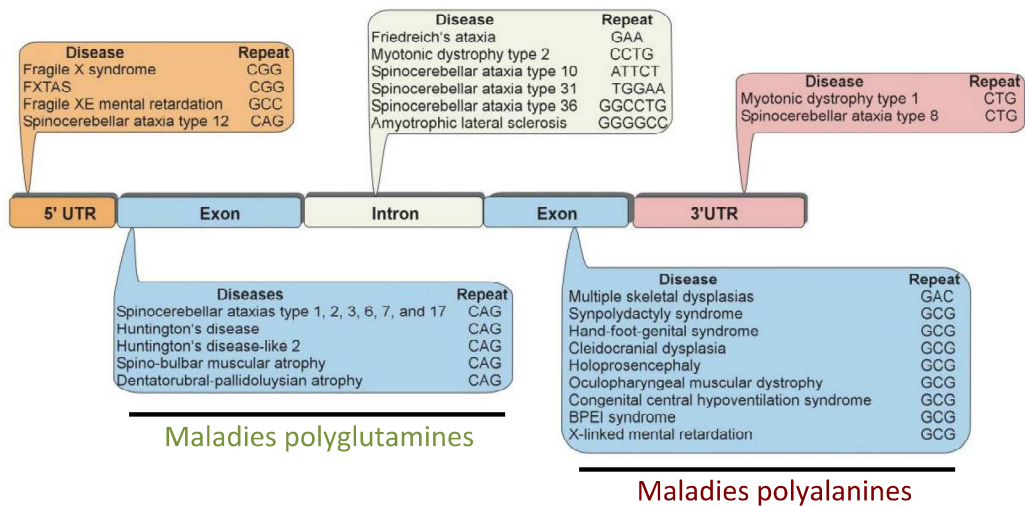


Figure 10: Maladies à expansions de triplets

Adapté de (Polak et al., 2013)

Lorsqu'elles ont lieu dans des régions non codantes, les expansions peuvent par exemple aboutir à la formation d'**ARN toxique**, comme c'est le cas dans la dystrophie myotonique de type 1 (DM1). Dans cette maladie, une expansion de 50 à 3000 triplets CTG est retrouvée dans la région 3'UTR du gène *DMPK* (Myotonin-protein kinase) contenant normalement 37 répétitions au maximum. Ceci aboutit à la production d'un ARN mutant qui n'est pas exporté dans le cytoplasme mais qui est retenu dans le noyau sous forme de *foci* (Thornton, 2014). La protéine MBNL qui se lie avec affinité aux ARN à répétition CUG régule l'épissage d'une centaine de gènes. Dans le cas de la DM1, MBNL est capturée dans les *foci* et ne peut plus épisser correctement ses ARN cibles. Ceci aboutit à des défauts d'épissage dans de nombreux transcrits importants dans le muscle comme le transcrit BIN1

impliqué dans la biogenèse des tubules T (Fugier et al., 2011), la dystrophine ou le récepteur à l'insuline. Il a été proposé que ces défauts d'épissage étaient en partie responsables des défauts musculaires associés à la DM1 (Thornton, 2014).

Le même type de mécanisme est proposé dans l'ataxie spinocerebelleuse de type 8 (SCA8) où le gène *ATXN8* possède également une expansion de triplets CTG dans la partie 3' non traduite (3' UTR) du gène (Tan et al., 2012). Le syndrome de l'X-fragile est un autre exemple de maladie où une expansion du triplet CGG (de 50 à plus de 200) dans la partie 5'UTR du gène *FRM1* aboutit à une **extinction épigénétique** du gène par méthylation de l'ADN. Dans ce cas, la protéine FRM1 est soit absente, soit déficiente ce qui aboutit à la dérégulation de nombreux ARNm dans les neurones synaptiques (Hagerman et al., 2017).

Lorsqu'elles ont lieu dans des régions codantes du génome, les maladies à expansions peuvent être divisées en deux grandes catégories : les maladies à expansions de triplets polyglutamine (polyQ) ou les mutations à expansions de triplets polyalanine (polyAla) (**figure 9**).

Les maladies à expansions polyQ correspondent à un groupe de maladies neurodégénératives causées par des répétitions du triplet (CAG). Jusqu'à aujourd'hui, 9 maladies de ce type ont été décrites : six ataxies spinocerebelleuses de type 1,2,6,7 et 17, la maladie de Joseph Macado (MJD/SCA3), la maladie de Huntington (HD), l'atrophie dentato-rubro-pallido-luysienne (DRPLA) et l'atrophie musculaire spinale bulbaire de type 1 liée à l'X (SMA1/SBMA). Ces maladies sont autosomiques dominantes sauf pour SBMA liée au chromosome X.

Les maladies à expansions polyAla correspondent à un groupe de maladies neurodégénératives caractérisées par des répétitions du triplet (GCN). Neuf maladies sont également décrites : le syndrome synpolydactyle (SPD) ; le syndrome main-pied-utérus (FGS), la dysplasie cleidocraniale (CCD); l'holoprosencéphalie (HPE), le retard mental lié à l'X et déficitaire en hormone de croissance (XLMR+GHD), le retard mental lié à l'X avec anomalies génitales (XLAG), le syndrome congénitale d'hypoventilation central (CCHS), le syndrome Blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus (BPEIS) et la dystrophie musculaire oculopharyngée (OPMD).

2.b) Comparaison des maladies polyAla et polyQ

Les maladies polyAla et polyQ sont représentées par une expansion du triplet (GCN) et (GCA) respectivement dans des parties codantes du génome. Ces maladies sont comparées dans le **tableau 1**.

La différence majeure entre les maladies polyalanine et polyglutamine est la taille minimale de l'expansion pathologique. En effet, pour les maladies polyQ, la taille minimale pathologique se situe autour des 35-40 résidus (Fan et al., 2014) alors que pour les maladies polyalanine, elle se situe entre 11 et 26 résidus (voir tableau 2). Dans les maladies polyQ, la forte instabilité génétique de ces expansions entraîne une augmentation de leur taille au cours des générations et de la division cellulaire. Ce phénomène connu sous le nom « d'anticipation » explique l'apparition progressive de la maladie dans la famille. Le mécanisme proposé correspond à un « **glissement** » de la **polymérase lors de la transcription** confondant le nombre de résidus glutamine à retranscrire aboutissant à des cellules filles contenant une extension polyglutamine (Amiel et al., 2004).

En 1997, Warren est le premier à proposer un **mécanisme de recombinaison homologue inégale** pour expliquer l'expansion polyalanine dans le gène *HOXD13*. En effet, en phase de méiose où a lieu la recombinaison homologue, une partie de la répétition d'alanines d'un brin d'ADN serait transférée de manière inégale sur l'autre brin (Warren, 1997). Plusieurs arguments sont avancés pour soutenir cette hypothèse : 1/ quasiment toutes les mutations polyAla sont des duplications en phase sans décalage du cadre de lecture, 2/ les mutations sont mitotiquement et meiotiquement stables au cours des générations au moins pour le syndrome synpolydactyle (SPD), le syndrome main-pied-utérus (FGS), le syndrome congénitale d'hypoventilation central (CCHS) et l'OPMD, 3/ des contractions (inverse de l'expansion sur l'autre allèle) d'alanines sont observées comme polymorphisme dans plusieurs gènes dont l'expansion d'alanine aboutit à une maladie (*PHOX2B*, *ARX*, *RUNX2*)(Amiel et al., 2004), 4/ la recombinaison homologue est un événement rare pouvant expliquer la stabilité de la mutation au cours des générations (Nakamoto et al., 2002). Cependant, l'observation des génotypes de 86 patients OPMD montre dans certains cas la présence de triplet (GCA) au milieu de la séquence (GCG) (Robinson et al., 2005). Pour certaines de ces mutations, le mécanisme de recombinaison homologue seul n'est pas suffisant pour expliquer le génotype. Il a alors été proposé que ces génotypes pouvait provenir d'une **combinaison entre un glissement de la polymérase et une recombinaison homologue inégale**. De la même manière, plusieurs mutations dans le gène *PHOX2B*

aboutissant au syndrome congénitale d'hypoventilation central (CCHS) ne pouvant pas s'expliquer par des événements de recombinaison homologue supportent ce mécanisme (Trochet et al., 2005).

Bien que l'OPMD soit une maladie à expansion polyalanine, elle se distingue des 8 autres pathologies sur plusieurs points : 1/ seul *PABPN1* code une protéine de liaison à l'ARN, tous les autres gènes codent des facteurs de transcription ; 2/ les atteintes dans l'OPMD sont majoritairement musculaires alors qu'elles sont majoritairement neurologiques dans les autres maladies ; 3/ l'âge d'apparition est tardif dans l'OPMD, comme dans la majorité des maladies polyglutamine alors que les autres maladies polyalanine sont congénitales.

Le seul point commun à l'ensemble des maladies polyAla et polyQ est la capacité des protéines mutées à former des agrégats nucléaires ou cytoplasmiques. En particulier, les agrégats nucléaires retrouvés dans les myonuclei des patients OPMD sont le marqueur histopathologie de la maladie et seront largement décrits dans la partie IV.

MALADIES POLYALANINE

| Maladie | Gène | Taille répétition | Age d'apparition | Symptômes | Corrélation | Agrégats |
|---|---------------|---------------------------|----------------------|---|--------------------------------------|----------------|
| Syndrome synpolydactyle (SPD) | <i>HOXD13</i> | 15 -> 22-29 | Congénital | Fusion ou multiplication des extrémités | G/P ¹ | Cyto* |
| Dysplasie cleidocraniale (CCD) | <i>RUNX2</i> | 17 -> 27 | Congénital | Hypoplasie/aplasie de la clavicule ; persistance des fontanelles ; anomalies dentaires | G/P ² | NA |
| Dystrophie musculaire oculopharyngée (OPMD) | <i>PABPN1</i> | 10 ->11-18 | Tardif (env. 50 ans) | Dysphagie ; ptosis ; faiblesse musculaire proximal | G/P ³ A/G ³ | Noyau |
| Holoprosencéphalie (HPE) | <i>ZIC2</i> | 15 -> 25 | Congénital | Défaut de clivage du prosencéphale ; manifestations neurologiques et anomalies faciales | G/P ⁴ | Non |
| Retard mental lié à l'X et déficitaire en hormone de croissance (XLMR+GHD) | <i>SOX3</i> | 15 -> 26 | congénital | Retard mental, anomalies facies, nanisme | NA | Cyto* |
| Retard mental lié à l'X avec anomalies génitales (XLAG) | <i>ARX</i> | 16 ->18 or 23 12 -> 20 | congénital | Syndrome neurologique sévère | NA | Cyto* |
| Syndrome congénitale d'hypoventilation central (CCHS) | <i>PHOX2B</i> | 20 -> 25-29 | congénital | Atteinte système nerveux ; absence du contrôle de la respiration | G/P ⁵ | Cyto et noyau* |
| Syndrome Blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus (BPEIS) | <i>FOXL2</i> | 14 -> 22-24 | congénital | Trouble ophtalmologique | G/P ⁶ | Cyto et noyau* |
| Syndrome main-pied-utérus (FGS) | <i>HOXA13</i> | 18 -> 24 ou 26 | congénital | Pouces/orteils petits ; fusion des extrémités ; anomalies génitales | NA | Cyto* |

MALADIES POLYGLUTAMINE

| | | | | | | |
|---|---------------|-------------------|---|--|--|---------------|
| Ataxie spinocerebelleuse de type 1 (SCA1) | <i>ATXN1</i> | 27-36->39-82 | 30 ans | Ataxie, dysarthrie, défauts cognitifs et moteurs | G/A ⁷ G/P ⁷ | Noyau |
| Ataxie spinocerebelleuse de type 2 (SCA2) | <i>ATXN2</i> | 15-32->33-64 | 2-65 ans | Ataxies, détérioration mentale, parkinsonisme | A/P ⁷ G/A ⁷ G/P ⁷ | Noyau |
| Ataxie spinocerebelleuse de type 6 (SCA6) | <i>CACNA1</i> | 8-14->20-33 | 20-30 ans | Ataxie, dysarthrie, défauts oculomoteurs | G/A ⁷ G/P ⁷ | Cyto |
| Ataxie spinocerebelleuse de type 7 (SCA7) | <i>ATXN7</i> | 7-35->38-200 | 0-50/60 ans | Ataxie, dégénérescence rétinienne, dysphagie | G/A ⁷ G/P ⁷ | Noyau |
| Ataxie spinocerebelleuse de type 17 (SCA17) | <i>TBP</i> | 29-42->50-63 | 3-55 ans | Ataxie, déclin cognitif, démence | G/P ⁸ A/G ⁸ | Noyau |
| Maladie de Joseph Macado (MJD/SCA3) | <i>ATXN3</i> | 12-43->52-86 | 5-75 ans | Ataxie, dysphonie, parkinsonisme | G/P ⁹ G/A ⁷ | Noyau |
| Maladie de Huntington (HD) | <i>HHT</i> | 6-35-> >40 | Tardif (30-50 ans) | Chorée, dysphonie, défauts cognitifs et psychiatriques | G/P ¹⁰ A/G ¹¹ | Noyau et cyto |
| Atrophie dentato-rubro-pallido-luysienne (DRPLA) | <i>ATN1</i> | 7-34 ->49 et plus | Juvenile : 1-20 ans adulte : entre 20 et 40 ans tardif : après 40 ans | Ataxie, Epilepsie, démence | G/P ¹² | Noyau |

Tableau 1: Maladies polyalanine vs maladies polyglutamine

La taille de la répétition est représentée comme le nombre de répétitions chez individus sains -> nombre de répétitions chez les patients

Corrélation : G : génotype ou taille de l'expansion ; P : phénotype ; A : âge d'apparition

NA : Données non connues ;

* : Les agrégats ont été identifiés dans des modèles *in vivo* ou *in vitro* mais pas sur des échantillons de patients (Shoubridge and Gecz, 2013). Les études de corrélations réalisées dans les différentes maladies sont numérotées dans le tableau et correspondent aux références suivantes :

^{1.} (Goodman et al., 1997)

^{7.} (Toyoshima and Takahashi, 2018)

^{2.} (Jaruga et al., 2016)

^{8.} (Maciel et al., 1995)

^{3.} (Richard et al., 2017)

^{9.} (Sun et al., 2017)

^{3.} (Keaton et al., 2011)

^{10.} (Stine et al., 1993)

^{4.} (Parodi et al., 2010)

^{11.} (Ikeuchi et al., 1995)

^{5.} (De Baere et al., 2001)

^{12.} (Suzuki et al., 2008)

^{6.} (Rüb et al., 2013)

^{13.} (La Spada et al., 1991)

III. Structure, localisation et fonctions de PABPN1

1) Structure

1.a) Structure du gène

Le gène *PABPN1* pour « poly(A) binding protein nuclear 1 » initialement nommé *PABII* (Nemeth et al., 1995) puis *PABP2* (Brais, 1998) est situé sur le chromosome 14, en position 14q11 (Brais, 1998; Brais et al., 1995a). La séquence du gène humain a été déterminée par séquençage en se basant sur celle du gène *PABPN1* bovin déjà connue. Le gène est d'environ 6000 paires de bases, est composé de 7 exons, de 6 introns et des régions non traduites en 3' et 5' (3' et 5' UTR). La transcription se fait selon l'orientation centromère vers télomère (Brais, 1998).

Depuis la découverte du gène, l'étude des transcrits par Northern Blot sur différents modèles a permis d'identifier deux types de transcrits alternatifs:

1/ Les transcrits retenant des introns : avec l'aide des données générées par les marqueurs de séquences exprimées (ESTs pour expressed sequence tag), il a été observé que 60 % des transcrits de *PABPN1* humain et bovin renaient les introns 1 et 6 (Brais, 1998; Nemeth et al., 1995). D'un autre côté, l'étude de l'ARNm de *PABPN1* sur des cellules humaines non musculaires montre également 2 transcrits alternatifs de 1,5 et 3,5 kb mais retenant plutôt les introns 2 et 6 (Corbeil-Girard et al., 2005). Enfin, sur des cellules HEK293T il a été montré que *PABPN1* renaient également les introns 2 et 6 (Bergeron et al., 2015).

2/ Les transcrits issus d'une polyadénylation alternative de la partie 3'UTR:

L'étude de l'expression de *PABPN1* sur tissu de souris révèle 2 transcrits : un de 2,1kb particulièrement faible dans le muscle et un de 1,4 kb prédominant dans les testicules (Apponi et al., 2013a; Lee et al., 1998).

Afin de comprendre la régulation de l'expression des transcrits de *PABPN1*, plusieurs études se sont penchées sur la structure de la partie 3'UTR qui régule la stabilité, l'export, la localisation et la traduction des ARNm (Matoulkova et al., 2012).

Cette partie contient notamment le signal canonique de polyadénylation (PAS) caractérisé par le motif AAUAAA et indispensable au clivage en 3' et à la polyadénylation des pré-ARNm (Proudfoot, 2011). Un premier PAS au motif classique AAUAAA situé à 849 bp du codon stop a été identifié et est utilisé pour générer un transcrit de 2,1kb. Un autre PAS putatif au motif ATTAAA situé à 66bp du codon stop identifié par une expérience de protection à la RNase (RNA protection assay) justifie la présence d'un transcrit de 1,4kb (Apponi et al., 2013a; Lee et al., 1998).

Il a été montré dès 1998 que la partie 3'UTR de l'ARNm de *PABPN1* contenait un élément déstabilisant riche en AU (ARE) (Lee et al., 1998). Ces séquences sont généralement représentées par le pentamère « AUUUA » et sont divisées en 3 classes : la classe I ne contenant qu'un seul motif AUUUA, la classe II en contenant plusieurs et la classes III contenant un motif « GUUUG ». Ces ARE sont reconnues par un groupe bien identifié de protéines de liaison à l'ARN : NF90, HUR, TTP, AUF1, KSRP et BRF1 dont la fixation aboutira soit à la stabilisation soit à la déstabilisation du transcrit (Matoulkova et al., 2012).

Dans le cas de *PABPN1* 4 ARE ont été identifiées : un ARE de classe I situé juste après le PAS1 et 3 AREs de classe III situés entre le PAS1 et le PAS2 (Phillips et al., 2018) (**figure 11**).

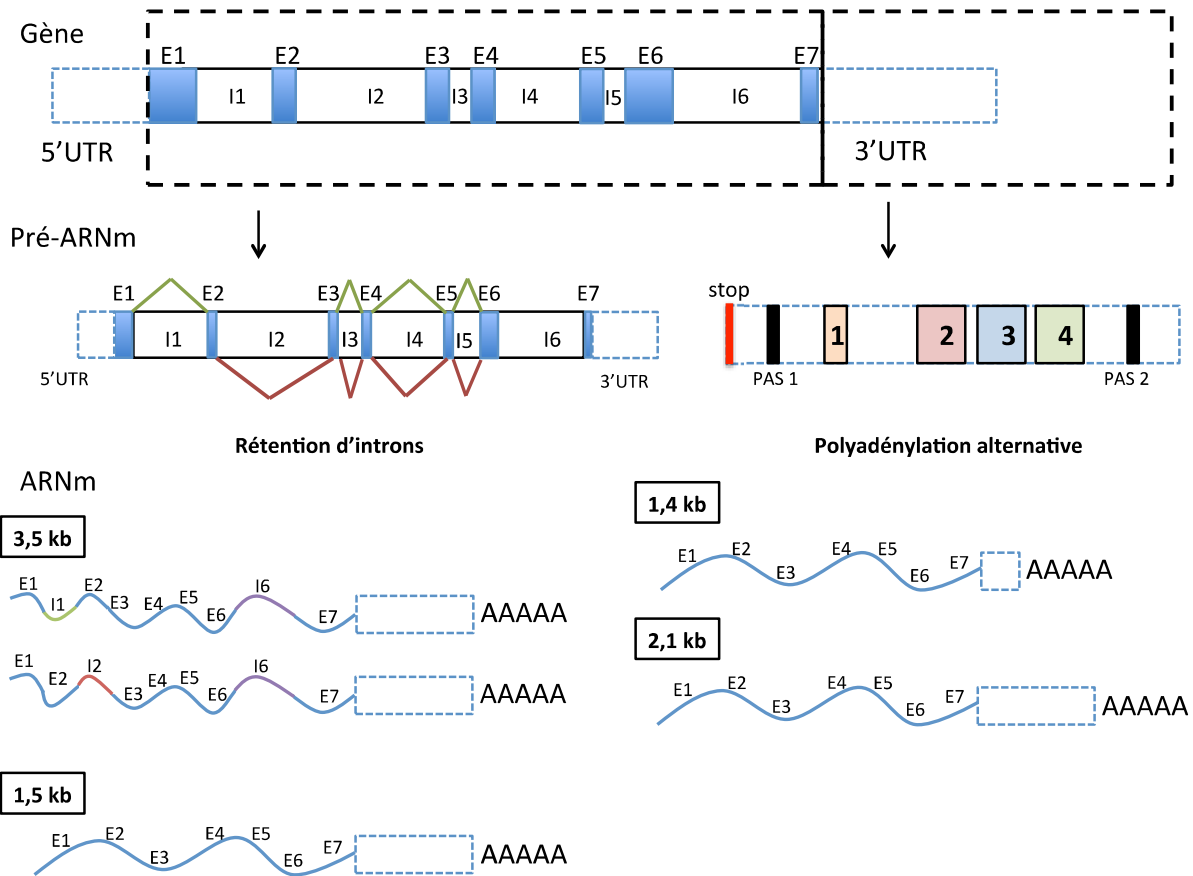


Figure 11: Structure du gène *PABPN1* et de ses transcrits

E1 à E7 : exons 1 à 7, I1 à I6 : Introns 1 à 6 ; PAS : signal de polyadénylation

Les boîtes colorées numérotées de 1 à 4 dans la partie 3' du pré-ARNm correspondent aux domaines ARE1 à ARE4.

Transcrits retenant les introns 1 et 6 suivant [Brais et al. 1998](#) ; les introns 2 et 6 suivant [Bergeron et al. 2015](#) et [Corbeil-Girard et al. 2005](#)

Transcrits issus de polyadénylation alternative suivant [Apponi et al. 2013](#) et [Lee et al. 1998](#)

Structure de la partie 3'UTR suivant [Philipps et al. 2018](#)

1.b) Régulation des transcrits de *PABPN1*

PABPN1 est un gène ubiquitaire pourtant son expression est bien plus faible dans le muscle que dans les autres tissus. En bloquant la transcription avec de l'actinomycine D dans du muscle et du rein de souris, il a été montré que la demi-vie de l'ARN musculaire était bien plus courte que celle de l'ARN rénale (2,3h contre plus de 6h) ce qui suggère que l'instabilité de l'ARN dans le muscle est à l'origine de sa faible expression ([Apponi et al., 2013a](#)). De plus, il a été montré chez l'homme que le niveau de transcrit *PABPN1* diminuait dans le muscle avec l'âge alors que ceci n'est pas le cas dans le sang, les glandes parotides, et le rein ([Anvar et al., 2013](#)). Au niveau protéique, il a été montré chez la souris et chez l'homme que

l'expression de PABPN1 est également bien plus faible dans le muscle que dans les autres tissus (**figure 12 A-C**). De plus, il a été montré chez la souris que dans les muscles d'origine craniofaciale (muscle masséter, de la langue et du pharynx), la protéine était encore moins exprimée que dans les autres muscles (**figure 12B**). Par ailleurs, il est particulièrement intéressant de noter que dans le cerveau, qui est également un tissu post-mitotique, le niveau de PABPN1 est très élevé (**figure 12B-C**) ([Apponi et al., 2013a](#)).

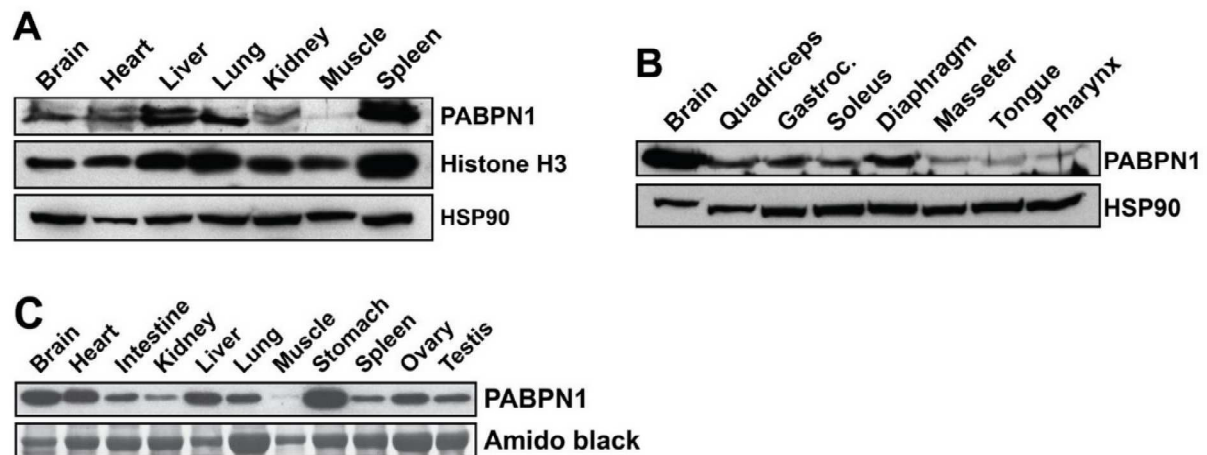


Figure 12: Le niveau d'expression de PABPN1 est faible dans le muscle

Niveau protéique de PABPN1 évalué dans différents organes chez la souris (A-B) et chez l'homme (C). [Apponi et al. 2013](#)

Les connaissances actuelles sur la régulation de l'expression du gène *PABPN1* ne permettent pas d'expliquer pourquoi son niveau est plus faible dans le muscle que dans les autres tissus. Cependant des études récentes proposent des modèles de régulation du gène *in vitro* qui restent à démontrer à la fois dans le muscle et *in vivo*:

1. Afin de comprendre la régulation de l'expression de *PABPN1* dans le muscle, des constructions 3'UTR-luciférase individuellement délétées d'un des 4 AREs ont été transfectées dans des C2C12. L'activité luciférase est augmentée de 25% lorsque ARE3 est muté et de 15% lorsque ARE4 est mutée ([Phillips et al., 2018](#)). Par CLIP-seq, il a alors été montré que la protéine de liaison à l'ARN HUR se fixait au niveau de ARE4 et régula négativement son expression dans les myotubes C2C12 et dans les muscles de souris ([Phillips et al., 2018](#)).

2. Une autre étude effectuée sur un modèle non musculaire montre que PABPN1 peut produire un transcrit circulaire nommé *circPABPN1* qui correspond à une circularisation de l'exon 6. Les ARN circulaires ont été identifiés par des études de RNA-seq et sont créés par

un mécanisme d'épissage où le site donneur en aval d'un exon fait une liaison covalente avec le site accepteur en amont du même exon (Barrett and Salzman, 2016). Bien que les fonctions et caractéristiques de cet ARN circulaire ne soient pas du tout connues pour PABPN1, il a été montré par immunoprécipitation sur RBP (RIP) sur des cellules HeLa que la protéine de liaison à l'ARN HUR se fixait à *circPABPN1* mais sans en affecter son expression. Cependant, **la surexpression de circPABPN1 dans les cellules HeLa empêche la fixation de HUR à certaines de ces cibles dont l'ARNm de PABPN1** et, contrairement à l'étude précédente, ceci a pour conséquence de diminuer la traduction de PABPN1 (Abdelmohsen et al., 2017).

3. Enfin il a été montré **sur cellule HeLa que PABPN1 était capable de s'autoréguler en induisant la dégradation de son propre pré-ARNm** : la surexpression de la protéine PABPN1 dans des HeLa entraîne une diminution du ratio épissé/non épissé de son propre ARN avec le transcrite non épissé retenant l'intron 6. En utilisant un minigène ne contenant qu'un bout de l'exon 6, l'intron 6 et l'exon 7, il a été montré que cette partie 3' de l'ARN de PABPN1 et en particulier l'intron 6 était indispensable à l'autorégulation du gène (Bergeron et al., 2015). En utilisant la technique de retard sur gel (EMSA pour electrophoretic mobility shift assay), les auteurs montrent que la protéine PABPN1 régule l'expression de son propre gène en se fixant sur ARE1 ce qui favorise l'expression de la forme non-épissé de PABPN1. Ceci entraîne sa dégradation et donc la diminution des transcrits de PABPN1.

1.c) Structure de la protéine

La protéine est composée de 306 acides aminés et possède une masse de 32,8 kDa (Lee et al., 1998) bien qu'elle soit observée sur gel dénaturant plutôt autour des 49 kDa (Wahle, 1991). En condition native, la protéine existe à l'équilibre sous forme de monomères, dimères et oligomères. Structurellement, la protéine est divisée en trois domaines majeurs. La fonction de chacun de ces domaines a été déterminée par mutagenèse dirigée contre la protéine :

Le domaine N-terminal (acides aminés 1 à 146) contient le stretch d'alanine et une région nécessaire à la fixation de la poly(A) polymérase (PAP) nommée région « coil-coiled » (Kerwitz et al., 2003). Cette région est prédite à faible complexité en condition native c'est à dire qu'elle ne se replie pas suivant une structure tertiaire spécifique.

Le domaine RRM (acides aminés 161 à 257) pour « RNA recognition motif » possède une haute affinité de liaison aux ARN polyA (Kühn et al., 2003). Ce domaine possède une structure tertiaire précise composée de 4 feuillets β et deux hélices α (Ge et al., 2008).

Le domaine C-terminal (acides aminés 257 à 306) contient un signal de localisation nucléaire (NLS) (Kerwitz et al., 2003; Kühn et al., 2003) et 13 résidus arginine asymétriquement déméthylés impliqués dans le transport de la protéine (Fronz et al., 2011) (figure 13).

Ces 3 domaines sont très bien conservés entre les espèces et les études de phylogénie ont montré plus de 90% de similarité entre la protéine humaine et les protéines bovines et murines (Banerjee et al., 2013). L'analyse structurale de ces différents domaines révèle qu'à l'exception du domaine RRM, l'ensemble de la protéine ne contient pas de structure tertiaire particulière en condition physiologique (Tavanez et al., 2009). Cette propriété confère à la protéine un désordre intrinsèque unique qui permet aux protéines d'être très dynamiques et impliquées dans différentes fonctions en même temps (Uversky et al., 2008).

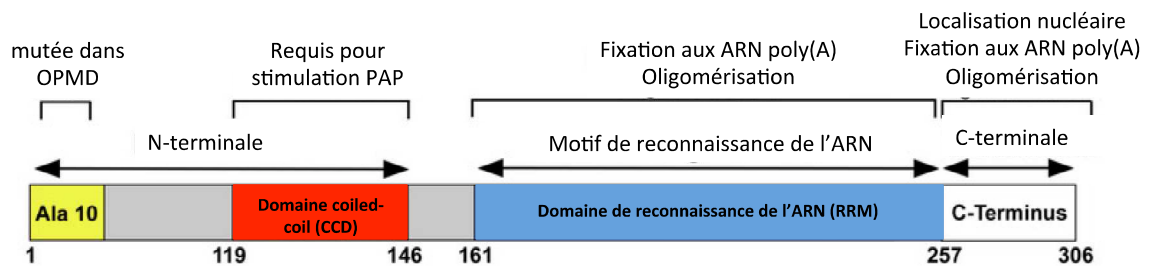


Figure 13: Structure de la protéine PABPN1

Trois domaines composent la protéine : le domaine N-terminal contenant le stretch d'alanine et un domaine « coiled-coil » permettant la stimulation de la PAP ; le domaine « RRM » de fixation aux ARN et le domaine C-terminal contenant le signal de localisation nucléaire (NLS)

Adapté de Banerjee et al. 2013

1.d) Localisation

La protéine PABPN1 est localisée au niveau des « speckles » nucléaires qui sont des structures sans membranes essentielles à l'assemblage, au stockage et au recyclage des facteurs de maturation des pré-ARNm ainsi qu'à leurs modifications post-transcriptionnelles (Hall et al., 2006). *In vitro*, il a été montré que la localisation de PABPN1 dans ces speckles était dépendante des ARN poly(A) sur lesquels elle se fixe car une mutation dans son hélice alpha, empêchant la stimulation de la PAP ou dans le domaine de fixation à l'ARN entraîne une répartition diffuse de la protéine dans le nucléoplasme (Messaed et al., 2007). Bien

qu'elle soit majoritairement nucléaire, il a été montré grâce à des études d'hétérocaryons que PABPN1 était capable de circuler du noyau au cytoplasme et inversement : en fusionnant une cellule humaine (Hela) à une cellule de drosophile (SL2), la protéine PABPN1 humaine se retrouve dans le noyau de cellule SL2 en l'absence de synthèse protéique. Ceci suggère que la protéine PABPN1, présente dans le noyau humain, est capable de diffuser dans le cytoplasme pour rejoindre le noyau de drosophile (Calado et al., 2000a).

Compte tenu de sa petite taille (32,8 kDa), la protéine PABPN1 pourrait transiter du cytoplasme vers le noyau de manière passive en traversant simplement les pores nucléaires. Cependant, il a été démontré que le transport de la protéine dans le noyau dépendait de la fixation à la protéine cargo transportine au niveau du signal NLS de PABPN1. Le transport de PABPN1 est affecté lorsque les arginines situées en C-terminal de la protéine sont méthylées (Fronz et al., 2011). Bien que PABPN1 soit clairement lié au ARNm poly(A), son transport ne dépend pas de leur fixation puisque le traitement de cellules HeLa à l'actinomycine D, bloquant la transcription et donc l'export d'ARN vers le cytoplasme, n'empêche pas le transport de la protéine (Calado et al., 2000a).

Depuis l'étude de Wahle et al. en 1991 (Wahle, 1991) explicitant son rôle dans la polyadénylation des ARN, de nombreuses études ont proposé de nouveaux rôles pour PABPN1. Les différents rôles de la protéine dans le noyau seront détaillés dans le paragraphe suivant :

2) Fonctions

2.a) Rôle dans la polyadénylation des ARNm

La polyadénylation consiste en l'ajout successif de ribonucléotides Adénosine à l'extrémité 3' des ARN. Chez les eucaryotes, cette étape se déroule dans le noyau et est essentielle à la maturation des ARN et à l'initiation de la traduction. La polyadénylation des ARNm se fait lorsque le signal consensus de polyadénylation AAUAAA situé 10 à 30 nucléotides en amont du site de clivage est reconnu par le facteur de polyadénylation CPSF (polyadenylation specificity factor). La poly(A) polymérase (PAP) peut alors enclencher le processus de polyadénylation qui se fait en deux phases : une première addition lente de 10 adénosines dépendante de la fixation de CPSF au PAS puis une seconde, plus rapide, indépendante de CPSF (Sheets and Wickens, 1989). En 1991, Wahle *et al.* identifient

PABPN1 comme second facteur spécifique de la seconde phase de polyadénylation en démontrant son rôle dans la stimulation de la PAP permettant l'élongation indépendante du PAS (Wahle, 1991). Il a été montré que la stimulation de la PAP par PABPN1 correspondait uniquement à son recrutement sur l'ARN cible et non pas à une stimulation catalytique (Kerwitz et al., 2003) et qu'une fois que PABPN1 est fixée à la queue poly(A), toutes les adénosines sont recouvertes de la protéine (Kühn et al., 2003). Le complexe ainsi formé par PAP, CPSF et PABPN1 sur l'ARN cible stabilise ce dernier (Bienroth et al., 1993).

2.b) Contrôle de la taille de la queue poly(A) des ARNm

La taille de la queue poly(A) est très bien contrôlée et peut différer en fonction des espèces. Chez les mammifères, la polyadénylation est complète lorsque environ 250-300 adénosines ont été ajoutées alors que chez la levure *Saccharomyces Cerevisiae*, la taille de la queue poly(A) atteint classiquement 70 à 90 adénosines (Bienroth et al., 1993; Wahle, 1991). Chez les mammifères, lorsque 250 nucléotides ont été ajoutés, la polyadénylation ralentit et le complexe formé par PABPN1, PAP et CPSF contrôle l'ajout supplémentaire d'adénosine. Grâce à des études de polyadénylation *in vitro*, il a été proposé que PABPN1 contrôlait le nombre d'adénosine ajouté à la queue poly(A) par le modèle suivant : une fois les 250 nucléotides ajoutés, PABPN1 déstabilise le complexe PAP/CPSF mais stabilise la fixation de PAP à l'ARN permettant la prolongation de la queue poly(A). Le rôle de PABPN1 dans le contrôle de la taille de la queue poly(A) des ARN a d'abord été confirmé *in vivo* chez la drosophile où une mutation dans le gène *PAB2* (homologue de PABPN1 chez la drosophile) entraîne un raccourcissement de la taille de la queue poly(A) (Benoit et al., 2005). Par la suite, **l'extinction de PABPN1 par ARN interférant** dans des myoblastes de souris montre que l'expression des ARNm avec une longue queue poly(A) diminue de 50% (Figure 14) (Apponi et al., 2010). Cependant une étude similaire réalisée sur cellules HeLa contredit ces résultats en montrant que la déplétion de PABPN1 n'entraîne ni une diminution du niveau de transcrite ni un raccourcissement de la queue poly(A) des ARNm étudiés (Beaulieu et al., 2012). Ces résultats soulignent l'importance d'étudier PABPN1 dans le muscle afin de comprendre son rôle spécifique dans le muscle et quelle fonction de la protéine est altérée dans l'OPMD.

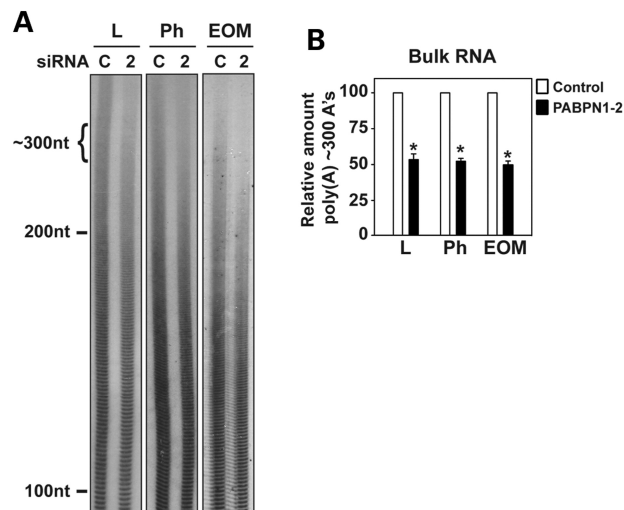


Figure 14: PABPN1 contrôle la taille de la queue poly(A) dans les cellules musculaires

(A) Taille des queues poly(A) des ARN radio-marqués issus de myoblastes primaires de souris provenant de muscles de la patte (L), du pharynx (Ph) et des muscles extraoculaires (EOM) transfectés avec un siRNA dirigé contre PABPN1 (2) ou un siRNA contrôle (C). (B) Quantification du nombre d'ARN radio-marqués ayant une longue queue poly(A) (env. 300nt) et une courte queue poly(A) (env. 100nt). Figure tirée de [Apponi et al. 2010](#)

2.c) Rôle de PABPN1 dans l'export nucléaire

PABPN1 est une protéine majoritairement nucléaire et possède un analogue dans le cytoplasme, PABPC1, impliqué dans la stabilité de l'ARNm ([Afonina et al., 1997](#); [Bernstein et al., 1989](#); [Ford et al., 1997](#); [Wormington et al., 1996](#)) et dans sa traduction ([Craig et al., 1998](#)). Plusieurs études démontrent que l'export nucléaire des ARNm est fortement lié à la queue poly(A) et au processus de polyadénylation ([Huang and Carmichael, 1996](#); [Vinciguerra and Stutz, 2004](#)). En plus de son rôle dans la polyadénylation des ARN, il a été montré que PABPN1 restait associé à l'ARNm au niveau des pores nucléaires ([Bear et al., 2003](#)). Ces éléments ont amené l'hypothèse que, dans les cellules musculaires, PABPN1 pouvait jouer un rôle dans le transport des ARNm du noyau au cytoplasme : par hybridation *in situ* de la queue poly(A) ARNm, il a été montré qu'en l'absence de PABPN1, le transport nucléaire des ARN poly(A) était diminué de moitié et qu'ils s'accumulaient donc dans le noyau (**Figure 15**) ([Apponi et al., 2010](#)).

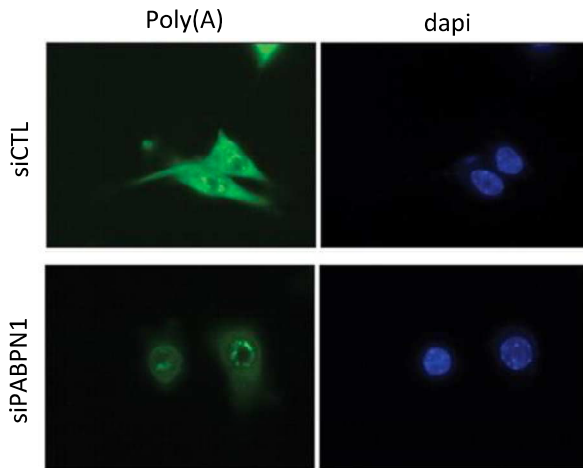


Figure 15: PABPN1 est importante pour le transport des ARNm

Myoblastes murins primaires transfectés avec un ARN interférant contrôle (siCTL) ou dirigé contre PABPN1 (siPABPN1). Le transport des ARN poly(A) est suivi par fluorescence *in situ* (FISH) (Poly(A)). Figure tirée de [Apponi et al. 2010](#)

2.d) Rôle dans le choix du site de polyadénylation

Le clivage et la polyadénylation des ARN sont contrôlés par la fixation des facteurs CPSF et CstF (cleavage stimulation factor) sur des séquences spécifiques : la séquence canonique AAUAAA reconnue par CPSF et située en amont du site de clivage constitue le signal de polyadénylation proximal par rapport au promoteur (PASp). En position distal du promoteur on retrouve une séquence riche en U et en GU qui constitue le signal de polyadénylation distal (PASd) ([Lutz, 2008](#)). La polyadénylation alternative (APA) a lieu dans la partie 3'UTR des ARN et consiste à utiliser l'un ou l'autre des PAS pour générer deux transcrits de taille différente à partir du même pré-ARNm. Ce mécanisme est répandu chez les mammifères avec plus de 70% des ARNm subissant un APA afin de réguler l'expression des gènes ([Derti et al., 2012](#); [Hoque et al., 2014](#)). Ce processus est souvent tissu-spécifique et il a par exemple été montré que le tissu neuronal humain favorise l'utilisation du PASd alors que le PASp est généralement plus utilisé dans le sang ou dans les testicules ([Liu et al., 2007](#); [Zhang et al., 2005](#)). La fixation de protéines de liaison à l'ARN (RBP) sur les séquences riches en AU, GU, CU et CA de la partie 3'UTR des pré-ARNm joue un rôle important dans la stabilité, la localisation et l'efficacité de traduction de l'ARNm ([Andreassi and Riccio, 2009](#); [Fabian et al., 2010](#)). Un criblage par ARN interférant ciblant des RBPs humains a permis d'identifier PABPN1 comme étant un suppresseur de polyadénylation alternative : la déplétion de PABPN1 dans des cellules HeLa montre un raccourcissement global des régions 3'UTR des ARNm dû à une utilisation préférentielle du site proximal de polyadénylation.

Ceci montre que PABPN1 est impliqué dans le choix du site de polyadénylation (**Figure 16**) (Jenal et al., 2012).

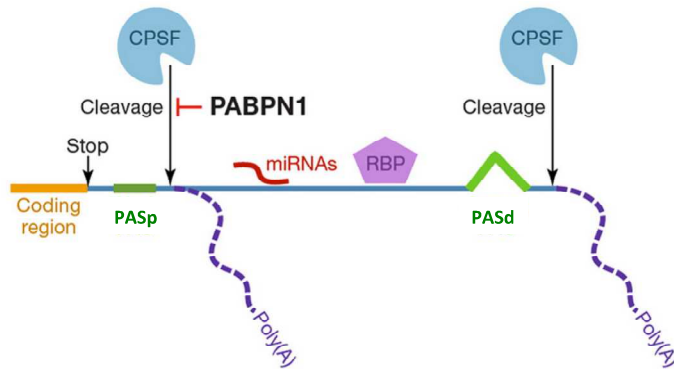


Figure 16: PABPN1 inhibe l'utilisation du site de polyadénylation proximal

D'après Jenal et al. 2012

2.e) Rôle dans l'hyperadénylation et la dégradation des ARN

La polyadénylation des ARN est importante pour leur maturation et leur traduction. Cependant, plusieurs études réalisées à la fois chez l'homme, les plantes, et la levure révèlent que la queue poly(A) peut également jouer un rôle de signal de dégradation des ARN par les exosomes nucléaires (Kilchert et al., 2016). Chez l'homme, l'exosome nucléaire concentre les exonucléases hRRP6 et hRRP44 qui dégradent l'ARN polyadénylé par le complexe de polyadénylation TRAMP dont MTR4 est l'essentiel co-facteur (LaCava et al., 2005). L'activité de TRAMP consiste donc à ajouter une petite queue poly(A) sur les ARN cibles qui sont ainsi reconnus et totalement dégradés par les exonucléases hRRP6 et hRRP44 (**figure 17**). En 2016, il a été montré que PABPN1 se liait physiquement à hMTR4 (Meola et al., 2016).

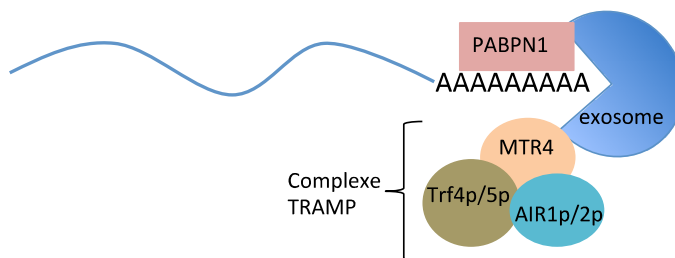


Figure 17: PABPN1 aide au recrutement de l'exosome nucléaire

La fixation du complexe TRAMP à PABPN1 permet le recrutement de l'exosome nucléaire et la dégradation des ARN polyadénylés. Le complexe TRAMP est composé des deux poly(A) polymérase

Trf4p/5p utiles à l'ajout de la queue poly(A) sur les ARN à dégrader et de deux cofacteurs à doigts de zinc Air1p/2p.

Chez les mammifères, l'implication de PABPN1 dans le système de dégradation exosomale a été d'abord mis en évidence par Beaulieu *et al.* en 2012 : la déplétion de PABPN1 dans des cellules HeLa montre une sur-expression des lncRNAs ce qui suggère que PABPN1 aide à la dégradation de ces transcrits. En mutant des éléments du complexe TRAMP, les auteurs montrent que la dégradation des lncRNAs médiée par PABPN1 est dépendante de l'exosome nucléaire (Beaulieu *et al.*, 2012). Il a par ailleurs été montré que cette dégradation était dépendante de la PAP canonique stimulée par PABPN1 (Bresson and Conrad, 2013).

La polyadénylation ainsi dépendante de PABPN1 et PAP est nommée PPD pour « PABPN1 and PAP α/γ -mediated RNA decay ». Elle est indépendante de CPSF et elle permet une « hyperadénylation » puisqu'elle a lieu après l'étape de formation de la partie 3' (Bresson *et al.*, 2015). Afin d'identifier plus globalement les cibles du PPD, Bresson *et al.* ont réalisé un RNA-seq sur des cellules où l'hyperadénylation a été inactivée. Ils observent que plusieurs classes de lncRNAs ainsi que des ARNm et des pré-ARNm retenant des introns sont sensibles au PDD. En accord avec l'étude global de Bresson *et al.* (Bresson *et al.*, 2015), il a été mis en évidence que PABPN1 avait un rôle dans la maturation du lncRNA de la télomérase humaine (hTR). Par délétion de PABPN1 dans des HEK293T, il a été montré que le maintien des télomères dépendait de la maturation de l'extrémité 3' de hTR par PABPN1. Les auteurs proposent que la maturation de la partie 3' de hTR assurée par PABPN1 et la dégradation médiée par TRAMP sont en compétition pour réguler cet ARN et que l'équilibre entre maturation et dégradation permet un contrôle de l'expression de hTR (Nguyen *et al.*, 2015).

Ces résultats sont en accord avec des résultats chez la levure qui montrent à l'aide de puces à ADN qu'en l'absence de *pab2*, on observe majoritairement une accumulation de snoRNA (small nucleolar RNA) polyadénylés (Lemay *et al.*, 2010) : Pab2 se localise à l'extrémité 3' des snoRNAs et est lié à l'exosome nucléaire suggérant que Pab2 recrute l'exosome nucléaire pour procéder à la dégradation des snoRNAs polyadénylés.

2.f) Rôle dans la régulation de l'épissage des ARNm

L'épissage alternatif des pré-ARNm est un élément clé à la régulation de l'expression des gènes faisant intervenir le spliceosome, un complexe de ribonucléoprotéines

majoritairement constitué de 5 petits ARN nucléaires (snRNA). Dans la plupart des cas, l'épissage consiste dans la fixation du snoRNA U1 à l'extrémité 5' de l'intron à épisser, la reconnaissance de l'extrémité 3' de ce dernier par U2AF65 et la liaison du point d'ancrage de l'intron par U2 snoRNA. S'ensuit le recrutement de U4, U5 et U6 permettant un réarrangement du spliceosome et la libération de U1 et U4 aboutissant à l'initiation de l'épissage (Wang and Burge, 2008). Plusieurs études montrent que l'épissage a lieu en même temps que la transcription (Ameur et al., 2011; Carrillo Oesterreich et al., 2010; Khodor et al., 2012; Tilgner et al., 2012) cependant, il arrive que les deux événements soient séparés: le pré-ARNm polyadénylé retient alors les introns dans l'attente d'être épissés. Ce type d'évènement a été le plus souvent observé pour les introns se situant en 3' de l'ARN, là où la machinerie d'épissage a le moins de temps pour intervenir avant clivage et polyadénylation de l'ARN (Khodor et al., 2011, 2012; Tilgner et al., 2012; Wetterberg et al., 1996).

Afin de pouvoir étudier le mécanisme d'épissage non couplé à la polyadénylation, des cellules HEK293T ont été modifiées par la transfection des constructions suivantes: une construction correspondant à l'ARN rapporteur β -globine possédant 1 intron proximal (intron 1) et 1 distal (intron 2) proche de la partie 3'; la même construction où la partie 3' de l'ARN a été modifiée en remplaçant le signal de polyadénylation par un ribozyme capable de s'auto-cliver et précédé de 46-adénines (46-RZ). L'extinction de PABPN1 dans ces cellules montre une incapacité à épisser l'exon 2 dans l'une ou l'autre des constructions démontrant que PABPN1 joue un rôle dans l'épissage des introns distaux des ARN polyadénylés (Muniz et al., 2015). Dans cet article, les auteurs montrent que l'activité d'épissage est dépendante de la stimulation de la PAP par PABPN1 et qu'ensemble ils aident à la fixation du facteur d'épissage U2AF65 mais uniquement au niveau des introns terminaux. Les pré-ARNm non épissés en l'absence de PABPN1 sont dégradés par la machinerie de l'exosome nucléaire.

En plus de ce rôle, PABPN1 est capable de s'autoréguler en influençant l'épissage alternatif de son propre ARNm (Bergeron et al., 2015) (voir la partie « régulation des transcrits de PABPN1 » page 29).

2.g) Rôle dans la formation des paraspeckles

Plusieurs études ont démontré le rôle de PABPN1 sur le lncRNA *NEAT1* (Beaulieu et al., 2012; Bresson and Conrad, 2013) qui est l'élément central dans la formation des paraspeckles. Ce compartiment nucléaire est impliqué dans la régulation de l'expression de gènes en retenant les ARN dans le noyau : chez la souris ce système de régulation a été mis

en évidence par la découverte du transcrite *Ctn*, alternatif au transcrite *mCAT2*. *Ctn* diffère de *mCAT2* de par sa partie 3' qui bien plus longue et qui contient des motifs en tête d'épingle qui sont hyperédités de base adénosine en inosine. Ce transcrite *Ctn* est retenu dans le noyau et est édité au niveau des paraspeckles avant d'être clivé et relargué dans le cytoplasme où il sera traduit en protéine (Bond and Fox, 2009). Chez l'homme, le transcrite *Ctn* n'existe pas, cependant il a été montré que beaucoup d'ARN humains contenant des répétitions inversées (séquences ALU) étaient retenues dans le noyau ce qui est associé à une édition adénosine-inosine par les paraspeckles (Chen et al., 2008; Iseli et al., 2002). Par exemple, il a été montré que les transcrits *PAICS* et *NUP43* étaient retenus dans le noyau et que la mutation d'un des éléments des paraspeckles (par exemple *NEAT1*) aboutissait à un export nucléocytoplasmique de ces ARN (Chen and Carmichael, 2009; Yoon et al., 2014).

Des expériences *in vitro* montrent que la déplétion de PABPN1 dans des myoblastes murins entraîne une augmentation de l'expression de *NEAT1* (Banerjee et al., 2017; Beaulieu et al., 2012) et que PABPN1 se lie physiquement à *NEAT1* (Banerjee et al., 2017). Cette augmentation est associée à une modification de l'édition du gène *Ctn*. Dans des myoblastes humains, la déplétion de PABPN1 entraîne une accumulation cytoplasmique des transcrits *NUP43* et *PAICS* ce qui suggère une incapacité des paraspeckles à retenir ces transcrits (Banerjee et al., 2017).

2.h) Rôle dans la myogenèse

Il a été montré que la déplétion de PABPN1 dans des myoblastes de souris empêchait la prolifération et la différenciation (Apponi et al., 2010). Par ailleurs, il a été démontré que l'extinction de PABPN1 chez la souris aboutissait à des atteintes musculaires (Malerba et al., 2017; Riaz et al., 2016). En accord avec cette étude, il a été montré que l'expression exogène de PABPN1 dans des C2C12 favorisait la différenciation (Kim et al., 2001). La protéine nucléaire SKIP interagit avec la partie N-terminale de PABPN1 et active la transcription du facteur myogénique myoD. Ceci entraîne une augmentation de l'expression des marqueurs de différenciation myogénine et MLC1a (pour myosin light chain Ia). De ce résultat, les auteurs suggèrent que PABPN1 pourrait être un co-facteur potentiel de la transcription ou de ces protéines régulatrices dans le muscle.

L'ensemble des fonctions nucléaires de PABPN1 est résumé dans la **figure 18**.

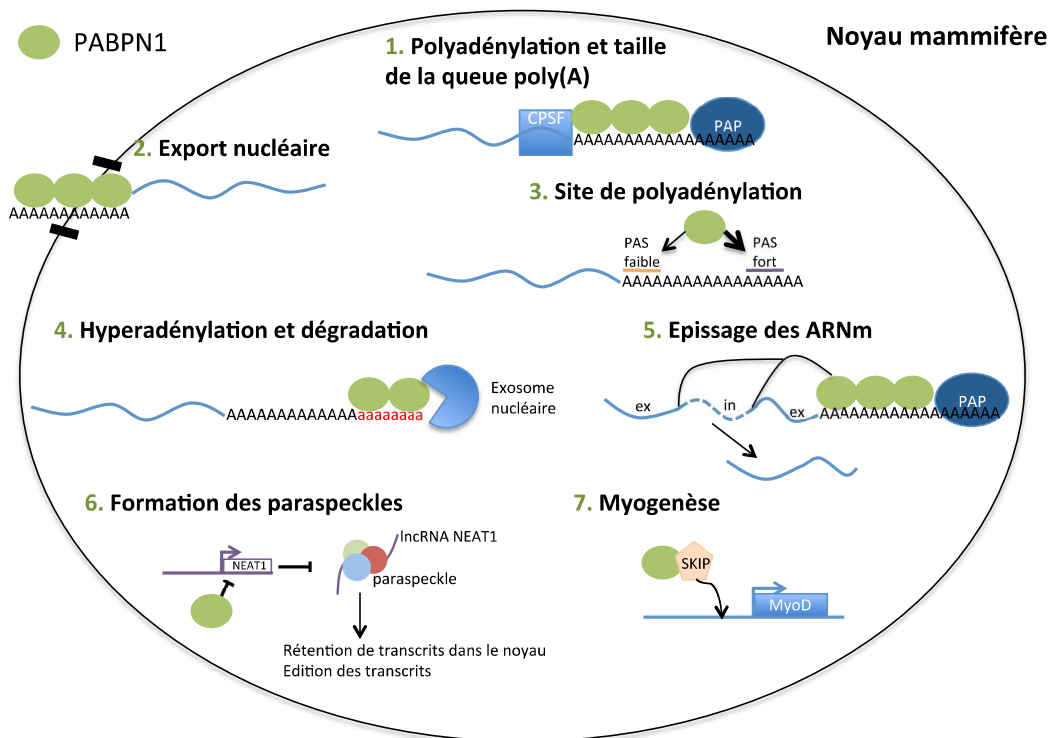


Figure 18: Fonctions nucléaires de PABPN1

1/ Le facteur de polyadénylation CPSF et PABPN1 sont nécessaires à l'ajout d'adénosines en position 3' de l'ARN par la polyA polymérase (PAP). PABPN1 contrôle également le nombre d'adénosines ajoutées. 2/ PABPN1 reste associé au ARNm polyA au niveau des pores nucléaires et est nécessaire à leur export. 3/ Le signal de polyadénylation (PAS) fort est privilégié en présence de PABPN1. 4/ Intervention dans l'hyperadénylation des ARN à dégrader et recrutement de l'exosome nucléaire pour digestion des ARN cibles. 5/ Aide à l'épissage des introns en positions 3' de l'ARN. 6/ Agit sur le niveau d'expression du lncRNA NEAT1, élément essentiel des paraspeckles dont le rôle est notamment de retenir et de modifier les transcrits par une édition des bases adénosines en inosines. 7/ Interagit avec le facteur SKIP qui a un rôle dans la régulation de l'expression du facteur myogénique myoD.

IV. Les agrégats dans l'OPMD

1) Les agrégats de PABPN1

1.a) Structure et localisation

En 1980, Tomé et Fardeau décrivent pour la première fois des inclusions filamenteuses dans les noyaux des muscles de patients OPMD. Par microscopie électronique, ils mettent en évidence des filaments tubulaires de 8,5 nm de diamètre externe et 3 nm de diamètre interne. Leur taille est d'environ 0,25 µm et ils sont la plupart du temps rectilignes. Ils s'orientent dans plusieurs directions mais forment des palissades lorsqu'ils sont très abondants (Tomé and Fardeau, 1980). Ces agrégats se localisent dans des domaines

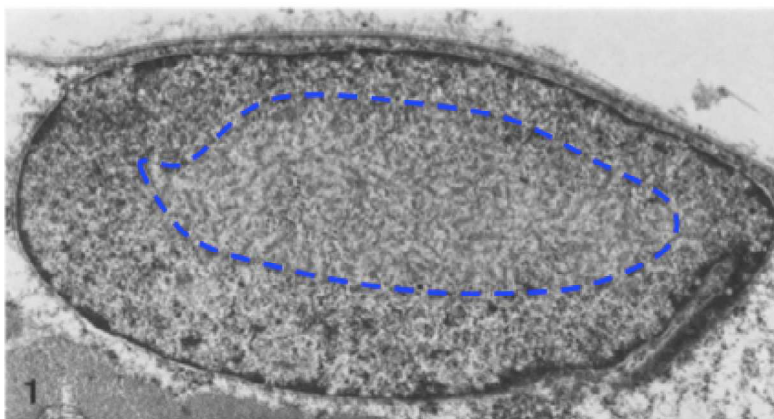
nucléaires qui ne contiennent pas de chromatine (Bengoechea et al., 2012; Tomé and Fardeau, 1980) et ne sont délimités par aucune membrane (Martin et al., 1982) (**figure 19**).

Ces inclusions sont observées uniquement dans les noyaux des muscles (myonuclei) mais pas dans les autres cellules qui peuvent être observées sur une biopsie musculaire (cellules satellites, endothéliales, péricytes, fibroblastes et cellules de Schwann) (Coquet et al., 1990; Tomé and Fardeau, 1980; Tomé et al., 1997). Par ailleurs, des inclusions similaires contenant notamment PABPN1 et l'ubiquitine ont été observées dans les neurones d'un patient OPMD (Dion et al., 2005).

L'atteinte restreinte au muscle dans l'OPMD a été reproduite dans un modèle murin sur-exprimant PABPN1-13 alanines sous le contrôle d'un promoteur CAG ubiquitaire qui montre que de tous les organes analysés (cerveau, poumon, cœur, foie, rate, rein, intestin, côlon et muscle), seul le muscle montre des anomalies histologiques (Hino et al., 2004). De la même manière, un autre modèle murin sur-exprimant PABPN1-13 alanines également sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire révèle la présence d'agrégats de PABPN1 uniquement dans les tissus post-mitotiques (le muscle et le cerveau) et pas dans les tissus mitotiques observés (poumon, rein, foie, rate) (Dion et al., 2005).

Parmi 700 biopsies musculaires observées par microscopie électronique, aucune n'a montré d'inclusions semblables à celles observées dans l'OPMD mettant en évidence leur spécificité pour cette maladie (Tomé and Fardeau, 1980, 1986). En particulier, les agrégats décrits dans l'OPMD ne ressemblent pas à ceux observés dans la myosite à inclusions (IBM) qui sont retrouvés à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau avec un diamètre supérieur (de 15 à 18 nm) (Coquet et al., 1990; Yunis and Samaha, 1971).

Aujourd'hui ces agrégats sont considérés comme le marqueur pathologique de la maladie et de nombreuses études ont été menées pour tenter de comprendre leur composition et leur rôle dans la maladie.



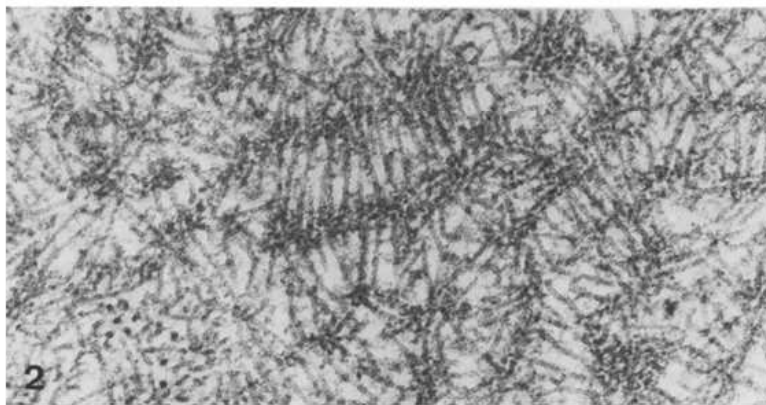


Figure 19: Agrégats pathologiques dans les noyaux musculaires de patients OPMD

Agrégats observés dans les muscles de patients OPMD par microscopie électronique. 1. Coupe transverse d'un noyau montrant un agrégat nucléaire (délimité en bleu) organisé en palissade. 2. Zone zoomée de la photo 1 montrant les filaments tubulaires orientés dans différentes directions. Adapté de (Tomé and Fardeau, 1980)

1.b) Composition

Chez l'homme, l'identification de protéines contenues dans les agrégats a été faite sur coupes de biopsies musculaires de patients OPMD par immunofluorescence ou en microscopie immunoélectronique (**figure 20A**). C'est en effet l'utilisation d'un anticorps anti-PABPN1 couplé à des billes d'or qui a permis de démontrer que la protéine était bien contenue dans les inclusions nucléaires filamenteuses observées dans les noyaux des muscles des patients par microscopie électronique depuis 1980 (Bengoechea et al., 2012; Calado et al., 2000b). Il est proposé que les agrégats contiennent à la fois PABPN1 muté et PABPN1 sauvage. Ceci a été confirmé sur cellules par la co-infection de PABPN1-13alanines et PABPN1-10alanines démontrant que les deux formes de la protéine sont présentes dans les agrégats (Klein et al., 2008). Depuis la découverte des agrégats par microscopie électronique, l'utilisation d'un anticorps dirigé contre PABPN1 permet de les observer par microscopie à fluorescence (**figure 20B**). Depuis la découverte des agrégats, il a été démontré par immunofluorescence que 9 autres protéines co-localisaient avec les agrégats de PABPN1 chez les patients OPMD.

Parmi elles figurent notamment l'ubiquitine (**figure 20C**) et le protéasome 20s (**figure 20D,E**) qui sont des composants de la machinerie intracellulaire qui travaillent en collaboration pour dégrader les protéines : par de multiples cascades enzymatiques assurées par les ubiquitines ligases (E1 à E3), la protéine ubiquitine s'assemble en cascade sur un substrat à dégrader. Ce dernier est ainsi reconnu par le protéasome, puis dé-ubiquitylé par

la sous-unité 19s avant d'être dégradé par la sous-unité 20s (Nandi et al., 2006). Ainsi, l'ubiquitine est souvent retrouvée dans des inclusions contenant des protéines pathologiques comme c'est le cas des inclusions d'alpha-synucléin dans la maladie de Parkinson (Tofaris et al., 2003), de Tau dans la maladie d'Alzheimer (Oddo, 2008) ou de SOD1 dans l'ALS (Bendotti et al., 2012). De plus, dans plusieurs maladies à expansion polyglutamine comme les ataxies spinocérébelleuses de type 1 ou 3, on retrouve une accumulation d'ubiquitine et de protéasome dans les agrégats formés par l'ataxine-1 (Cummings et al., 1998) et l'ataxine-3 (Chai et al., 1999a).

Les protéines chaperonnes sont des protéines ubiquitaires, exprimées dans tous les compartiments cellulaires et caractérisées par leur capacité à se lier et à stabiliser les protéines naissantes. Parmi elles, les protéines de choc thermique HSPs (Heat Shock Proteins) sont celles qui sont préférentiellement exprimées lorsque la cellule subit un stress qui aboutit à la formation de protéines mal-conformées (Bukau et al., 2006). HSP70 est la principale chaperonne de réponse au stress cytosolique et elle va reconnaître les protéines mal-conformées grâce à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP par ses co-chaperonnes de la famille HSP40. Le complexe HSP70/co-chaperonne va alors soit procéder au bon repliement des protéines soit à leur dégradation en engageant le co-facteur CHIP qui va enclencher la dégradation du substrat par le système ubiquitine-protéasome (Esser et al., 2004). HSP70 a été retrouvée dans les agrégats de PABPN1 chez les patients OPMD (**figure 20F**) ainsi que dans d'autres structures formées par des protéines pathologiques comme dans des modèles de la maladie de Huntington (Novoselova et al., 2005). Il a ainsi été suggéré que cette interaction reflétait un effort de la protéine chaperonne pour dissocier les agrégats (Liberek et al., 2008).

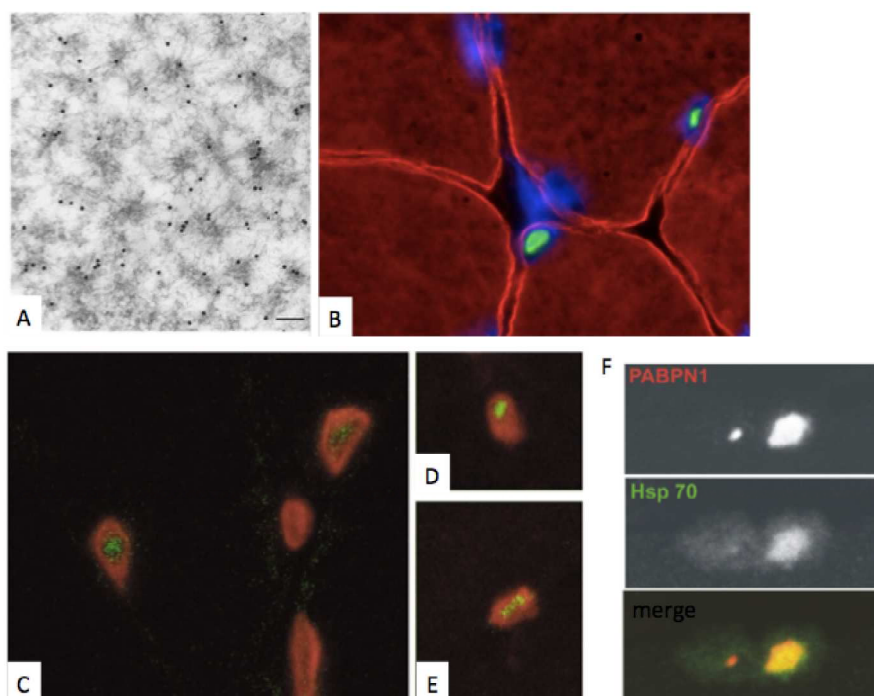


Figure 20: Composition des agrégats

PABPN1, ubiquitine, protéasome, HSP70 composent les agrégats chez les patients OPMD. A. Observation d'un agrégat de patient OPMD en microscopie électronique montrant une structure dense et amorphe interconnectée par des filaments tubulaires. Chacune des structures est décorée par les billes d'or couplées à un anticorps anti-PABPN1 (Bengoechea *et al.* 2012). B. Agrégats observés par immunofluorescence sur coupe de PABPN1 OPMD par marquage d'un anticorps anti-PABPN1 (vert) ; dystrophine (rouge), dapi (bleu). Observation d'ubiquitine (C), de protéasome (D,E) (Calado *et al.*, 2000b) et de HSP70 dans les agrégats de PABPN1 (Tavanez *et al.*, 2009)

Tout comme HSP70, parmi les molécules retrouvées dans les agrégats de PABPN1 chez l'homme, certaines sont majoritairement cytoplasmiques, comme c'est le cas de PRMT1 (Herrmann *et al.*, 2005) et FKBP12 (Nigam *et al.*, 1993) ou même extracellulaire comme PCOLCE (Kessler *et al.*, 1990). En plus de ces 9 protéines, d'autres ont été retrouvées dans les agrégats de PABPN1 en utilisant des modèles *in vitro* ou *in vivo* et leur présence chez l'homme reste à explorer. L'ensemble des protéines décrites dans les agrégats se trouve dans le **tableau 2**.

Alors que l'ADN et le nucléole sont exclus des agrégats de PABPN1, il a été montré par sonde FISH oligod(T) dirigée contre la queue poly(A) des ARN que les agrégats contenaient des ARN polyadénylés mais qu'ils excluaient les ARN ribosomiaux (Calado *et al.*, 2000b; Klein *et al.*, 2008). Enfin, il mis en évidence qu'ils renaient le pré-ARNm de *TNNT3* (Klein *et al.*, 2016).

| Protéines | Fonctions | Biopsies | Modèles | |
|--|--|---------------------|--|----------------------------------|
| | | | <i>In Vitro</i> | <i>In Vivo</i> |
| Ubiquitine | Accrochées en chaîne aux protéines à dégrader par le protéasome grâce au « ubiquitin-activating enzymes » (E1 à E3) | + ¹ | M ² S ^{3,4} H ³ | M ⁵ D ⁶ |
| Protéasome 20S | Cœur catalytique du protéasome. | + ¹ | S ⁴ | NA |
| HSP70 Protéine de choc thermique 70 | Dégradation des protéines Protéine de choc thermique Protège les cellules d'un stress via son activité chaperonne : Sa sur-expression permet d'empêcher l'aggrégation de protéines, de redistribuer l'ubiquitine et de protéger de l'apoptose | + ^{4, 7,8} | H ^{4,9} S ⁴ | D ⁶ |
| HSP40 Protéine de choc thermique 40 | co-chaperonne de HSP70. Rôle majeur dans la régulation de la fixation d'ATP à HSP70 | NA | S ⁴ | |
| PRMT1/PRMT3 Arginine méthyl transférase type 1/3 | Méthylation post-traductionnelle des résidus arginines. Méthyle notamment les 13 résidus arginines en position C-terminal de PABPN1 | + ⁸ | NA | NA |
| CUGBP1 Protéine de liaison au triplet CUG de l'ARN | Ribonucléoprotéine ubiquitaire impliqué dans l'épissage des pré-ARNm, la déadénylation des ARNm et l'activation de la traduction. Impliqué dans la physiopathologie de la DM1 | + ⁹ | H ⁹ | NA |
| FKBP12 Peptidyl-propyl cis-trans isomérase | Protéine ubiquitaire. Se fixe aux canaux de relargage du calcium RyR et IP3R et au récepteur au TGFβ1. Inhibe le signal basal de ces 3 récepteurs S'accumule dans les agrégats de la protéine Tau dans Alzheimer | + ⁹ | H ⁹ | NA |
| SFRS3 Facteur d'épissage riche en arginine/sérine 3 | Impliqué dans le processing des ARN ayant un rôle dans la prolifération et/ou la maturation cellulaire. Intervient notamment dans l'épissage alternatif de la protéine Tau impliquées dans Alzheimer | + ⁹ | H ⁹ | NA |
| PCOLCE1 Endopeptidase de procollagène | Aide à la maturation des fibres de collagènes I à III, éléments essentiels de la matrice extracellulaire | + ⁵ | M ⁵ | M ⁵ |
| HMG2 Molécule de liaison à l'ADN | Sa fixation cause des altérations structurales à l'ADN. Fonction moléculaire inconnue | - | H ⁹ | |
| HNRPA1 Ribonucléoprotéine nucléaire hétérogène A1 | Rôle dans l'épissage, l'export nucléaire et la traduction des ARNm et dans le maintien des télomères. Impliqué dans plusieurs maladies dont SMA, ALS et Alzheimer | + ^{9,10} | H ⁹ S ¹⁰ | NA |
| PRC1 Polycomb repressif complexes | Active ou réprime la transcription par son activité histone H2A. | NA | H ⁹ | NA |
| S100P Protéine P de liaison au calcium S100 | A été impliqué dans plusieurs types de cancers (pancréas, sein, colon, prostate, et poumon) | NA | H ⁹ | NA |
| Arih1 Asb11 Ddb1 Trim63 (Murf1) Fbxo32 (atrogen-1) E3 ligase | Les E3 ligases jouent un rôle essentiel dans la reconnaissance du substrat à dégrader par le protéasome. Permet l'ajout successif d'ubiquitine sur la protéine cible. | NA | S ¹¹ | NA |

| | | | | |
|--|---|----|-----------------|----|
| ARIH2 E3 ligase | Voir case du dessus | NA | H ¹² | NA |
| αPML Protéine leucémique promyelocytaire | Régulent des processus clés comme la transcription, l'apoptose, la senescence, la réponse aux dommages de l'ADN ou la résistance aux micro-organismes. Forme des corps nucléaires du même nom. | NA | H ¹³ | NA |

Tableau 2: Composition des agrégats de PABPN1

Les protéines décrites dans les agrégats retrouvés dans des noyaux musculaires de patients OPMD (biopsies), ou dans des modèles *in vitro* ou *in vivo* de surexpression de PABPN1 sont présentées dans ce tableau.

NA : Non analysé ; + : présents ; - : absents

Modèles cellulaires : Humain (H) : cellules HeLa sauf pour [Corbeil-Girard et al. 2005](#) : A549 ; murin (M) : D7e pour [Raz et al. 2011](#) et [Raz et al. 2013](#) et C2C12 pour [Anvar et al. 2011](#) ; singe (S) : COS-7.

Modèles animaux : souris (M) OPMD A17.1 ; drosophile (D) (Mhc-Gal4/UAS).

Les études ayant utilisé des modèles musculaires pour analyser la composition des agrégats sont écrites en vert et les références associées à chacun de ces modèles sont les suivantes :

- | | |
|---|---|
| ¹ . Calado, A et al. (2000) | ⁸ . Tavanéz, J.P et al. (2009) |
| ² . Raz, V. et al. (2011) | ⁹ . Corbeil-Girard, L.P. et al. (2005) |
| ³ . Abu-Baker, A et al. (2003) | ¹⁰ . Fan, X. et al. (2003) |
| ⁴ . Bao, Y.P. et al. (2002) | ¹¹ . Anvar, S.Y. et al. (2011) |
| ⁵ . Raz, V. et al. (2013) | ¹² . Raz, V. et al. (2014) |
| ⁶ . Chartier, A. et al. (2013) | ¹³ . Abu-Baker, A. et al. (2005) |
| ⁷ . Bao, Y.P. et al (2004) | |

1.c) Agrégation et domaines structuraux de PABPN1

Rôle de la partie en N-terminale :

B. Brais a été parmi les premiers à proposer un modèle où l'expansion d'alanines dans PABPN1 modifiait les propriétés biophysiques de la protéine entraînant son accumulation en agrégats insolubles et toxiques ([Brais, 2003](#)). Cette hypothèse est confortée par différentes études qui montrent que : 1/ les oligomères polyalanine d'une taille supérieure à 8 alanines consécutives forment spontanément des fibrilles *in vitro* ([Billingsley et al., 1994](#)) ; 2/ des peptides contenant 14 résidus alanines forment *in vitro* des feuillets β résistants à la dégradation ([Forood et al., 1995](#)) et 3/ la transfection de protéines de fusions ayant un long domaine polyalanine montrent la formation d'inclusions intranucléaires ([Gaspar et al., 2000](#); [Rankin et al., 2000](#)).

Afin de tester si l'expansion dans PABPN1 est décisive pour l'agrégation, les 125 premiers acides aminés de la protéine contenant donc le stretch d'alanine ont été purifiés *in vitro*. Ces 125 acides aminés contiennent toute la partie en amont du domaine coil-coiled (voir partie structure de PABPN1 page 30).

A partir de trois constructions contenant les 125 acides aminés de la partie N-terminale avec soit 0, soit 10, soit 17 alanines il a été montré que : 1/ seuls les peptides

contenant un stretch d'alanine, quelle qu'en soit la taille, pouvaient former des fibrilles 2/ les fibrilles se forment plus rapidement à partir de la construction contenant 17 alanines comparé à celle en contenant 10 (Scheuermann et al., 2003) et 3/ les fibrilles formées par la partie N-terminale à 17 alanines sont plus résistantes à la dégradation par agents dénaturants que celle à 10 alanines (Lodderstedt et al., 2007).

A l'inverse il a été montré, à la fois dans des modèles cellulaires et sur protéine purifiée, que la forme complète de PABPN1 peut former des fibrilles indépendamment du segment d'alanine (Klein et al., 2008; Tavanez et al., 2005; Winter et al., 2012).

Au vu de ces observations *a priori* contradictoires, il a été proposé que la formation de fibrilles de PABPN1 découle de deux mécanismes complémentaires l'un dépendant du segment d'alanine dans la partie N-terminale et l'autre indépendant du segment d'alanine qui implique donc les autres segments de la protéine (Winter et al., 2012).

Rôle des domaines coiled-coil, RRM et C-terminal :

Le domaine RRM (acides aminés 161 à 257) correspond au domaine permettant la fixation de PABPN1 aux ARN. Il a été montré par transfection transitoire de cellules HeLa qu'une mutation ponctuelle (F215A) au niveau du domaine RRM de PABPN1 mutée diminuait le nombre d'agrégats ainsi que leur taille (Messaed et al., 2007). Grâce à la cristallographie de la protéine PABPN1, il a été montré que le domaine RRM avait une structure capable de se dimériser. De ces observations, certains auteurs ont suggéré que l'agrégation pouvait provenir d'une dimérisation du domaine RRM (Ge et al., 2008; Song et al., 2008). Il a été montré que la création de pont disulfure dans la partie RRM de PABPN1 empêche la dimérisation de ce dernier et stabilise la protéine. A partir de ce modèle, les auteurs montrent que la stabilisation du domaine RRM retarde la formation de fibrilles *in vitro* (Liebold et al., 2015).

Le domaine coil-coiled (acides aminés 119 à 146) permet la stimulation de la poly(A) polymérase. En particulier une séquence de 30 acides aminés prédite pour former une hélice alpha aliphatique est essentielle pour la stimulation de la poly(A) polymérase (Kerwitz et al., 2003). Une mutation dans ce domaine entraîne une diminution du nombre d'agrégats de PABPN1 *in vitro* (Messaed et al., 2007; Tavanez et al., 2005) et *in vivo* (Chartier et al., 2006).

Le domaine C-terminal (acides aminés 257 à 306) contient notamment le signal de localisation nucléaire NLS. Les auteurs ont utilisé le système double hybride pour montrer

que la mutation de ce domaine (PABPN1- Δ Cter) empêchait son oligomérisation avec la protéine PABPN1 sauvage. De plus, la transfection de la protéine PABPN1- Δ Cter-GFP empêche la formation d'agrégats (Fan et al., 2001).

Prédiction des domaines d'agrégation:

L'analyse de la structure de la protéine PABPN1 *in silico* montre que le domaine RRM présente des domaines « hot-spot » de capacité d'agrégation, ce qui est en accord avec les analyses *in vivo* (Tavanez et al., 2005). Mis à part pour le domaine RRM, la protéine PABPN1 est prédite comme très peu ordonnée, ne possédant pas de structure tertiaire spécifique (voir paragraphe « structure de la protéine » page 30) (Tavanez et al., 2009). L'analyse de la protéine purifiée contenant 10, 13, 15 ou 17 alanines montre que l'expansion d'alanine déstabilise la protéine et tend vers la formation de structures compactes proportionnelles à la taille de l'expansion. En particulier l'addition de 5 ou 7 alanines aboutit à la formation d'hélice alpha dans la structure tertiaire de la protéine (figure 21). Ainsi, par ces analyses de prédiction il a été montré que l'expansion d'alanine introduisait une déstabilisation de la protéine native ce qui accroît l'hydrophobicité de la protéine. Cette transition a pour conséquence de révéler les domaines hydrophobes de la protéine normalement cachés par la conformation native de cette dernière et d'augmenter ainsi sa reconnaissance par les protéines chaperonnes et notamment HSP70.

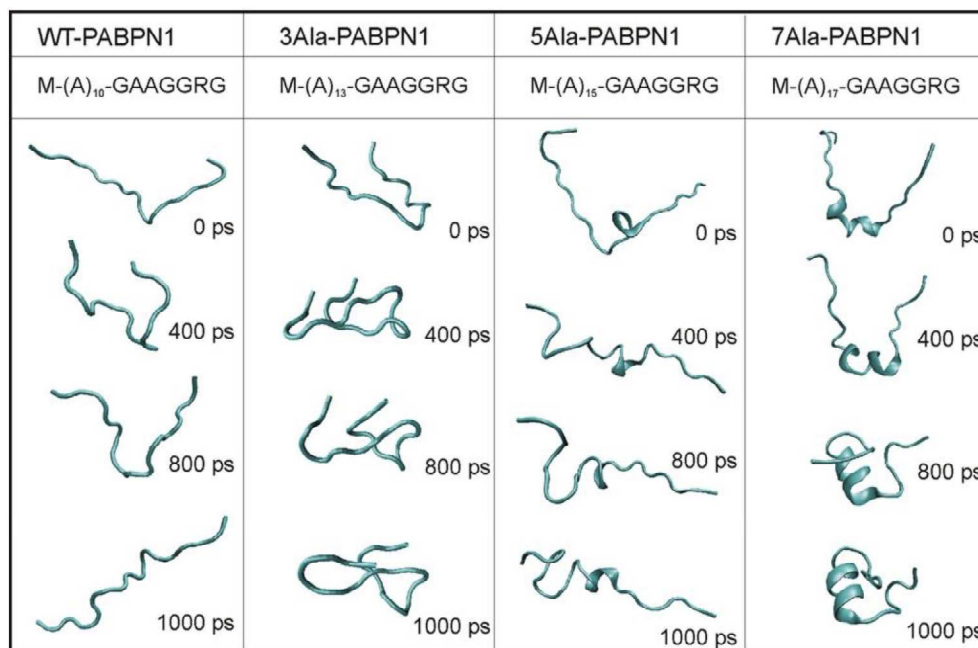


Figure 21: Dynamique moléculaire de PABPN1 sauvage et muté

La figure représente des clichés obtenus après 1000 simulations des protéines en utilisant le logiciel de simulation en dynamique molécule GROMACS. Chaque panneau correspond à la protéine PABPN1 supplémentée de 0 alanines (WT-PABPN1) ou 3,5 ou 7 alanines (3-7Ala-PABPN1). La séquence peptidique est indiquée en haut sous l'intitulé de la protéine. Figure d'après [Tavanez et al., 2009](#)

1.d) Dynamique de formation

A l'état soluble, PABPN1 est contenu dans des structures appelées « speckles » nucléaires qui sont essentielles à l'assemblage, au stockage et au recyclage des facteurs de maturation des pré-ARNm ainsi qu'à leurs modifications post-transcriptionnelles ([Hall et al., 2006](#)). Sur fibre isolée de patient OPMD, il a été montré que les agrégats de PABPN1 délocalisent de ces structures tout en y restant physiquement associés ([Bengoechea et al., 2012](#)). *In vitro*, la transfection de myoblastes primaires humains avec une construction PABPN1 mutée couplée à la GFP (GFP-expPABPN1) confirme ce résultat et montre la formation de pré-agrégats de petite taille (0,1 à 0,2 μm^2) ainsi que d'agrégats plus gros (0,3 à 0,75 μm^2) délocalisés mais physiquement liés aux speckles nucléaires ([Bengoechea et al., 2012](#)). Par ailleurs, l'étude de la formation des agrégats dans des cellules U2OS transfectées de manière transitoire avec une construction GFP-expPABPN1 montre que l'agrégation est un processus en plusieurs étapes : PABPN1 sort progressivement des speckles nucléaires pour aller s'accumuler dans des pré-inclusions avant de grossir pour former des inclusions insolubles ([Raz et al., 2011a](#)).

L'environnement nucléaire semble jouer un rôle sur la formation des agrégats de PABPN1 car lorsque le signal de localisation nucléaire (NLS) est enlevé de la protéine, cette dernière se localise exclusivement dans le cytoplasme mais aucun agrégat n'est observé ([Abu-Baker et al., 2005](#)).

PABPN1 est une protéine ayant naturellement tendance à s'agréger ainsi, la surexpression de protéines de fusion comparant PABPN1 sauvage (10-Ala-GFP) à PABPN1 mutée (17-Ala-GFP) montre que dans les deux cas, des agrégats nucléaires enrichis en ARN poly(A) et insolubles se forment ([Raz et al., 2011b](#); [Tavanez et al., 2005](#)). Cependant, le niveau de surexpression influence le degré d'agrégation car en diminuant le niveau de PABPN1 exogène dans des cellules COS-7, il a été montré que les agrégats formés par PABPN1 muté (17 alanines) étaient plus nombreux que ceux formés par PABPN1 sauvage (10 alanines) ([Bao et al., 2002](#)). De la même manière, le modèle murin sur-exprimant PABPN1 sauvage présente moins d'agrégats que celui sur-exprimant PABPN1-17-alanines ([Davies et al., 2008](#)). Ainsi, plusieurs différences ont été observées entre ces deux types d'agrégats : 1) Les protéines 17-Ala-GFP s'agrègent moins vite que les protéines 10-Ala-

GFP mais ces dernières se repositionnent rapidement dans les speckles nucléaires alors que les *foci* formées par les protéines 17-Ala-GFP ne sont pas réversibles (Raz et al., 2011a) ; 2) les agrégats formés par 10-Ala-GFP ne contiennent pas les protéines HSP70, Ubiquitine et α PML contenues dans les agrégats formés par 17-Ala-GFP (Abu-Baker et al., 2005; Raz et al., 2011a)

Afin d'étudier la dynamique des protéines de PABPN1 (10-Ala-GFP ou 17-Ala-GFP) contenues dans les agrégats, des cellules HeLa transfectées avec l'une ou l'autre de ces constructions ont été suivies après photoblanchissement par fluorescence (FRAP ou FLIP). Par la technique FRAP, il a été montré qu'après photoblanchissement des agrégats (10 ou 17 alanines), la fluorescence est rapidement recouverte par migration des molécules PABPN1-GFP depuis le nucléoplasme dans ces agrégats. En complément, le photoblanchissement répétitif d'une zone adjacente aux agrégats (FLIP) permet de montrer la diffusion des molécules PABPN1-GFP depuis les agrégats vers le nucléoplasme (Tavanez et al., 2005). De la même manière, l'observation du comportement des agrégats au cours du cycle cellulaire sur des cellules transduites GFP-13-AlaPABPN1 montre qu'au cours de la mitose, les agrégats se dissocient (Marie-Josée Sasseville et al., 2006).

Ces différentes études montrent que les agrégats ne correspondent pas tous à des structures figées et que, au moins dans certains cas, les molécules de PABPN1 qui y sont concentrées diffusent librement depuis et vers le nucléoplasme.

1.e) Rôles

Chez l'homme, les agrégats de PABPN1 sont observés dans tous les muscles des patients OPMD, que ce soit les muscles « cliniquement atteints » (muscle pharyngien et releveur de la paupière) ou « cliniquement non atteints » et ce dans moins de 20% des noyaux (Becher et al., 2000; Blumen et al., 1996; Bouchard et al., 1989; Coquet et al., 1983; Tomé and Fardeau, 1980; Tomé et al., 1997). Leur rôle dans la physiopathologie de l'OPMD est encore discuté mais plusieurs arguments sont en faveur d'un rôle toxique par perte de fonction des protéines séquestrées dans les agrégats ou par gain de fonction des agrégats. Cependant, il a aussi été postulé que les agrégats pouvaient correspondre à un mécanisme de défense pour protéger la cellule de PABPN1 mutée soluble.

Hypothèse de défense cellulaire :

La mutation du domaine RRM de PABPN1 empêche la protéine mutée de former des agrégats (Messaed et al., 2007). Il a été montré par microscopie en temps réel que cette forme soluble dans des cellules COS-7 était plus toxique que la forme agrégée. De cette observation, les auteurs proposent que la formation des agrégats soit un mécanisme de défense cellulaire pour canaliser les protéines PABPN1 mutées solubles.

Hypothèses de toxicité

8 à 10% d'agrégats sont retrouvés chez les patients homozygotes contre 3 à 6% chez les patients hétérozygotes (Blumen et al., 1999). Or les patients homozygotes ont un phénotype plus sévère que les patients hétérozygotes.

Perte de fonction de PABPN1 : Il a été suggéré que la séquestration de PABPN1 (sauvage et mutée) dans les agrégats nucléaires dans les muscles des patients OPMD pouvait aboutir à une perte de fonction toxique de la protéine. PABPN1 est la première molécule à avoir été confirmée comme étant présente dans les agrégats et il a été proposé que sa séquestration pouvait être équivalente à une perte de fonction de la protéine pour le reste du noyau.

Des expériences de répression de l'expression de PABPN1 ont été menées dans la souris et ont montré que diminuer de 20 à 50% l'expression de PABPN1 dans les muscles de souris entraînait une atrophie des myofibres, une centronucléation, de la fibrose et une transition dans le typage de fibres (Riaz et al., 2016). De la même manière, diminuer le niveau de PABPN1 dans des myoblastes humains conduit à des défauts dans la myogenèse de ces derniers (Apponi et al., 2010).

A l'inverse, la sur-expression de PABPN1 sauvage co-transfécité avec PABPN1 muté dans un modèle cellulaire protège les cellules de l'apoptose. De la même manière, la comparaison de souris hétérozygotes Ala17 et de souris doubles transgéniques Ala10/Ala17, sur-exprimant donc la forme mutée et la forme sauvage de la protéine, montre que les souris doubles transgéniques ont une plus grande force musculaire et moins de noyaux centraux (Davies et al., 2008).

Il est donc envisageable que la perte de fonction de PABPN1 dans l'OPMD soit due d'une part à sa séquestration dans les agrégats et d'autre part à la mutation elle-même.

Perte de fonctions d'autres ARN/protéines: plusieurs molécules (protéines et ARN) ont été décrites dans les agrégats de PABPN1 (voir partie « composition des agrégats ») et il a été

suggéré que leur piégeage dans ces derniers desservirait les autres compartiments cellulaires sur le même modèle que celui proposé pour la perte de fonction de PABPN1.

En 2009, Tavanez et *al.* proposent un tel mécanisme de « piégeage moléculaire » où ils montrent que l'arginine méthyle transférase I (PRMT1) ainsi que la protéine chaperonne HSP70 interagissent préférentiellement avec la forme mutée de PABPN1 et qu'ils s'accumulent également dans les agrégats. Ces protéines ont d'importants rôles dans différents processus cellulaires dont la méthylation de l'ADN régissant l'expression des gènes pour PRMT1 et le contrôle de la bonne conformation protéique pour HSP70. Les auteurs suggèrent donc que cette accumulation dans les agrégats dépléterait le nucléoplasme, voir le cytoplasme, de ces protéines aboutissant à une dérégulation de l'homéostasie cellulaire (Tavanez et al., 2009).

L'observation d'ARN poly(A) dans les agrégats suggère également un piégeage d'ARN spécifiques du muscle qui aboutirait à un déficit en protéines (Calado et al., 2000a). Nous avons par exemple démontré que le pré-ARNm de *TNNT3* était piégé dans les agrégats. Cet ARN est délocalisé des speckles nucléaires où il est normalement épissé par le facteur d'épissage SC35 ce qui aboutit à un défaut d'épissage du pré-ARNm de *TNNT3* (Klein et al., 2016).

Gain de fonction toxique des agrégats par encombrement stérique : il a également été proposé que le rôle toxique des agrégats provienne de la place que prenait ce dernier dans le noyau. En effet, plusieurs auteurs suggèrent qu'avec le temps, l'augmentation du volume nucléaire occupé par l'agrégat aurait un impact sur les fonctions nucléaires (Brais, 2003; Fan et al., 2003; Kühn and Wahle, 2004).

Cette hypothèse de gain de fonction toxique est largement soutenue par nombre d'études ayant démontré que diminuer le nombre de noyaux avec agrégats dans des modèles animaux de l'OPMD permettait d'améliorer leur phénotype (Abu-Baker et al., 2013; Bao et al., 2002, 2004; Davies, 2005; Davies et al., 2005; Malerba et al., 2019; Wang et al., 2005). Ces études seront détaillées dans la partie « V. Thérapie-Stratégie anti-agrégats ».

1.f) Les agrégats dans d'autres maladies à expansions polyalanine

L'étude *in vitro* et *in vivo* de l'expansion d'alanine dans les protéines associées aux autres maladies polyalanines révèle la présence d'agrégats : Dans le cas de SPD, XH, CCHS,

les agrégats sont cytoplasmiques ce qui est due à une délocalisation partielle (PHOX2B dans CCHS) ou totale (HOXD13 dans SPD et SOX3 dans XH) de la protéine mutée. Dans le cas de XLMR et HFGR les protéines ARX et HOXA13 ne délocalisent pas de leur compartiment initial et forment des agrégats dans le noyau et dans le cytoplasme respectivement (Messaed and Rouleau, 2009).

Certaines propriétés de ces agrégats sont semblables à celles observées dans les agrégats de PABPN1:

1. Séquestration de la protéine sauvage : Il a été montré par co-transfection de la protéine portant l'expansion et de la protéine sauvage que les agrégats formés par SOX3, HOXD13, HOXA13 et RUNX2 contenaient à la fois la protéine mutée et la protéine sauvage (Albrecht et al., 2004). Ceci a été observé de la même manière pour PABPN1 (Klein et al., 2008).

2. L'implication du système ubiquitine/protéasome: Les agrégats formés par expHOXD13, expARX, et expPHOXB2 séquestrent également l'ubiquitine et le protéasome (Albrecht et al., 2004; Bachetti et al., 2007; Nasrallah et al., 2004).

3. La toxicité cellulaire : La sur-expression de expARX et expPHOXB2 induit une agrégation associée à une mort cellulaire (Bachetti et al., 2007; Nasrallah et al., 2004).

L'ensemble de ces observations suggère que l'expansion d'alanine a effectivement un rôle dans l'agrégation des protéines et dans la toxicité des agrégats *in vitro* et *in vivo*. Cependant, il est intéressant de noter que, à l'exception de l'OPMD, les agrégats ne sont pas observés chez les patients atteints de ces maladies polyalanines (Shoubbridge and Gecz, 2013). Ceci suggère que chez l'homme, l'expansion d'alanine n'est pas suffisante à l'agrégation mais que d'autres propriétés des protéines telles que leur fonction, leur localisation, leur niveau d'expression ou encore l'environnement cellulaire conditionnent la formation d'agrégats.

2) Agrégats et propriétés d'agrégation

L'observation de plaques anormales pouvant s'apparenter à de l'agrégation de protéines remonte au 19^{ème} siècle, lorsque le scientifique allemand R. Virchow observa des anomalies macroscopiques sur coupes de foie après coloration à l'iode. Il est alors le premier à introduire le terme « amyloïde » pour désigner ces structures. L'analyse de ces structures notamment par des colorations au rouge congo et par microscope à transmission a permis de démontrer qu'elles étaient formées de protéines normalement solubles qui

s'assemblent pour former des fibrilles insolubles résistantes à la dégradation (Sipe and Cohen, 2000).

L'analyse structurale de ces peptides fibrillaires par rayons X a montré qu'ils partagent tous la même structure consistant dans la formation de feuillets β reliés par des liaisons hydrogènes et organisés selon un axe perpendiculaire (Rambaran and Serpell, 2008; Sunde et al., 1997) (figure 22). Ces structures amyloïdes sont résistantes à la solubilisation avec des détergents comme le NP-40 ou le SDS, sont résistantes aux protéases et se lient spécifiquement aux colorants rouges congo ou thioflavine (Chiti and Dobson, 2006).

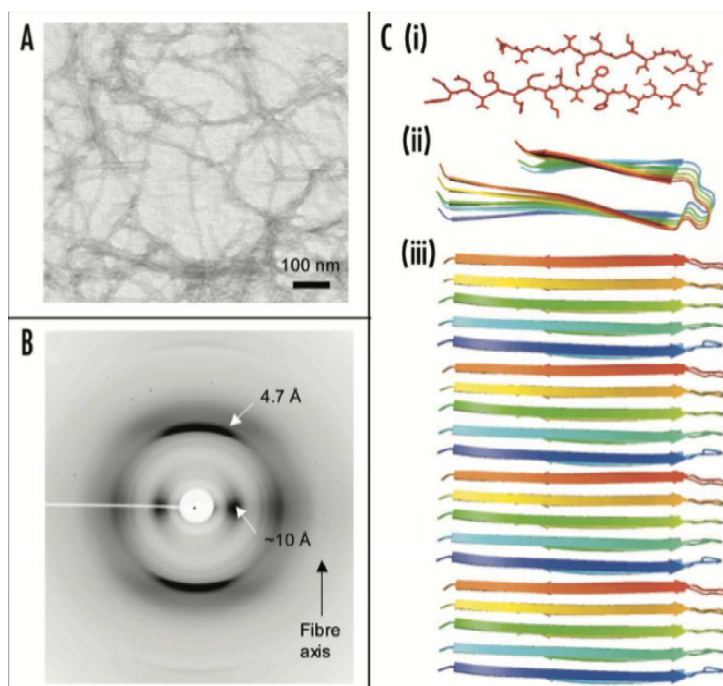


Figure 22: Fibrilles et feuillets β

Formation *in vitro* de fibrilles et de feuillets beta à partir d'un peptide A β

A) Microscopie électronique montrant de longues fibrilles non ramifiées

B) Fibre de diffraction observée aux rayons X

C) Structure des fibres amyloïdes A β . L'association de feuillets β (ii) reliés entre eux par des chaînes annexes (i) forme la fibre amyloïde (iii). D'après (Rambaran and Serpell, 2008)

Les maladies à agrégats regroupent un grand nombre de maladies initiées par la mutation ou la mauvaise conformation de protéines. Les protéines pathologiques ont des structures différentes, des conformations natives différentes et des fonctions différentes cependant il semblerait qu'elles s'agrègent toutes de manière à former des fibrilles constituées de feuillets β (figure 23A).

En 1991, La Spada *et al.* suggèrent un mécanisme d'agrégation dépendant d'une expansion de triplets en découvrant la mutation responsable de l'atrophie musculaire spinale

bulbaire (SBMA), une maladie neurodégénérative présentant des agrégations amyloïdes. Ils découvrent alors que c'est une expansion polyQ dans la protéine du récepteur aux androgènes qui engendre la maladie et proposent que cette expansion engendrerait l'agrégation (La Spada et al., 1991). Depuis cette étude, il a été démontré notamment par des expériences *in vitro* que la mutation polyAla ou polyQ dans certaines protéines était responsable de l'agrégation de ces protéines observée dans plusieurs maladies. En effet, l'étude intensive de la mutation polyglutamine de l'exon 1 de la protéine Huntingtin HTT (HTT^{ex1}) comme modèle de la maladie de Huntington a permis d'étudier la formation *in vitro* et *in vivo* des agrégats (Davies et al., 1997; DiFiglia et al., 1997; Scherzinger et al., 1997). Les auteurs observent la formation de structures fibrillaires en feuillets β , similaire à ce qui a déjà été observé dans la maladie d'Alzheimer, aboutissant à de larges agrégats de cette protéine dans les noyaux des neurones de souris. La cinétique de formation de ces agrégats corrèle avec la taille de l'expansion polyQ (Scherzinger et al., 1997; Todd and Lim, 2013). Il a été proposé que la mutation polyQ modifiait les propriétés natives de conformation de la protéine mutée conférant à cette dernière une propension pour l'agrégation (Adegbuyiro et al., 2017).

Pour en apprendre plus sur les propriétés d'agrégation des protéines, la cinétique de formation des agrégats a été étudiée *in vitro*. En utilisant des protéines purifiées et un colorant spécifique aux fibres amyloïdes, trois phases d'agrégation ont été décrites : une première phase dite de latence où les protéines sont majoritairement sous forme de monomères ou d'oligomères est suivi d'une phase de croissance rapide au cours de laquelle les fibrilles se forment. La dernière étape advient lorsqu'il n'y a plus de protéines solubles et correspond à une phase plateau qui termine la réaction (Blanco et al., 2012) (**figure 23B**). En plus des agrégats fibrillaires initialement décrits chez les patients ou dans les modèles animaux, les différentes expériences *in vitro* réalisées sur la protéine HTT avec des tailles d'expansion différente, des conditions différentes de solvants, des mélanges hétérogènes de protéines, des conditions différentes de pH et de température etc... montrent que les protéines contenant une expansion polyQ peuvent s'accumuler sous une variété d'autres agrégats, de taille et de formes différentes (Adegbuyiro et al., 2017).

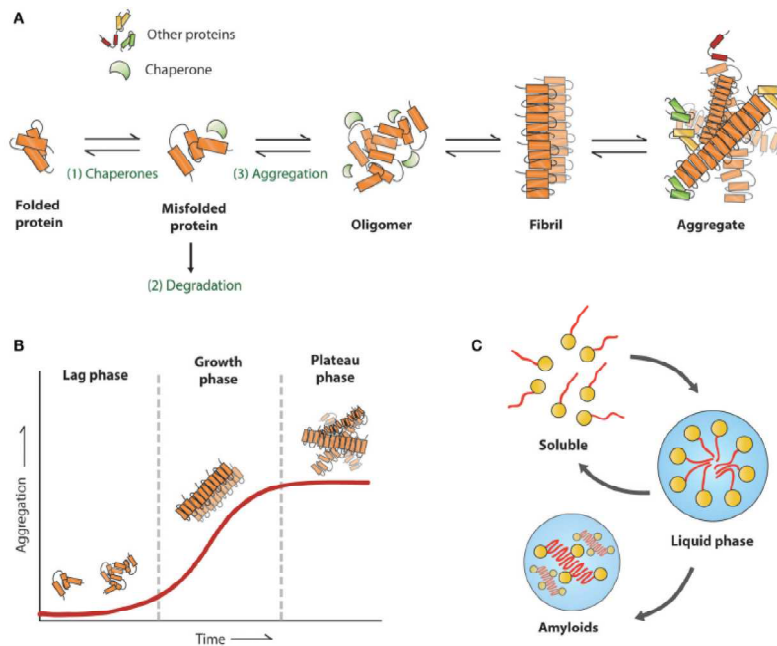


Figure 23: Mécanisme de formation des agrégats

(A) La protéine mal conformée peut être correctement reformée grâce à la présence de molécules chaperonnes qui reconnaissent les domaines hydrophobes de la protéine révélés par sa mauvaise conformation (1). Alternativement la protéine mal conformée va soit être dégradée (2) soit initier l'agrégation qui commence par la formation d'oligomère et qui aboutit à des structures fibrillaires en feuillets β (3). (B) L'étude de l'agrégation sur protéines purifiées *in vitro* montre une agrégation progressive avec le temps divisée en 3 phases : une phase de latence (lag phase), une phase d'expansion rapide (growth phase) et une phase de plateau (plateau phase). (C) Formation des gouttelettes protéiques. Schéma d'après (Stroob et al., 2017)

En 1982, Prusiner propose un nouveau mécanisme pathologique pour la scrapie, une maladie neurodégénérative fatale. Il décrit une protéine qui a tendance à former des fibres amyloïdes mais qui, contrairement aux autres protéines décrites, est infectieuse. Il nomme alors ce type de protéines des protéines « prion » (Prusiner, 1987). Depuis, il a été démontré que la conversion conformationnelle de la protéine prion PrP^c en une forme enrichie en feuillets β (PrP^{Sc}) est à l'origine des maladies prions humains dont la maladie de Creutzfeldt-Jacob est la plus connue (Rambaran and Serpell, 2008). Cette formation de plaques amyloïdes par propagation est propre aux protéines prions mais il a été proposé une propagation type prion pour d'autres maladies neurodégénératives. Il a par exemple été montré que l'injection de fibrilles $\text{A}\beta$ ou d' α -synucléine humain synthétique dans des souris aboutissait au développement de la maladie d'Alzheimer et de Parkinson respectivement associée à de la mort neuronale chez des souris saines (Luk et al., 2012; Stöhr et al., 2012). Récemment, il a été décrit que certaines protéines possédant des domaines type prions étaient capables de s'assembler pour former des corps ribonucléoprotéiques (RNP) fonctionnels sans membranes (figure 23C). Ces structures agissent comme des gouttelettes d'huile dans un

verre d'eau et ont la capacité de s'assembler et de se dissocier rapidement en réponse à différents environnements cellulaires. La formation de ces structures est due à la présence de domaines de faible complexité (LCD) dans certaines protéines qui s'assemblent pour former des gouttelettes protéiques par séparation de phase liquide-liquide (LLPS). Ce mécanisme suscite beaucoup d'intérêt puisqu'il sert à la compartimentation d'organelles cellulaires sans membranes comme les paraspeckles (Courchaine and Neugebauer, 2015), ou les processing body (p-body) dans le cytoplasme (Standart and Weil, 2018) mais est également associé à l'apparition d'agrégats pathologiques sans membrane. Il a par exemple été montré que la protéine FUS, qui contient un domaine type prion dans son domaine N-terminal, formait des gouttelettes dans le cytoplasme en réponse au stress et que ce phénomène était plus rapide avec des protéines mutées provenant de patients ALS (Patel et al., 2015). Il a également été montré que l'exon 1 de la protéine HTT pouvait former des gouttelettes protéiques, un processus enclenché par la queue polyQ ainsi qu'un domaine riche en proline de la protéine. *In vitro* et dans des cellules mammifères, ces gouttelettes peuvent s'assembler pour former des structures solides ayant un aspect fibrillaire. Il a alors été proposé que cette transition de phase des protéines polyglutamine pouvait jouer un rôle dans l'initiation des agrégats pathologiques observés dans différentes maladies (Peskett et al., 2018).

PABPN1 ne contient pas de domaine type prion cependant, en utilisant des logiciels de prédiction de séquence, nous pouvons mettre en évidence que PABPN1 possède des domaines à faible complexité qui se situent au niveau des domaines d'oligomérisation OD1 et OD2 (**figure 24**) et qui pourrait participer à la formation des agrégats. Le même type de résultat avait aussi été montré en 2009 par l'étude de Tavanez et *al.* (Tavanez et al., 2009).

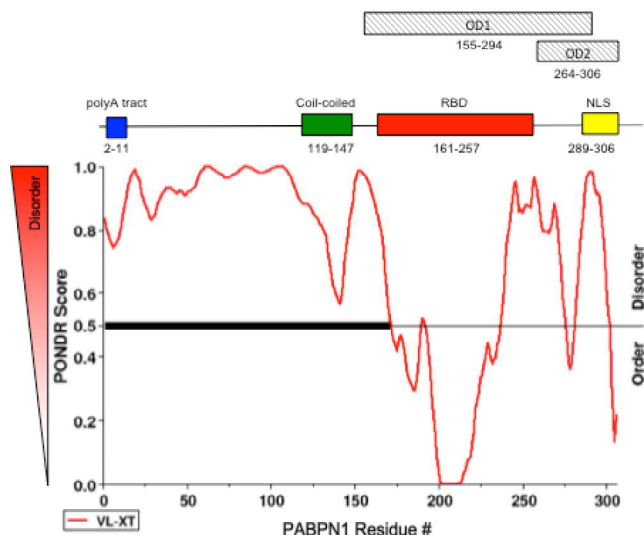


Figure 24: PABPN1 contient des domaines à faible complexité

Graphique produit grâce au logiciel PONDNR (www.pondr.com/; predictor of natural disordered regions) en utilisant l’algorithme VL-XT. Le “Score PONDNR” indique les domaines à faible complexité.

V. Physiopathologie de l’OPMD

Pour l’étude des mécanismes physiopathologiques et le développement de stratégies thérapeutiques, divers modèles cellulaires et animaux OPMD ont été mis au point :

1) Les modèles d’étude de l’OPMD

1.a) Les modèles cellulaires

La plupart des modèles cellulaires consistent à sur-exprimer PABPN1 de manière transitoire. Dans une grande majorité des cas, les cellules utilisées ne sont pas d’origine musculaire (cellules COS-7, HeLa, HEK293, U2OS) et sont donc assez éloignées du contexte OPMD. L’utilisation de ces modèles a cependant permis de comprendre de nombreux rôles de PABPN1 ainsi que de nombreuses propriétés des agrégats (**tableau 3**).

| Année | Reference (journal) | Cellules | Origine | Protocole | Construction |
|-------|--------------------------------|-------------|---------|--------------|-------------------------|
| 2002 | Bao (JBC) | COS-7 | S | transfection | GFP-Ala10, GFP-Ala17 |
| 2003 | Abu-Baker (HMG) | HeLa, COS-7 | H ; M | transfection | Ala10, Ala17 |
| 2004 | Bao (J Med Genet) | COS-7 | S | transfection | Ala10, Ala17 |
| 2005 | Corbeil-Girard (Neurobiol Dis) | A549-tTA | H | transduction | GFP-Ala10, Ala13, Ala17 |
| 2005 | Abu-Baker (Traffic) | HeLa | H | transfection | Ala10, Ala17 |

| | | | | | |
|------|----------------------------------|---------------------------|-----------|--------------|-------------------------|
| 2005 | Wang (HMG) | Hela | H | transfection | GFP-Ala10, GFP-Ala17 |
| 2005 | Tavanez | Hela, C2C12 | H ; M | transfection | GFP-Ala10 |
| 2006 | Verheesen (HMG) | Hela, COS-1 | H, S | transfection | Ala17 |
| 2006 | Sasseville (Neurobiol Dis) | A549-tTA | H | transduction | GFP-Ala10, Ala13, Ala17 |
| 2006 | Davies (HMG) | COS-7 | S | transfection | Ala10, Ala17 |
| 2008 | Catoire (HMG) | COS-7 | S | transfection | GFP-Ala10, GFP-Ala17 |
| 2010 | Apponi (HMG) | Mb primaires | M | transfection | siRNA KD PABPN1 |
| 2010 | Davies (Science Trans Med) | C2C12, HEK293, COS-7, hMb | H ; M ; S | transfection | Ala17 |
| 2011 | Raz (Nucleus) | U2OS | H | transfection | Ala10, Ala16 |
| 2011 | Raz (Am J Pathol) | Mb immortalisés | S | transduction | Ala10, Ala17 |
| 2011 | Anvar (Sk Muscle) | C2C12 | S | transfection | YFP-Ala16 |
| 2012 | Bengoecha (Neurobiol Dis) | Mb primaires | H | transfection | Ala10, Ala17 |
| 2012 | Bhattacharjee (Cell Biol Intern) | Hela, HEK293 | H | transfection | Ala10, Ala17 |
| 2012 | Jenal (Cell) | U2OS | H | transfection | Ala17, siRNA KD PABPN1 |
| 2012 | Mamchaoui (Sk Muscle) | Mb immortalisés | H | | Cellules de patients |

Tableau 3: Modèles cellulaires de l'OPMD

Mis à part les myoblastes immortalisés humains (Mamchaoui 2012), tous ces modèles sur-expriment PABPN1 muté. Les modèles musculaires sont en bleu. M : souris ; H : humain ; S : singe. GFP : Green Fluorescent Protein, KD : knock-down

Par ailleurs, il est important de noter que quelques modèles cellulaires musculaires OPMD ont été créés et ils seront détaillés ci-dessous :

1/ Une lignée de myoblastes murins exprimant PABPN1 de façon conditionnelle.

Cette lignée nommée H2Kb-IM2 consiste en des myoblastes primaires issus de souris portant un gène d'immortalisation thermolabile (transgène du large antigène T SV40) sous le contrôle du promoteur inductible H2Kb. Ainsi en condition permissive (en présence d'interféron γ actif à 33°C), le transgène est activé et permet aux myoblastes de se diviser au delà de 80 divisions, comme des cellules immortalisées. En condition non-permissive (37°C sans interféron), elles peuvent fusionner et se différencier à la manière de cellules primaires (Morgan et al., 1994).

Pour obtenir un modèle OPMD, cette lignée a été transfectée de manière stable avec une construction PABPN1 sauvage de 10 alanines (WTA ou Ala10) ou PABPN1 mutée de 17 alanines (D7e ou Ala17) sous le contrôle d'un promoteur desmine. Ainsi, l'expression de desmine lors de la fusion/différenciation permet la surexpression des constructions de PABPN1 et la formation d'agrégats dans les noyaux des myotubes.

Ces cellules constituent un bon modèle pour étudier l'agrégation de PABPN1 *in vitro* dans un contexte musculaire (Klein et al., 2016; Malerba et al., 2019; Raz et al., 2011b).

2/ Une lignée de myoblastes humains immortalisés issus de patient OPMD (Mamchaoui et al., 2011). Ces cellules ont été isolées de biopsies de patients OPMD et ont été transduites avec des vecteurs viraux exprimant la télomérase (*hTERT*) et la kinase dépendante de la cycline 4 (*Cdk4*) : l'expression de ces deux protéines permet l'élongation des télomères et l'inhibition de la voie p16 respectivement, deux paramètres indispensables à l'immortalisation des myoblastes (Zhu et al., 2007). Bien que ces cellules permettent l'étude de nombreuses caractéristiques de l'OPMD, elles ne présentent pas d'agrégats en culture.

1.b) Les modèles animaux

De nombreux modèles animaux ont également été créés pour l'étude de l'OPMD (Tableau 4). Parmi les plus utilisés on peut citer :

1/ Un modèle murin (souris A17) où le gène PABPN1 muté (17 alanines) est surexprimé (de 10 à 30 fois plus que PABPN1 endogène) uniquement dans les muscles (promoteur HSA pour human skeletal actin). Le phénotype observé chez ces souris récapitule bien celui observé chez l'homme. Premièrement, on observe des agrégats dans tous les muscles avec un pourcentage croissant dans le TA. Deuxièmement, on observe un défaut de force musculaire, de la fibrose, une atrophie et des défauts mitochondriaux (Davies, 2005; Randolph et al., 2014; Trollet et al., 2010).

2/ Un modèle de nématode exprimant la forme mutée de PABPN1 sous le contrôle d'un promoteur muscle spécifique (*Myo3*). Chez ce modèle on observe une altération de la mobilité et une dégénérescence cellulaire (Catoire et al., 2008)

3/ Un modèle de drosophile exprimant également PABPN1-17 alanines sous le contrôle d'un promoteur muscle spécifique (*Mhc-Gal4/UAS*). On retrouve également chez ce modèle des agrégats dans les muscles ainsi qu'un défaut de positionnement des ailes et une dégénérescence musculaire (Chartier et al., 2006).

4/ Depuis 2017, un nouveau modèle murin hétérozygote pour la mutation dans PABPN1 et génétiquement plus fidèle à la maladie humaine, a été élaboré par une équipe américaine. Ce dernier est une souris transgénique *Pabpn1*^{+A17} où un allèle du gène *PABPN1* a été retiré par le système cre-Lox (knock-out) et remplacé par un allèle muté (7 expansions GCG) par recombinaison homologue (knock-in). Le transgène est exprimé dans tous les tissus, incluant le tissu germinatif et son niveau d'expression est comparable à celui d'une souris sauvage. Ce modèle présente un pourcentage croissant d'agrégats de PABPN1 dans le

TA avec environ 7% à 3 mois et 10% à 18 mois. Ces souris présentent également des défauts observés dans les autres modèles mais de manière plus modeste : des myofibres de tailles plus petites, un raccourcissement de la taille des queues poly(A), un décalage dans l'utilisation du signal de polyadénylation et l'évidence de défauts mitochondriaux (Vest et al., 2017). Ce modèle est le plus pertinent pour étudier l'OPMD car il correspond à une phénocopie de la maladie humaine.

| | Souris | | | | Drosophile | Nématode | |
|-----------------------|--|---|---|--|--|---|--|
| Référence | Hino et al. 2004 | Davies et al. 2005 | Dion et al. 2005 | Vest et al. 2017 | Mankodi et al. 2011 | Chartier et al. 2006 | Catoire et al. 2008 |
| Type de modèle | Sur-expression | Sur-expression | Sur-expression | Knock-in ubiquitaire PABPN1-17ala par système Cre-LoxP | Sur-expression | Sur-expression | Sur-expression |
| Promoteur | CAG - ubiquitaire | HSA - muscle spécifique | PABPN1 - ubiquitaire | | inductible MFP - ubiquitaire | (Mhc)-Gal4/UAS - muscle spécifique | myo3 - muscle spécifique |
| Transgène | (GCN)13/Ala13 | (GCN)17/Ala17 | (GCN)17/Ala17 | | (GCN)16/Ala16 | (GCN)17/Ala17 | (GCN)13/Ala13:GFP |
| Agrégats | Oui | Oui | Oui - neurones | Oui | Oui - réversible | Oui | |
| Phénotype musculaire | Faiblesse progressive (Test de résistance à la charge) | Faiblesse progressive (force d'agrippement) | faiblesse (force d'agrippement) mais atteinte neurologique prédominante | Pas de faiblesse observée à 6, 12 et 18 mois | Dégénérescence musculaire | Défaut progressif du positionnement des ailes et dégénérescence | défauts de mobilité et dégénérescence cellulaire |
| Phénotype additionnel | diminution de la survie, poids du corps | Aucun | Défauts locomoteurs, phénotype neuronale | Rétractation des pattes à 9 mois | Diminution de la survie, cardiomyopathie | Aucun | Aucun |
| Fond génétique | C57Bl6 | FvB | C57Bl6 | C57Bl6 | FVB/C57Bl6 | | |

Tableau 4: Modèles animaux de l'OPMD

2. Mécanismes moléculaires de l'OPMD

Le lien entre la mutation dans PABPN1 et les mécanismes physiopathologiques de l'OPMD n'est pas encore totalement élucidé. Cependant, l'utilisation des modèles cellulaires et animaux sur-exprimant PABPN1 mutée a permis d'ajouter plusieurs pièces au puzzle en mettant en évidence des dérégulations moléculaires associées à la maladie.

L'utilisation de matériel humain issu de biopsies de patients OPMD constitue le meilleur modèle pour étudier la maladie et il est indispensable de pouvoir vérifier chez l'homme ce qui a été démontré dans les modèles.

L'ensemble des dérégulations observées jusqu'ici est détaillé ci-dessous:

2.a) Dérégulation des systèmes de dégradation

Afin d'éviter l'accumulation de protéines non fonctionnelles, la cellule met en place deux voies de dégradation principale permettant l'élimination de protéines intracellulaires : **le système ubiquitine-protéasome (UPS) et l'autophagie.**

Dans le cas de l'UPS, les protéines destinées à être dégradées sont « taguées » au niveau d'une lysine par un chapelet de protéines ubiquitine. Cette réaction se fait au moyen d'une cascade enzymatique en trois étapes nécessitant les enzymes E1, E2 et E3. Après plusieurs répétitions de ce cycle, le substrat polyubiquitiné est reconnu par le protéasome pour être dégradé. Le protéasome 26S est composé d'au moins 32 sous-unités, très conservées chez les eucaryotes et présentes à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme. Le substrat ubiquitinylé est reconnu et dé-ubiquitinylé par la sous-unité 19S avant d'être pris en charge par la sous-unité 20S (**figure 25**) (Roos-Mattjus and Sistonen, 2004).

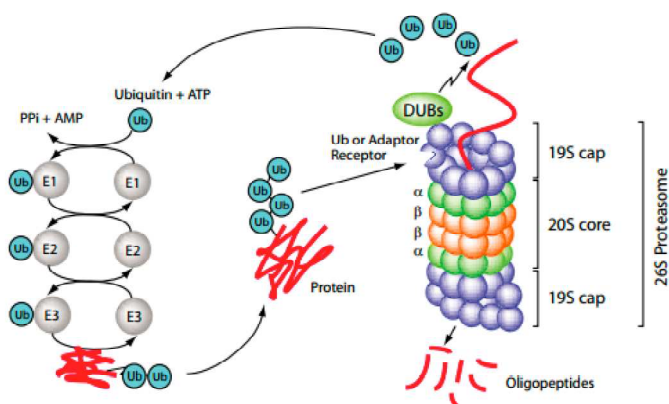


Figure 25: Le système ubiquitine-protéasome.

Image disponible sur <https://www.caltagmedsystems.fr>

Il a été proposé que les agrégats de PABPN1 soient une conséquence du dysfonctionnement de ce système. En effet, il a été montré *in vitro*, qu'inhiber le protéasome en utilisant des inhibiteurs spécifiques favorisait l'apparition d'agrégats dans le noyau de cellules surexprimant PABPN1-17 alanines (Abu-Baker et al., 2003; Raz et al., 2011b).

Par ailleurs, les protéines **ubiquitine et protéasome 26S ont été décrites dans les agrégats** de PABPN1 chez l'homme (Calado et al., 2000b) mais aussi dans les modèles cellulaires (Abu-Baker et al., 2003; Bao et al., 2002; Raz et al., 2011b) et animaux (Chartier et al., 2006; Raz et al., 2013b). Ceci suggère soit que ces protéines sont piégées dans les agrégats soit qu'elles sont présentes pour éliminer les agrégats mais en sont incapables.

Pour confirmer l'implication du système UPS dans l'OPMD, **une analyse transcriptomique croisée sur tissu humain, murin et drosophile OPMD** a été réalisée et révèle que les gènes codants les protéines du catabolisme sont majoritairement dérégulés dans l'OPMD. Au total 16%, 32% et 25% des gènes annotés comme appartenant à l'UPS sont dérégulés dans les modèles drosophile, murins et chez les patients OPMD respectivement. Ils observent qu'au sein des 3 espèces, les ligases E3, les enzymes de déubiquitinations (DUBs) et le protéasome sont dérégulés. Enfin les auteurs montrent que dans des myotubes de C2C12 sur-exprimant PABPN1 mutée, les ligases E3 Arih1, Asb11, Ddb1 co-localisent avec les agrégats. Ils suggèrent alors que les dérégulations du système UPS observées chez l'homme la souris et la drosophile pourraient venir de la perte de fonction des protéines de ce système piégées dans les agrégats (Anvar et al., 2011).

Une étude récente propose que l'autophagie soit également altérée dans l'OPMD. La macro-autophagie ou autophagie est l'autre mécanisme de dégradation conservé chez les eucaryotes qui consiste dans l'autodigestion de composés intracellulaires par les cellules elles-mêmes. Ce processus nécessite la formation de l'autophagosome, séquestrant le matériel cytoplasmique à dégrader, grâce aux protéines de la famille ATG (Yu et al., 2018).

Parmi les gènes du catabolisme dérégulés dans l'OPMD dans l'étude de Anvar *et al.* (Anvar et al., 2011), un cluster de gènes de la famille ATG a été identifié (Raz et al., 2017). Dans le muscle soléaire de la souris OPMD A17.1, il a été montré que plusieurs gènes ATG étaient sous-exprimés en raison d'un glissement du site distal vers le site proximal de polyadénylation. Dans le modèle cellulaire murin Ala17, il a été montré que l'autophagie était diminuée spécifiquement dans les myotubes OPMD comparés au myotubes contrôles (Ala10). Enfin, dans les myoblastes humains, les auteurs montrent qu'une diminution de l'expression de PABPN1 entraîne une dérégulation des gènes de l'autophagie.

Ces résultats suggèrent que l'autophagie est également altérée dans l'OPMD.

2.b) Des défauts mitochondriaux

Les mitochondries sont les réservoirs énergétiques des cellules eucaryotes et elles utilisent l'énergie relarguée par l'oxydation du glucose et autres sucres pour produire de l'ATP. Le métabolisme des mitochondries passe par les complexes I à IV de la chaîne respiratoire, située dans la membrane interne des mitochondries et permet le transfert d'électrons grâce à plusieurs différentes étapes d'oxydo-réduction à travers la membrane mitochondriale (Sousa et al., 2018).

C'est avant même la découverte des agrégats nucléaires de PABPN1 que Julien et al. décrivent par microscopie électronique **des mitochondries anormales présentant des inclusions pathologiques dans le muscle d'un patient atteint de l'OPMD** (Julien et al., 1974). Depuis, de nombreuses études confirment ce défaut même si les ultrastructures décrites ne sont pas toujours les mêmes (Pratt and Meyers, 1986; Sadeh et al., 1993; de Seze et al., 1997; Wong et al., 1996). Ces observations histologiques ont par la suite été complétées par la détection de délétion dans l'ADN mitochondrial de patients OPMD dans deux études (Lezza et al., 1997; Muqit et al., 2008).

L'étude de muscle cricopharyngien particulièrement atteint dans l'OPMD révèle que les fibres IIa, peu chargées en mitochondries, sont préférentiellement atrophiées par rapport aux fibres de type I. Les auteurs suggèrent qu'en raison de la faible concentration de ces fibres II en mitochondrie, ces dernières seraient plus sensibles aux défauts mitochondriaux et donc préférentiellement atteintes (Gidaro et al., 2013).

En 2015, une étude analyse transcriptomique réalisée sur la drosophile OPMD met en évidence que la voie mitochondriale est majoritairement dérégulée au stade précoce de la maladie, c'est-à-dire à 2 jours de développement chez la mouche, avant l'apparition de la dégénérescence musculaire (Chartier et al., 2015). En particulier, de nombreux gènes nucléaires des complexes I, II, III et IV de la voie respiratoire sont sous-exprimés dans les muscles du modèle drosophile OPMD. En complément, chez la souris OPMD, les auteurs démontrent également une diminution dans l'expression de plusieurs gènes mitochondriaux des différents complexes et ce dès les stades précoces de la maladie (dès 6 semaines). Enfin, même si le mécanisme n'est pas démontré chez l'homme, ces défauts mitochondriaux semblent conservés puisque 37%, 11%, 6% et 52% des gènes des complexes I, III, IV et V sont respectivement sous-exprimés dans les muscles des patients OPMD.

2.c) Des signes d'apoptose

L'apoptose est le processus par lequel les cellules déclenchent leur autodestruction. A l'état physiologique, ce phénomène est mis en jeu dans de nombreux processus cellulaires et son bon déroulement est notamment indispensable à la morphogenèse (Monier and Suzanne, 2015). L'apoptose a été décrite dans plusieurs pathologies dont plusieurs myopathies comme la dystrophie musculaire de Duchenne, l'atrophie musculaire spinale, ou la dystrophie musculaire facio-humérale (Girgenrath et al., 2004; Sandri et al., 2001; Serdaroglu et al., 2002).

Dans le cadre de l'OPMD, **de la mort cellulaire par apoptose a été démontré dans des modèles cellulaires de surexpression de PABPN1 muté (Bao et al., 2004; Bhattacharjee et al., 2012) ou de sous-expression de PABPN1 sauvage (Bhattacharjee and Bag, 2012)**. Chez l'animal, les modèles de surexpression souris et drosophile de PABPN1 mutée démontrent de l'apoptose associée à une dégénérescence musculaire par des techniques de marquage TUNEL, d'activation de la caspase-3 ou de détection du cytochrome *c* dans les myofibres (Chartier et al., 2006; Davies et al., 2005, 2010). **L'apoptose a été au moins en partie associée aux agrégats de PABPN1** puisqu'il a été montré que l'utilisation de tréhalose ou de doxycycline dans le modèle murin A17 permettait une diminution du nombre de noyaux avec agrégats associée à une diminution de l'apoptose et à une amélioration des phénotypes musculaires (Davies, 2005; Davies et al., 2005, 2010). Il a été montré que la surexpression de PABPN1 sauvage dans un modèle cellulaire ou murin sur-exprimant PABPN1 muté permettait d'améliorer la toxicité cellulaire mais sans diminuer le pourcentage d'agrégats (Davies et al., 2008). De cette observation, il a été suggéré que le potentiel anti-apoptotique de PABPN1 sauvage était inhibé par sa séquestration dans les agrégats. En 2011, Davies et *al.* précisent le rôle de l'apoptose dans la pathogenèse de l'OPMD en montrant que cette dernière contribue majoritairement à la faiblesse et au dysfonctionnement musculaire. Ils montrent qu'en croisant une souris sur-exprimant la molécule anti-apoptotique BCL2 avec la souris OPMD A17, la force et la faiblesse musculaire ainsi que le poids des souris sont restaurées (Davies and Rubinsztein, 2011).

2.d) Un vieillissement prématuré

Le vieillissement musculaire (ou sarcopénie) est marqué notamment par une diminution de la masse musculaire (atrophie), une infiltration graisseuse et une inflammation qui participent à la diminution de la force musculaire. Au niveau moléculaire, l'âge a un impact

sur le métabolisme de la cellule et notamment sur sa capacité à replier correctement les protéines. La conséquence directe de ces changements moléculaires est l'apparition de maladies dite du vieillissement comme la maladie de Parkinson ou d'Alzheimer où on observe l'accumulation progressive d'agrégats insolubles dans les neurones des patients.

Plusieurs études ont observé des signes de vieillissement prématuré dans l'OPMD.

Premièrement l'apparition tardive de l'OPMD suggère fortement qu'en plus de la mutation dans PABPN1 des changements moléculaires liés à l'âge participent à la survenue de la maladie. La comparaison des transcriptomes de patients contrôles âgés (> 85 ans) et de patients OPMD (<70 ans) montre que près d'un tiers des gènes dérégulés avec l'âge le sont aussi avec l'OPMD (Anvar et al., 2013).

L'ensemble de ces données suggère que l'OPMD pourrait représenter un état de vieillissement prématuré.

2.e) Des dérégulations du métabolisme des ARN

En raison du rôle essentiel de PABPN1 dans la maturation des ARN, plusieurs études se sont intéressées à l'impact de la mutation sur le métabolisme des ARN.

Trois études démontrent des dérégulations du métabolisme de l'ARN chez l'homme. Tout d'abord, en utilisant des puces à exons, une étude réalisée au laboratoire a permis d'identifier des défauts d'épissage sur biopsies humaines OPMD (Klein et al., 2016). En particulier, il a été montré que le pré-ARNm de *TNNT3* était piégé dans les agrégats de PABPN1, le délocalisant ainsi des « speckles » nucléaires où il est normalement épissé par le facteur SC35, créant donc un défaut d'épissage de ce pré-ARNm. Il reste à déterminer si ce défaut d'épissage lié aux agrégats est un mécanisme générique ou non. Ensuite il a été montré une diminution de l'expression et un raccourcissement de la queue poly(A) des ARN mitochondriaux chez les patients OPMD (Chartier et al., 2015). Enfin, une étude récente démontre la surexpression du microARN *let7*, impliqué dans le vieillissement musculaire, sur biopsies de patients OPMD par rapport à des biopsies de sujets contrôles du même âge (Cappelletti et al., 2019)

Chez la souris OPMD, il a été montré que le choix dans le site de polyadénylation (PAS) était globalement modifié depuis le site distal vers le site proximal ce qui s'accompagne d'une accumulation de transcrits de petite taille (Jenal et al., 2012; de Klerk et al., 2012; Vest et al., 2017). Ce résultat reste à démontrer chez l'homme.

L'ensemble de ces résultats suggère que le métabolisme des ARN pourrait effectivement être altéré dans l'OPMD et les résultats d'une analyse transcriptomique réalisée au laboratoire entre muscles de patients contrôles et OPMD de même âge sont actuellement en cours d'analyse. Ils permettront d'évaluer si l'expression des ARN (ARNm, lncRNA, sncRNA), leur épissage, leur polyadénylation alternative et leur édition sont altérés chez les patients OPMD.

VI. Thérapies

1. Interventions médicales

Aujourd'hui, il n'existe pas encore de traitement curatif pour l'OPMD. La seule manière de soulager les patients reste l'intervention chirurgicale pour corriger le ptosis et la dysphagie.

La chirurgie du ptosis est indiquée dès lors que la chute des paupières devient trop invalidante. L'opération consiste souvent en **une résection du muscle releveur de la paupière** qui est facilement réalisée mais nécessite souvent d'être répétée une ou deux fois (Rodrigue and Molgat, 1997). Une autre technique consiste dans la **suspension de la paupière supérieure au muscle frontal** en utilisant le fascia du muscle. Cette technique a l'avantage d'être permanente (Codère et al., 2001).

Pour soulager les muscles du pharynx, **une myotomie cricopharyngienne extra muqueuse** est souvent réalisée chez les patients OPMD. La technique consiste en une incision cervicale le long du muscle cricopharyngien permettant de sectionner le muscle depuis l'hypopharynx jusqu'à l'œsophage cervical (Duranceau, 1997). Plusieurs études montrent qu'à court terme, cette procédure est extrêmement bénéfique puisque 75% des patients ayant suivi une myotomie présentent une amélioration des symptômes dans les 9 à 14 mois après l'intervention (Duranceau, 1997). La déglutition est notamment améliorée par une propulsion efficace du pharynx qui peut être associée ou pas à une prise de poids (Fradet et al., 1997; Périé et al., 1997). Le suivi de patients après myotomie sur une période plus longue montre cependant qu'en moyenne une dégradation de la déglutition survient entre 17 et 48 mois après l'intervention (Coiffier et al., 2006).

Une autre technique, moins invasive, a été proposée pour soulager la dysphagie chez les patients OPMD. Elle correspond à **une dilatation endoscopique du sphincter supérieur de l'œsophage** réalisée en ambulatoire en introduisant une bougie de Savary-Gilliard par l'estomac pour la faire remonter dans le segment cricopharyngée. Le passage de la bougie

induit une dilatation de 18 mm et la procédure peut être répétée plusieurs fois chez le même patient. Cette technique a prouvé son efficacité sur 14 patients OPMD chez qui la dysphagie a été améliorée jusqu'à 3 mois après la dilatation (Mathieu et al., 1997). Le suivi de 9 patients OPMD opérés suivant cette procédure montre qu'en moyenne 73% des patients présentent une amélioration de la dysphagie sur 3 à 15 ans en ayant subi entre 1 et 16 dilatations (Manjaly et al., 2012).

Enfin, **une injection de toxine botulique** directement dans le CPM chez une patiente atteinte d'OPMD montre une amélioration de la dysphagie 48h après le traitement et efficace pour une durée de 4 mois (Restivo et al., 2000).

2. Thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire consiste à transplanter des cellules afin de restaurer un tissu ou un organe. Les cellules transplantées peuvent être de différentes origines : soit elles proviennent de donneur sain (greffe hétérologue) soit elles proviennent du sujet malade lui-même (greffe autologue). Chez l'homme, la faisabilité d'une stratégie de thérapie cellulaire musculaire a été démontrée en greffant des myoblastes d'une patiente asymptomatique pour la dystrophie musculaire de Duchenne à sa sœur jumelle symptomatique pour la maladie (Tremblay et al., 1993). Cependant, dans des dystrophies musculaires comme celle de Duchenne où l'ensemble des muscles est touché, l'injection de myoblastes en intramusculaire n'est pas la meilleure des stratégies. Dans le cas de l'OPMD, la thérapie cellulaire par injection de myoblastes est particulièrement adaptée puisque les atteintes musculaires sont restreintes et les muscles touchés sont petits.

Il a été montré au laboratoire que les cultures primaires issues de muscles CPM OPMD se comportent différemment des cellules d'un muscle OPMD non atteint : alors que les capacités de prolifération et de fusion des myoblastes issus de CPM OPMD sont affectées, les cellules issues de muscle OPMD cliniquement non atteint ne présentent pas ces défauts (Périé et al., 2006).

Par conséquent, il a été proposé qu'une transplantation autologue de cellules de muscle cliniquement non atteint dans le muscle cricopharyngien pourrait être une bonne stratégie de thérapie cellulaire.

La faisabilité d'une greffe autologue dans les muscles du pharynx a d'abord été évalué dans un modèle de chien (Périé et al., 2006) avant d'envisager la technique chez l'homme :

des cellules issues du biceps fémoral de chien ont été cultivées *in vitro* avant d'être injectées dans le pharynx. Les résultats montrent qu'un mois après injection, les cellules sont toujours présentes et capables d'enclencher la régénération du muscle après dommage.

Une phase clinique I/IIa a alors été réalisée sur 12 patients OPMD chez qui des biopsies de muscles cliniquement non atteints SCM et QM ont été effectuées afin d'amplifier les cellules musculaires. Une quantité médiane de 178 millions de cellules présentant plus de 80% de myogénicité a été injectée en parallèle d'une myotomie extramucosale. De plus, au moment de l'injection, le muscle pharyngien a été scarifié au scalpel afin de créer un dommage et d'activer la régénération. Les patients ont ensuite été suivis 1, 6, 12, 18 et 24 mois après l'opération et l'amélioration de la dysphagie a été évaluée par vidéofluoroscopie, par des mesures de la vitesse de déglutition, par des examens cliniques et par des questionnaires portant sur la qualité de vie. Les résultats suggèrent que **la greffe autologue couplée à la myotomie chez des patients OPMD améliore les capacités de déglutition avec un effet cellulaire dose-dépendent et sans dégradation de la déglutition 2 ans après l'opération (figure 26) (Périer et al., 2014).**

Malgré l'amélioration des symptômes après cette stratégie de thérapie cellulaire, les cellules injectées sont toujours porteuses de la mutation dans *PABPN1*.

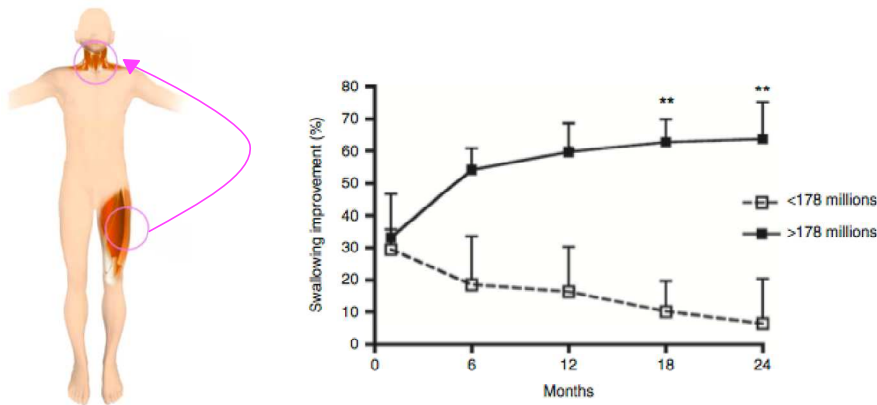


Figure 26: La thérapie cellulaire autologue améliore la déglutition dans l'OPMD

Thérapie cellulaire autologue de myoblastes issus de QM de patient OPMD dans le CPM du même patient. Le graphe montre une amélioration de la dysphagie jusqu'à deux ans après l'intervention dépendante de la dose de cellules injectées.

3. Thérapie génique

L'agence européenne du médicament (EMA) définit qu'un produit de thérapie génique doit remplir deux critères : 1/ il doit contenir une substance active correspondant à un acide nucléique recombinant administré à l'homme dans le but de réguler, réparer, remplacer ou ajouter/supprimer une séquence génétique ; 2/ ses effets thérapeutiques, prophylactiques et diagnostiques concernent directement les séquences en acide nucléique recombinant qu'il contient (Wirth et al., 2013).

Les premiers essais de thérapie génique au début des années 2000 se sont heurtés à des problèmes d'intégrations non spécifiques des vecteurs viraux dans le génome des patients conduisant à la suspension des essais cliniques (Hacein-Bey-Abina et al., 2008; McCormack and Rabbitts, 2004; Raper et al., 2003). Vingt ans plus tard, grâce à une meilleure connaissance et à une maîtrise approfondie des vecteurs de thérapie génique, les premiers succès voient le jour. Dans le cas des maladies neuromusculaires, le développement de thérapies géniques utilisant des virus associés à l'adénovirus (AAV) est particulièrement prometteur. On peut notamment citer plusieurs essais cliniques de phase I/II pour le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne et en 2018, le lancement du premier essai clinique de phase III pour le traitement l'atrophie musculaire spinale (SMA) (Wang et al., 2019).

Parmi la variété de vecteurs viraux ou non viraux, l'utilisation des AAV est particulièrement pertinente pour les thérapies géniques musculaires car ils sont non intégratifs et peu immunogènes (Wang et al., 2019). Pour ces raisons, seuls les AAV seront décrits dans la partie qui suit :

3.a) Les virus associés à l'adénovirus (AAV)

Les virus de type AAV sont actuellement parmi les plus utilisés pour les stratégies de thérapie génique. Ils correspondent à des petits virus à ADN (20nm), non pathogènes, non enveloppés et non réplicatifs. Ils ont la capacité d'encapsider un ADN de 4,8 kb maximum (Naso et al., 2017). Pour être utilisé comme vecteur de thérapie génique, le virus AAV doit contenir le gène d'intérêt qui est inséré entre les répétitions terminales inversées (ITR) à la place du génome viral (AAV recombinant). Ce type de virus a une grande capacité à infecter *in vivo* les cellules quiescentes et réplicatives faisant de lui un vecteur de choix pour les thérapies du muscle ou du cerveau (Hocquemiller et al., 2016).

Le challenge des stratégies AAV est de pouvoir produire des virus peu immunogène et non toxique en grande quantité et à faible coût. Afin de produire les virus, on réalise une

triple transfection dans des cellules mammifères exprimant le gène adénoviral E1 nécessaire à la réplication de l'AAV dans des cellules HEK293T (Ayuso et al., 2010). Les cellules sont donc transfectées avec un AAV portant la séquence d'intérêt, un AAV contenant les gènes *rev* et *cap* et un AAV contenant certains gènes d'adénovirus dit Ad helper (Naso et al., 2017) (figure 27). A la suite de la production, les virus sont purifiés et pourront servir pour les essais sur le patient.

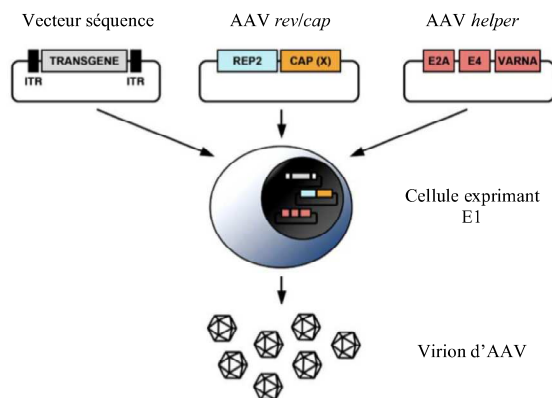


Figure 27: Production de virus par triple transfection

Le vecteur séquence contient le gène d'intérêt.

L'AAV *rev/cap* contient les gènes nécessaires à la réplication et au conditionnement (*rev*) et à la production des protéines de capsid (*cap*). Le sérotype des protéines Cap détermine celui de l'AAV produit.

L'AAV Ad helper porte le minimum de gènes adénovirus requis pour la réplication de l'AAV.

Adapté de Ayuso et al. 2010

3.b) Thérapie génique pour l'OPMD

Pour l'OPMD, l'objectif est de corriger l'allèle malade sans que ceci n'ait d'impact sur l'allèle sain. Il a été proposé d'éteindre uniquement l'allèle muté en utilisant des ribozymes à tête de marteau qui sont des petits ARN qui peuvent être dirigés vers un transcrit particulier, enclencher son clivage et donc supprimer l'expression du gène en question (Kharmia et al., 2016). Cependant, il est difficile de cibler spécifiquement l'allèle muté car l'expansion a lieu dans l'exon 1 du gène *PABPN1* qui est naturellement riche en répétition guanine-cytosine (GC).

Ainsi, une stratégie de thérapie génique a été imaginée en combinant un premier AAV exprimant une triple cassette de petits shARN permettant par ARN interférence d'éteindre l'expression de *PABPN1* muté et sauvage (shRNA3x) et un second AAV exprimant le gène sauvage de *PABPN1* mais dont la séquence a été modifiée grâce à la redondance du code génétique pour être résistante à l'ARN interférence (figure 28).

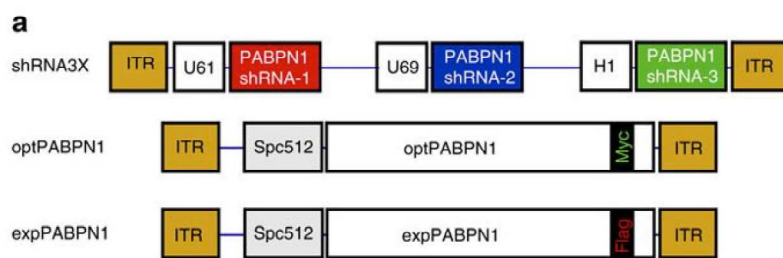


Figure 28: Constructions pour thérapie génique dans l'OPMD

shRNA3x :sh1 et sh3 contiennent des séquences ciblant PABPN1 humain, murin et bovin et sh2 cible PABPN1 humain et bovin. Chacun d'entre eux est placé sous un promoteur différent de la polymérase III (U61, U69 et H1).

optPABPN1 : séquence PABPN1 optimisée grâce à la redondance du code génique pour qu'elle échappe à l'extinction par les shRNA. Elle présente 25% de différence avec la séquence endogène.

Les résultats sur le modèle murin A17 de l'OPMD montrent que cette stratégie combinée permet de diminuer le pourcentage d'agrégats, d'améliorer la force musculaire, de diminuer la fibrose, d'augmenter la taille des fibres, et de diminuer l'expression de protéines de la matrice extracellulaire. De plus 98% des gènes dérégulés dans la souris OPMD sont normalisés après traitement par thérapie génique (Malerba et al., 2017).

Cette double stratégie d' « extinction-remplacement » est indispensable au succès de la thérapie, tout au moins chez la souris OPMD, où PABPN1 mutée est surexprimée. En effet, la mutation dans PABPN1 aboutit à la formation d'agrégats pouvant à la fois jouer un rôle de gain de fonction toxique en séquestrant protéines et ARN et de perte de fonction de PABPN1 (voir partie « agrégats »). Ainsi, l'apport seul du virus AAV-optPABPN1 permet certes d'apporter plus de PABPN1 sauvage mais ne permet pas de supprimer les effets toxiques des agrégats (perte ou gain de fonction). De la même manière, l'apport du virus AAV-shRNA3X seul ne permet pas d'améliorer la pathologie car même si il permet de diminuer le nombre d'agrégats il affecte aussi le niveau de PABPN1 normal, ce qui est délétère pour le muscle (Malerba et al., 2017).

Une nouvelle construction AAV combinant en une seule cassette comprenant la séquence optPABPN1 et 2 shMIR ciblant PABPN1 en 3' de la séquence codante a depuis été élaborée par le laboratoire, l'équipe de George Dickson et la société Benitec BioPharma. Ces résultats seront présentés en annexe. L'AAV résultant appelé BB-301 a reçu « l'orphan drug designation » de la FDA et de l'Agence européenne du médicament en 2017 (Suhy et al., 2017). Depuis la société Axovant a obtenu une licence pour le projet en vue d'un développement clinique.

4. Stratégies anti-agrégats :

Plusieurs études ont démontré que diminuer le nombre d'agrégats dans des modèles animaux ou cellulaire de l'OPMD permettait d'améliorer les phénotypes musculaires et la toxicité cellulaire. La majorité de ces études utilisent des molécules pharmacologiques comme stratégies anti-agrégats et elles seront détaillées comme suit :

- **Les protéines chaperonnes HSP70/HSP40:** ces protéines ont la propriété de se fixer aux protéines dénaturées ou mal conformées afin de les aider à se replier correctement ou de les diriger vers la machinerie de dégradation. Il a ainsi été montré dans plusieurs modèles cellulaires et animaux de maladies à agrégats comme l'ataxie spinocerebelleuse de type 3, la maladie de Huntington ou la maladie de Parkinson que la surexpression de HSP70 permettait de diminuer le pourcentage d'agrégats ainsi que la toxicité cellulaire (Carmichael et al., 2000; Chai et al., 1999b; Klucken et al., 2004). Il a été montré *in vitro* que la surexpression des protéines chaperonnes HSP40, HSP70 et de la co-chaperonne de HSP70 HDJ-1 dans un modèle cellulaire de l'OPMD aboutissait à une diminution du pourcentage d'agrégats associée à une diminution de la toxicité cellulaire dès 48h après le traitement (Bao et al., 2002, 2004). Par la suite, il a été montré dans des cellules HeLa surexprimant PABPN1 mutée que l'induction de l'expression de HSP70 par des molécules thérapeutiques comme le sulfate de zinc (ZnSO₄) (nutriment minéral essentiel), l'hydroxyquinoline (anti-microbienne), l'ibuprofène, l'indométacine (anti-inflammatoires) (Wang et al., 2005) et la molécule Adapt-232 (composition d'herbes naturelle et médicinale) (Abu-Baker et al., 2016) permettait de réduire les agrégats et la mort cellulaire.

- **La doxycycline est un antibiotique de la famille des tétracyclines approuvé par la FDA.** En raison de son rôle anti-amyloïde mis en évidence *in vitro* sur protéine purifiée (Forloni et al., 2001), la doxycycline a été testée sur un modèle cellulaire de l'OPMD et il a été montré qu'elle était efficace pour diminuer les agrégats et la mort cellulaire à une dose de 100µM (Bao et al., 2004). L'administration orale de 6 mg/ml de doxycycline à des souris OPMD A17 à partir de 6 semaines améliore la faiblesse et la force musculaire entre 4 et 10 mois et la locomotion des souris traitées entre 9 et 10 mois. Le traitement permet également de diminuer le pourcentage d'agrégats et la mort cellulaire à partir de 6 mois (Davies et al., 2005).

- **Le tréhalose est un disaccharide naturellement synthétisé** dans de nombreuses espèces incluant les bactéries, les levures, les champignons, les plantes, les insectes et les invertébrés (Chen and Haddad, 2004). Il a été montré que la protéine agissait comme une chaperonne chimique car elle se fixe sur les protéines mal conformées afin de rétablir leur conformation native (Welch and Brown, 1996). L'utilisation du tréhalose dans un modèle murin de la maladie de Huntington permet de diminuer l'agrégation et d'augmenter la survie des animaux (Tanaka et al., 2004). Ainsi, en raison de ces propriétés anti-agrégation, le tréhalose a été testé dans un modèle cellulaire sur-exprimant PABPN1 muté (COS7) et dans le modèle murin A17 de l'OPMD (Davies, 2005). Traiter les cellules avec 100µM de tréhalose permet de diminuer de près de 50% le pourcentage d'agrégats et le nombre de noyaux apoptotiques. Chez la souris A17, l'ajout de tréhalose dans l'eau (2%) dès 6 semaines permet d'améliorer la force et la faiblesse musculaire dès 4 mois et jusqu'à au moins 10 mois. A 10 mois, les souris A17 traînent moins le bassin lors de la marche que les souris A17 non traitées. A 6 mois d'âge, l'étude histologique des biceps des animaux montre que les souris A17 ayant bénéficié du traitement présentent moins d'agrégats et moins de noyaux apoptotiques que les souris non traitées.

Un essai clinique de phase II a été lancé par la compagnie Bioblast BioPharma (Argov et al., 2016). Dans cet essai, 25 patients OPMD ont été traités pendant 24 semaines par injection intraveineuse hebdomadaire de tréhalose 9%. La capacité de déglutition, la force musculaire ainsi que la qualité de vie des patients ont été évaluées avant et après le traitement. Les résultats montrent que la molécule ne présente pas d'effets secondaires et que la déglutition, la force musculaire et la qualité de vie des patients sont améliorées après traitement. La phase III de l'essai clinique consistera en une étude placebo.

- **La cystamine est un inhibiteur de transglutaminase** qui a démontré son efficacité dans des modèles animaux de la maladie de Huntington en permettant de diminuer la mort cellulaire (Borrell-Pagès et al., 2006). Dans le modèle murin OPMD (A17), l'ajout de 900mg/litre de cystamine dans l'eau dès 6 semaines permet de diminuer le pourcentage d'agrégats ainsi que la mort cellulaire par apoptose et d'améliorer la faiblesse musculaire (Davies et al., 2010).

- **Les molécules 6-aminophenanthridine (6AP) et guanabenz (GA) sont des molécules anti-prions identifiées chez la levure.** Ces composés ont été identifiés par un criblage pharmacologique dont l'objectif était de trouver des molécules efficaces contre les protéines prions de levure et de mammifère (Bach et al., 2003; Tribouillard-Tanvier et al., 2008a). Dans le modèle drosophile de l'OPMD, il a été montré que l'ajout de 400µM de

drogue dans la nourriture des mouches permet d'augmenter le pourcentage de survie, de diminuer le pourcentage et la taille des agrégats, de restaurer les anomalies de positionnement des ailes et d'améliorer la dégénérescence musculaire (Barbezier et al., 2011). Les mécanismes d'action ainsi que l'effet du GA sur des modèles mammifères seront présentés dans la partie résultat.

- **Un anticorps intracellulaire (intrabody) dirigé contre PABPN1 a été mis au point pour cibler directement les agrégats** (Verheesen et al., 2006). Les intrabody sont des petits fragments d'anticorps à domaine unique élaborés de manière à cibler des protéines intracellulaires. Ces petites molécules sont faciles à délivrer et non immunogènes car elles ne contiennent pas la région Fc de l'anticorps responsable de l'inflammation (Carlson, 1988; Doorbar and Griffin, 2007). Des intrabodies spécifiques de la protéine PABPN1 humaine ont été générés par le criblage d'une librairie d'anticorps à domaine unique. L'intrabody 3F5 a été sélectionné en raison de son affinité de fixation à la protéine PABPN1 : il cible spécifiquement le domaine coiled-coil de la protéine nécessaire à la stimulation de la PAP (Impagliazzo et al., 2010; Kerwitz et al., 2003). La co-transfection de l'intrabody et de PABPN1-17 alanines dans des cellules HeLa ou COS-1 permet d'empêcher totalement la formation d'agrégats sans que ceci n'ait d'effet sur le niveau d'expression de la protéine. Par ailleurs, la transfection de 3F5 24h après celle de PABPN1-17 alanines montre une diminution des agrégats de 70% et 89% dans les cellules HeLa et COS-1 respectivement. Dans le modèle drosophile de l'OPMD, il a été montré que l'utilisation de l'intrabody 3F5 permettait de diminuer de 60% le pourcentage de mouches avec des anomalies des ailes. Par ailleurs, la co-expression de l'intrabody et de PABPN1-17 alanines permet une diminution de la taille des agrégats nucléaires mais sans en diminuer le nombre (Chartier et al., 2009).

- **L'utilisation de l'anticorps anti-myostatine RK35** : la myostatine est un inhibiteur naturel de la croissance musculaire. L'utilisation de l'anticorps RK35 dans le modèle murin A17 de l'OPMD montre une amélioration du poids du corps ainsi qu'une amélioration de la force et de l'atrophie musculaire mais sans diminuer le pourcentage de noyaux avec agrégats. Ces résultats proposent que **l'utilisation d'adjuvant** (comme l'anticorps RK35) combinée à une stratégie anti-agrégats pourrait améliorer encore d'avantage le phénotype OPMD. Les résultats de l'utilisation de l'anticorps anti-myostatine RK35 dans le modèle murin OPMD sont disponibles en annexe.

L'ensemble de ces résultats permet de mettre en évidence que cibler les agrégats de PABPN1 permet d'améliorer les phénotypes pathologiques observés dans les modèles animaux de la maladie.

Résultats

ARTICLE N°2 :

**Pharmacological modulation of the ER stress response
ameliorates oculopharyngeal muscular dystrophy**

Alberto Malerba †, Fanny Roth †, Pradeep Harish, Jamila Dhiab, Ngoc Lu-Nguyen, Ornella Cappellari, Susan Jarmin, Alexandrine Mahoudeau, Victor Ythier, Jeanne Lainé, Elisa Negroni, Emmanuelle Abgueuen, Martine Simonelig, Philippe Guedat, Vincent Mouly, Gillian Butler-Browne, Cécile Voisset, George Dickson‡, and Capucine Trollet‡

Human Molecular Genetics 2019

I. Mise en contexte de l'étude :

Dans cette étude en collaboration avec George Dickson (Royal Holloway University of London) nous avons évalué le potentiel thérapeutique de la petite molécule Guanabenz *in vitro* sur un modèle cellulaire OPMD (H2Kb-Ala17) (Klein et al., 2016; Raz et al., 2011b) et *in vivo* sur le modèle de souris transgénique OPMD A17.1 (Davies et al., 2005; Trollet et al., 2010). Nous avons démontré que le Guanabenz permet de diminuer le pourcentage et la taille des agrégats de PABPN1 *in vitro* et *in vivo* et que cette diminution permet d'améliorer le phénotype musculaire chez la souris. Cette étude nous a également permis de mettre en évidence la présence d'un stress du réticulum endoplasmique dans nos modèles OPMD.

1. Le Guanabenz (GA)

Le Guanabenz (GA ; $C_8H_8Cl_2N_4$; 2-[[2,6-dichlorophenyl)methylidene]amino}guanidine; <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00629>) est une petite molécule décrite initialement comme un agoniste des récepteurs adrénergiques alpha-2 et prescrite aux patients pour traiter l'hypertension. La fixation du GA sur les récepteurs α -adrénergiques au niveau post-synaptique entraîne un allègement de la décharge sympathique qui se traduit par une diminution de la pression artérielle (Holmes et al., 1983).

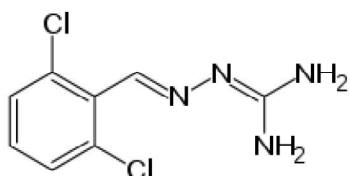


Figure 29: Guanabenz (wystensin)

Formule chimique $C_8H_8Cl_2N_4$

Depuis, il a été montré que le GA avait également d'autres activités :

- L'équipe de Cécile Voisset et Marc Blondel a démontré que le GA avait une action sur l'activité ribosomale de repliement de protéines (PFAR) (Tribouillard-Tanvier et al., 2008b)
- L'équipe de Anne Bertolotti a démontré que le GA avait une action sur le stress du réticulum endoplasmique (Tsytler et al., 2011)

Nous décrivons dans deux les paragraphes suivants l'activité ribosomale de repliement de protéines (PFAR) et le stress du réticulum endoplasmique (ERS) ainsi que le mécanisme d'action du GA sur ces deux activités.

2. L'activité ribosomale de repliement de protéines (PFAR)

La synthèse des protéines est assurée par le ribosome, un complexe ribonucléoprotéique. Chez les eucaryotes, le ribosome est formé de deux sous-unités : une grande sous-unité de 60S et une petite sous-unité de 40S, chaque sous-unité étant elle-même formée de protéines et de différents ARN ribosomiaux (ARNr). Les ARNr 25/28S, 5.8S et 5S sont retrouvés dans la grande sous-unité alors que seul l'ARNr 18S est retrouvé dans la petite sous-unité. Le ribosome est un ribozyme (ARN qui possède la propriété de catalyser une réaction chimique spécifique) puisque l'ARNr 28S a une activité peptidyl-transférase permettant la formation de liaisons peptidiques entre deux acides aminés pour la synthèse de chaînes polypeptidiques qui constitueront les futures protéines. En plus de son rôle dans la traduction des protéines, le ribosome a une activité de repliement des protéines, appelée PFAR (Protein Folding Activity of the Ribosome)(Chattopadhyay et al., 1994; Das et al., 2008). Le site majeur de cette activité PFAR est localisé sur la région PTC (peptidyl-transferase center) du ribosome, une structure ARN localisée sur le domaine V de l'ARNr 25S/28S (28S chez les eucaryotes, 23S chez les procaryotes et 25S chez la levure) de la grande sous-unité 60S du ribosome (Voisset et al., 2017). L'ajout *in vitro* de ribosomes purifiés (ribosomes entiers ou grande sous-unité ou ARNr 23S d'*E. coli* ou domaine V de l'ARNr 23S) augmente le repliement de protéines dénaturées en leur forme fonctionnellement active (« assisted folding ») (figure 31)(Das and Gupta, 1992; Das et al., 2008, 2008; Tribouillard-Tanvier et al., 2008b).

Par criblage de molécules pharmacologiques sur des souches prions de levures, l'équipe de Cécile Voisset et Marc Blondel a démontré que plusieurs molécules dont la 6-aminophénanthridine (6AP), l'imiquimod (IQ) et le guanabenz (GA) étaient actives *in vivo* contre les prions de levure et de mammifère. En particulier, ils ont démontré que la 6AP et le GA inhibent spécifiquement l'activité chaperonne de protéines du ribosome : en leur présence les ribosomes ne sont plus capables d'assister le repliement des protéines, sans affecter la synthèse protéique (Banerjee and Sanyal, 2014). Enfin, il a été montré *in vitro* que seul le domaine V de la sous-unité 23S de l'ARNr était protégé d'une digestion à la RNase en présence de 6AP et GA, démontrant la fixation spécifique de ces deux molécules au domaine V de l'ARNr (Tribouillard-Tanvier et al., 2008b). Ces composés ont permis de démontrer que la PFAR est impliquée dans la propagation de la conformation de la protéine prion et la formation d'agrégats (Voisset et al., 2017). Dans ce contexte, en collaboration avec l'équipe de Martine Simonelig (Montpellier) ils ont testé l'activité des molécules anti-PFAR 6AP et GA sur le modèle de drosophile OPMD et les ont trouvés actifs : l'administration de GA et

6AP dans leur nourriture améliore le phénotype musculaire des drosophiles OPMD (amélioration du positionnement anormal des ailes) et diminue la taille des agrégats de PABPN1 (Barbezier et al., 2011). L'étude mécanistique, essentiellement concentrée sur la molécule 6AP, a permis de proposer un rôle des ARN ribosomiaux dans la formation des agrégats de PABPN1.

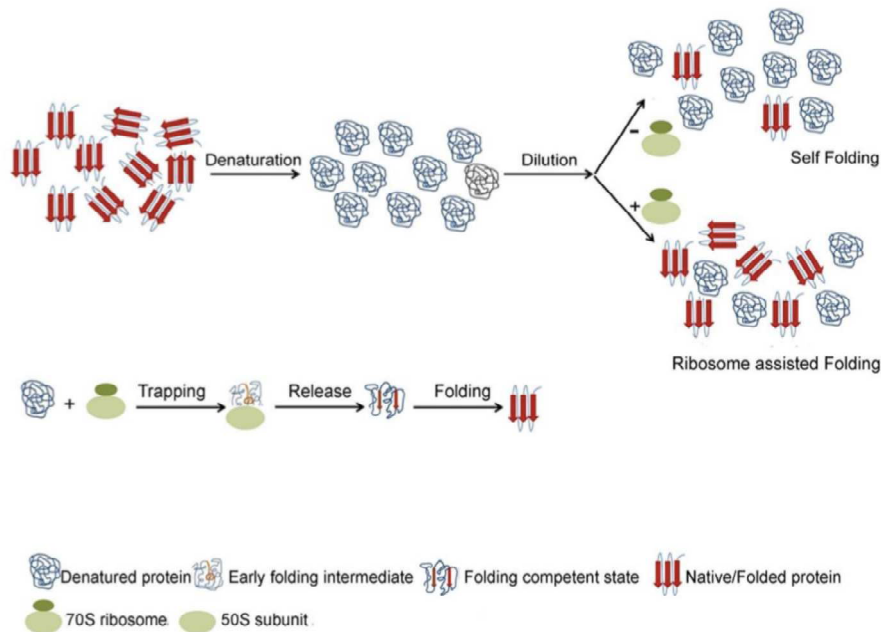


Figure 30: Repliement assisté des protéines par l'activité PFAR de l'ARNr

D'après (Banerjee and Sanyal, 2014)

3. Le stress du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (ER) est le lieu principal de synthèse et maturation des protéines de la membrane plasmique, des organites intracellulaires (appareil de golgi, lysosomes) et des protéines sécrétées par la cellule (Oakes and Papa, 2015). Au cours de leur traduction, ces protéines pénètrent dans la lumière du ER où elles sont repliées puis assemblées en complexes multiprotéiques. Le repliement de ces protéines requiert la participation de protéines appelées chaperonnes (BiP/GRP78, calnexine, GRP94...) qui évitent les erreurs de repliement. Si des molécules mal conformées sont produites, ces dernières sont prises en charge par chaperonnes ou transportées dans le cytoplasme pour être dégradées par le protéasome ERAD (ER-associated redragation). Le stress de l'ER est un phénomène qui intervient lorsque l'homéostasie du réticulum est bouleversée. Les causes physiologiques et pathologiques aboutissant à ce stress sont diverses et peuvent correspondre à une accumulation de protéines mal repliées, à la dérégulation du niveau calcique, à une privation

en glucose ou en énergie, à des affections virales, à la présence de certaines molécules chimiques etc...(Kaufman, 1999; Mori, 2000). Afin de contrebalancer ce stress, l'ER déclenche une réponse nommée UPR (pour Unfolded Protein Response). La réponse adaptative UPR au stress vise à réduire la charge de protéines mal repliées. Elle repose sur l'activité de trois senseurs situés à la membrane de l'ER : la protéine kinase d'initiation de la traduction eucaryote PERK (pour RNA-dependent protein kinase-like ER eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase) ; la protéine dépendante de l'inositol IRE1 α (pour inositol-requiring protein 1) et le facteur d'initiation de la transcription ATF6 (pour activating transcription factor 6).

Dans des conditions physiologiques, PERK, ATF6 et IRE1 α sont maintenues dans des états inactifs par la fixation de la protéine chaperonne de l'ER GRP78 ou BIP. En cas de stress, cette dernière se dissocie des 3 senseurs et va se fixer préférentiellement aux protéines mal conformées générées par le stress dans la lumière de l'ER (Gething and Sambrook, 1992). Ceci permet d'enclencher la réponse UPR (**figure 32**).

Le GA peut moduler la réponse adaptative UPR de la cellule au stress du réticulum endoplasmique. Il a été montré que le GA protégeait les cellules HeLa de la mort après induction d'un stress de l'ER par la tunacamyne, un agent chimique qui cause l'accumulation de glycoprotéines mal repliées dans le réticulum (Tsaytler et al., 2011). Le mécanisme proposé est un mécanisme cytoprotecteur grâce à la fixation du GA au niveau de la phosphatase GADD34 (ou PPP1R15A) empêchant la dimérisation du complexe PPP1R15A/PPP1R15B et prolongeant ainsi la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α . Ceci a pour conséquence d'inhiber la traduction des protéines laissant ainsi plus de temps aux molécules chaperonnes activées par le stress de rétablir l'homéostasie du réticulum endoplasmique (Tsaytler et al., 2011). Plusieurs études s'accordent à dire que le GA joue un rôle dans l'activation de l'UPR en confirmant son action via la phosphorylation de eIF2 α pour améliorer les phénotypes pathologiques liés à la sclérose latérale amyotrophique (ALS) dans le modèle murin portant une mutation dans la superoxyde dismutase Cu/Zn (SOD1) (Wang et al., 2014) ou alors protéger les cardiomyocytes de la mort cellulaire induite par le stress (Neuber et al., 2014). A l'inverse d'autres études mettent en évidence que ce rôle du GA a un effet lipotoxique dans des cellules β du pancréas de souris (Abdulkarim et al., 2017) ou un effet aggravant dans un autre modèle murin de l'ALS (Vieira et al., 2015).

Bien que le rôle du GA sur le stress de l'ER soit bien accepté, la voie par laquelle il agit est encore discutée : d'un côté il a été proposé qu'il agissait via la voie PERK en se

fixant sur GADD34 (Crespillo-Casado et al., 2017, 2018; Das et al., 2015; Takigawa et al., 2016) et d'un autre côté, il a été suggéré par des expériences réalisées *in vitro* avec la molécule Sephin, un analogue du GA, que l'action du GA sur l'ER stress pourrait également passer par la voie IRE1 α (Crespillo-Casado et al., 2017).

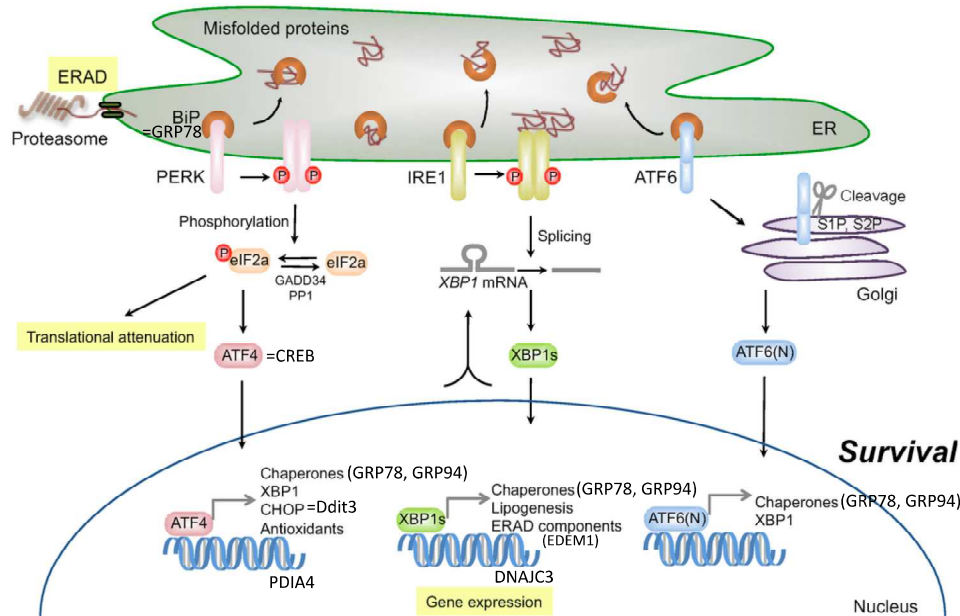


Figure 31: Activation des 3 voies UPR en réponse à un stress de l'ER

Les voies PERK et IRE1 α sont activées par la dimérisation puis la phosphorylation de leur récepteur lorsque BIP en est délogée. ATF6 est activé (ATF6(N)) après son clivage par les enzymes S1P et S2P dans le golgi. La voie PERK induit d'une part une atténuation de la traduction via la phosphorylation et l'inactivation du facteur eIF2 α par la phosphatase GADD34 et d'autres part l'activation de gènes de survie via la traduction spécifique de ATF4. La voie IRE1 α induit l'épissage de l'ARNm de *XBP1* dont la translocation dans le noyau active notamment les gènes du système de dégradation ERAD. La voie AFT6 permet l'activation des protéines chaperonnes et du gène de XBP1.

PDIA4 est l'une des enzymes les plus importante dans la lumière de l'ER. Elle possède une activité chaperonne permettant la prévention de l'agrégation des protéines mal-repliées (Thomas et al., 2010). EDEM1 est un des composants essentiel de la voie ERAD (Oyadomari and Mori, 2004; Ron et al., 2011). DNAJC3 est une chaperonne moléculaire activée spécifiquement par la voie IRE1 α (Huber et al., 2013). Adapté de (Kadowaki and Nishitoh, 2013)

GENERAL ARTICLE

Pharmacological modulation of the ER stress response ameliorates oculopharyngeal muscular dystrophy

Alberto Malerba^{1,†}, Fanny Roth^{2,†}, Pradeep Harish¹, Jamila Dhiab², Ngoc Lu-Nguyen¹, Ornella Cappellari³, Susan Jarmin¹, Alexandrine Mahoudeau², Victor Ythier², Jeanne Lainé², Elisa Negroni², Emmanuelle Abgueguen⁴, Martine Simonelig⁵, Philippe Guedat⁴, Vincent Mouly², Gillian Butler-Browne², Cécile Voisset⁶, George Dickson^{1,‡,*} and Capucine Trollet^{2,‡,*}

¹School of Biological Sciences, Centers of Gene and Cell Therapy and Biomedical Sciences, Royal Holloway, University of London, TW20 OEX Surrey, UK, ²Sorbonne Université, INSERM, Association Institut de Myologie, Centre de Recherche en Myologie, UMRS974, 47 bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France, ³Comparative Biomedical Sciences, The Royal Veterinary College, London, UK, ⁴Infectis Bioscience, 44200 Nantes, France, ⁵Institute of Human Genetics, CNRS UMR9002-University of Montpellier, mRNA Regulation and Development, 34396 Montpellier, France and ⁶UMR1078 'Genetic, Functional Genomic and Biotechnologies', INSERM, EFS, Brest University, IBSAM, 29236 Brest, France

*To whom correspondence should be addressed at: Capucine Trollet, Myology Research Center, UMRS 974 UPMC - INSERM - AIM, 47, bld de l'hôpital - G.H. Pitié-Salpêtrière - Bâtiment Babinski 75651 Paris cedex 13, France. Tel: 33-(0)142165715; Fax: 33-(0)142165700; Email: capucine.trollet@upmc.fr; George Dickson, School of Biological Sciences, Royal Holloway, University of London, Egham, Surrey, TW20 OEX, UK. Tel: 44-(0)1784443545; Fax: 44-(0)1784414224; Email: g.dickson@rhul.ac.uk

Abstract

Oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) is a rare late onset genetic disease leading to ptosis, dysphagia and proximal limb muscles at later stages. A short abnormal (GCN) triplet expansion in the polyA-binding protein nuclear 1 (PABPN1) gene leads to PABPN1-containing aggregates in the muscles of OPMD patients. Here we demonstrate that treating mice with guanabenz acetate (GA), an FDA-approved antihypertensive drug, reduces the size and number of nuclear aggregates, improves muscle force, protects myofibers from the pathology-derived turnover and decreases fibrosis. GA targets various cell processes, including the unfolded protein response (UPR), which acts to attenuate endoplasmic reticulum (ER) stress. We demonstrate that GA increases both the phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor 2 α subunit and the splicing of *Xbp1*, key components of the UPR. Altogether these data show that modulation of protein folding regulation is beneficial for OPMD and promote the further development of GA or its derivatives for treatment of OPMD in humans. Furthermore, they support the recent evidences that treating ER stress could be therapeutically relevant in other more common proteinopathies.

[†]The authors wish it to be known that, in their opinion, the first two authors should be regarded as joint First Authors.

[‡]The authors wish it to be known that, in their opinion, the last two authors should be regarded as joint Last Authors.

Received: November 5, 2018. Revised: January 3, 2019. Accepted: January 3, 2019

© The Author(s) 2019. Published by Oxford University Press. All rights reserved.

For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

Introduction

Oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) is a late onset rare autosomal dominant muscular dystrophy. It affects 1:100 000 people in Europe but it is more common in population groups such as the Bukharan Jews (1/600) and in Quebec (1/1000) likely due to founder effects (1,2). OPMD is characterized by progressive eyelid drooping (ptosis), swallowing difficulties (dysphagia) and proximal limb weakness. It is caused by a mutation in the poly(A) binding protein nuclear 1 (PABPN1) gene that introduces an abnormal expansion of alanine-encoding (GCN)_n trinucleotide repeat in the coding region of exon 1 with 11–18 repeats leading to a mutant protein with an expanded number of alanines (expPABPN1, with 11–18 alanines instead of the normal 10) in the N terminal domain (3). PABPN1 is involved in several steps of messenger RNA (mRNA) and non-coding RNA biogenesis: PABPN1 controls mRNA poly(A) tail length (4,5) and regulates the use of alternative polyadenylation sites (6,7) with a direct effect on mRNA levels and stability. It is involved in splicing regulation (8,9) and in the long non-coding RNA (10) and small nucleolar RNA processing (11). It also has an important role in poly(A)-mediated RNA decay or export from the nucleus (4) as well as in RNA hyperadenylation (12). Finally, PABPN1 has been shown to be required for paraspeckle formation as well as for RNA editing (13).

PABPN1 expression level varies across mouse and human tissues and is exceptionally low in skeletal muscle (14). Mutated expPABPN1 is prone to form intranuclear aggregates but only in skeletal muscle (15,16). To date the exact consequence of the presence of these aggregates in muscle still remains poorly understood but recent studies have suggested that expPABPN1 aggregates that also sequester wild-type (WT) PABPN1 in heterozygous patients could itself contribute to phenotypes associated with OPMD by a loss of function mechanism (13,14,17–19). This pathological function of PABPN1 aggregates is supported by the fact that higher frequency of aggregates is observed in severe homozygous patients (20). In addition, reducing PABPN1 aggregation by supplementing drugs such as trehalose or other supposed chaperones has consistently demonstrated enhanced cell survival in cell models of OPMD (21–23) and improved muscle weakness in both mouse and *Drosophila* models (2,24,25). Apoptosis and deregulation of the ubiquitin–proteasome system have also been proposed as potential downstream pathological events triggered by the aggregates (26,27).

There is currently no cure for OPMD and one of the only options for patients is the surgical cricopharyngeal myotomy to improve swallowing and surgical treatment of ptosis. Some innovative therapies are under development, including a phase I/IIa cell therapy trial involving autologous myoblast transplantation that has shown improvement in the swallowing capacity of OPMD patients with a cell dose effect (28). Several studies have shown promising results in animal models of the disease, mainly in *Drosophila* and in the A17 mouse model, where expPABPN1 is overexpressed under control of human skeletal muscle actin promoter (HSA1). A gene therapy approach tested in A17 mice showed a strong recovery from the disease (18). As mentioned above, anti-aggregation pharmacological strategies have shown positive results both *in vitro* and *in vivo* in the same A17 mouse model of OPMD (2,21,25,27) and intravenous injection of trehalose is currently being used in a phase II clinical trial (29). Guanabenz acetate (GA), an FDA-approved antihypertensive drug agonist of α 2-adrenergic receptors (30), was recently identified to display anti-prion activity through the inhibition of the protein folding activity mediated by the domain V of the large ribosomal RNA (PFAR),

which is a component of the large subunit of the ribosome (31,32). GA was shown to be effective in the *Drosophila* model of OPMD when provided as oral treatment in the food, where it decreased muscle degeneration and reduced the size of aggregates (24). Deletions of the ribosomal DNA locus (encoding rRNAs mediating PFAR) was also shown to reduce OPMD phenotypes and act synergistically with sub-effective doses of 6-aminophenanthridine, a PFAR inhibitor-like GA (24), suggesting a mechanism involving the PFAR (33,34). Furthermore, GA has been shown to play a beneficial role in models of neurological diseases (e.g. amyotrophic lateral sclerosis) by acting on the unfolded protein response (UPR). It has been proposed that GA could decrease protein burden in the endoplasmic reticulum (ER) and so increase the efficiency of ER chaperones by prolonging protein translation attenuation during ER stress (35,36). ER stress condition activates the UPR through different pathways mediated by Grp78 (also called BiP, immunoglobulin-heavy-chain binding protein): first the dissociation of Grp78 from the protein kinase RNA (PRK)-like ER kinase (PERK) activates PERK that phosphorylates the α -subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 α (eIF2 α). The phosphorylation of eIF2 α attenuates the cap-dependent protein translation and induces the translation of protein stress responses such as activating transcription factor 4 (ATF4) or protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A (PPP1R15A). This latter has a crucial role in terminating the UPR pathway by binding to the catalytic subunit of protein phosphatase 1 holoenzyme (PP1c) and dephosphorylating eIF2 α . The second branch of the UPR is initiated by the dissociation of Grp78 from inositol requiring protein 1 α (IRE-1 α), which induces a non-canonical splicing of X-box binding protein 1 (XBP1) mRNA producing the active transcription factor XBP1s that in turn triggers the expression of several genes involved in protein folding. The third pathway is operated by the activating transcription factor 6 (ATF6), a receptor that under ER stress and its dissociation to Grp78 is translocated to the Golgi where it is cleaved to produce a fragment which then acts as a transcription factor to promote expression of XBP1 mRNA and other proteins involved in protein folding. It has been proposed that GA binds to PPP1R15A, thus preventing its binding to PP1c (37,38) and prolonging eIF2 α phosphorylation with the effect of reducing the accumulation of misfolded proteins in the ER (37,39), but these data are controversial (40–42).

Here we show that GA supplementation tested in the same dose range used for the marketed hypertensive GA-based drug Wytensin, significantly reduces the number of aggregates, decreases fibrotic collagen deposition and pathological muscle turnover and improves muscle strength in the A17 mouse model of OPMD. As expPABPN1 expression in skeletal muscles induces the expression of ER stress markers, we studied the mechanism underlying the beneficial effects of GA in muscle cells and found that both IRE1 α - and PERK-dependent branches of the UPR are affected by GA administration. Altogether, these results identify GA as a positive molecule for OPMD in the mouse model; they also suggest that ER stress plays a role in OPMD and that the modulation of UPR in response to ER stress has therapeutic potential to attenuate PABPN1 aggregate toxicity.

Results

Guanabenz effectively reduces PABPN1 aggregates in OPMD muscle cells

GA has been shown to reduce the size of aggregates in a *Drosophila* model of OPMD (24). We first tested GA in the

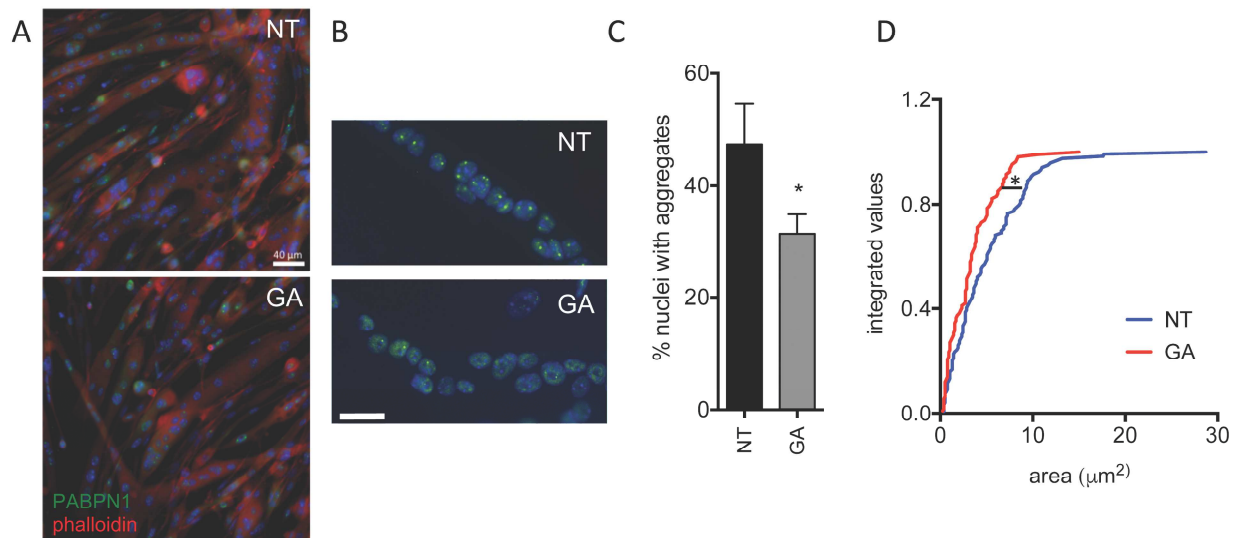


Figure 1. GA treatment reduces PABPN1 aggregates in Ala17 differentiated cells. (A and B) Representative immunostaining of PABPN1 aggregates (green) in differentiated Ala17 cells. In (A) nuclei are counterstained with Hoechst (blue) and myotubes are visualized using phalloidin staining (red). Scale bar, 40 μm in (A). Scale bar, 25 μm in (B). (C) The amount of PABPN1 aggregates was reduced upon GA treatment. Unpaired *t*-test, * $P < 0.05$, $n = 3$ experiments with at least 100 nuclei counted per experiment. (D) The size of PABPN1 aggregates is decreased by GA treatment. Cumulative rank plots show the size of nuclear aggregates in A17 GA-treated group compared to A17 untreated group. Kolmogorov–Smirnov test with * $P < 0.05$. NT = cells treated with DMSO only; GA: cells treated with 10 μM GA.

OPMD Ala17 muscle cell model. When differentiated, this myogenic cellular model expresses PABPN1-Ala17, resulting in the formation of a large number of nuclear aggregates (43,44). GA was added to the cells at day 2 of differentiation and maintained in the medium for additional 72 h. In these conditions, treatment with 10 μM of GA led to a significant reduction in the number and size of PABPN1-Ala17 aggregates (Fig. 1A–D), without altering cell differentiation (Fig. 1A and Supplementary Material, Fig. S1A–D). At lower GA concentrations (ranging from 0.1 to 1 μM), we observed a dose-dependent reduction in the size of PABPN1-Ala17 aggregates but no effect on their number (Supplementary Material, Fig. S2A–C).

GA treatment induces a favorable change in stress response in Ala17 cells

GA is known to affect the UPR in response to cellular ER stress (35–37,45) by prolonging the phosphorylation of the α subunit of eIF2 α on Ser⁵¹ (P-eIF2 α), a key component of the PERK branch of UPR, to slow down protein translation, decrease the ER protein accumulation in the ER and so leaving more time for the ER chaperones to correctly fold newly synthesized proteins (37). While no effect was observed in GA-treated versus non-treated control cells, a strong increase in phosphorylated eIF2 α (P-eIF2 α) was observed in GA-treated Ala17 cells (Fig. 2A–B) compared with non-treated Ala17 cells. This effect was also observed at lower doses where phosphorylation was activated for all doses ranging from 10 to 0.05 μM of GA (Supplementary Material, Fig. S2D–E). Significant changes in the expression of the same UPR-related genes were observed in Ala17-treated cells in which *Grp78*, *Grp94*, *Ddit3*, *Atf4* and *Dnajc3* RNA levels were upregulated 24 h after treatment compared with non-treated cells, while these levels were unchanged in control treated cells (Fig. 2C). At 72 h after treatment, levels of UPR-related genes were back to normal in Ala17 treated cells (data not shown). As *Grp78* also activates the IRE1 α branch of the UPR, we evaluated if *Xbp1*

splicing was affected by GA supplementation. A strong increase in the spliced form of *Xbp1* (*Xbp1s*) was detected in GA-treated Ala17 cells (Fig. 2D) while no effect was observed on GA-treated control cells. The fact that control cells are not perturbed by GA administration indicates that GA itself does not induce UPR and is consistent with OPMD cells being challenged by ER stress. Whereas in the animal the expression of the mutated form of PABPN1 induces the UPR by itself, in Ala17 cells GA is needed to reveal UPR activation.

Overall these data show that GA treatment in OPMD cells induces a favorable change in stress response, mediated by increased phosphorylation of eIF2 α and *Xbp1* splicing activation, which induces UPR-related proteins up-regulation. Furthermore, GA treatment only modulates UPR in cells affected by ER stress.

ER stress is detected in skeletal muscle of A17 mice

No data are available on the ER stress condition and the relative UPR in muscles of the A17 mouse model of OPMD. Upon ER stress, it has been shown that the lumen of the ER is enlarged (46,47). Using electron microscopy, we analyzed the skeletal muscle of A17 mice and observed that the muscle ER (sarcoplasmic reticulum, SR) was abnormally expanded in a number of glycolytic fibers compared to WT mice suggesting that this cellular organelle is indeed under stress (Fig. 3A). In addition, analysis of gene expression profiles of A17 skeletal muscles compared with those of WT mice confirmed that the expression of ER genes (GO term: endoplasmic reticulum subcompartment) is affected in OPMD mice (Fig. 3B). This was further confirmed by qPCR analysis on A17 muscle cDNAs for several crucial UPR-related genes: the chaperones glucose-regulated proteins 78 and 94 (*Grp78*, *Grp94*), the DNA damage-inducible transcript 3 *Ddit3* (also named *Chop*), the activating transcription factor 4 (*Atf4*, downstream of PERK branch) and the DnaJ homolog subfamily C member 3 (*Dnajc3*, downstream of ATF6 branch) (Fig. 3C). *Xbp1* splicing level remained unchanged

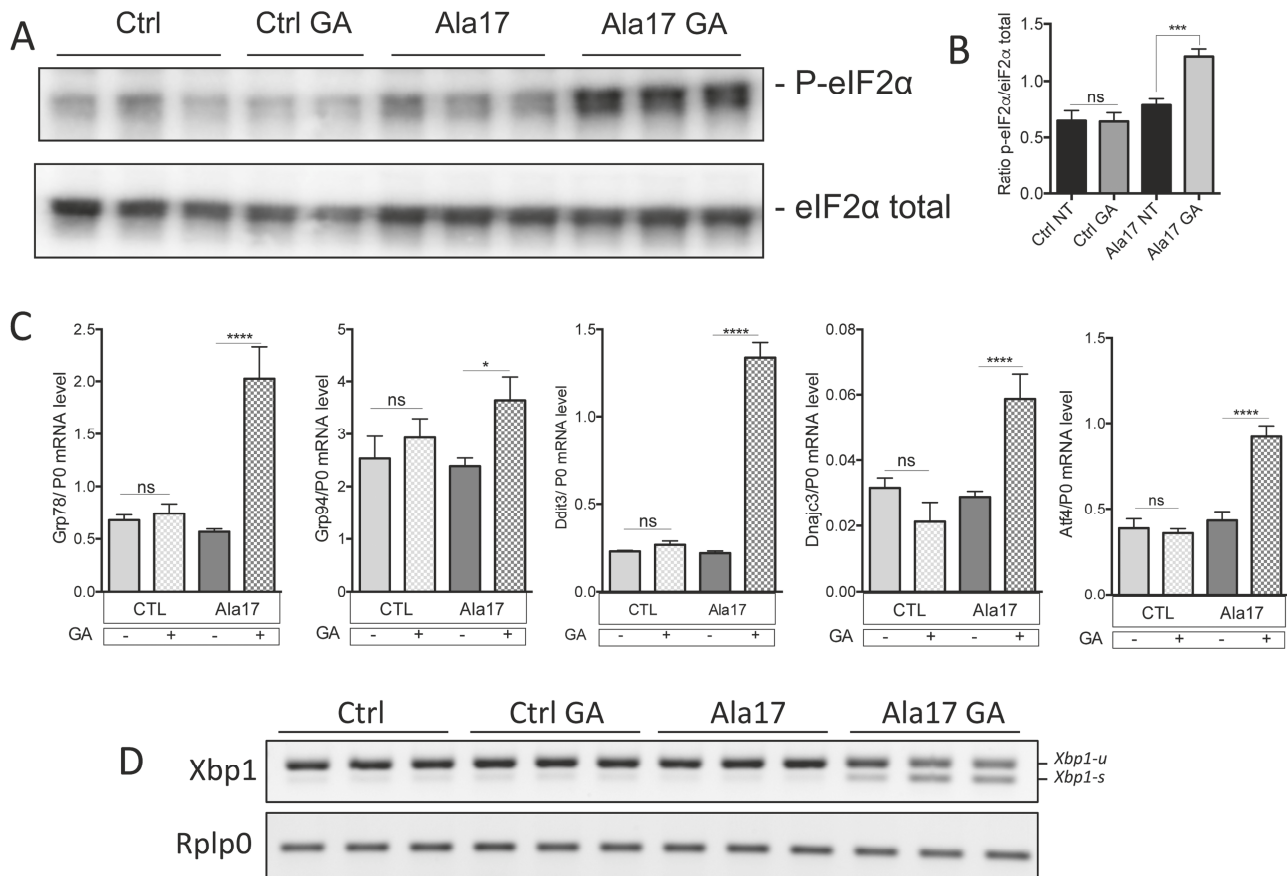


Figure 2. Both PERK-P-eIF2 α and IRE1-Xbp1 pathways are activated in response to GA treatment in OPMD cells. (A) Western blot showing phosphorylated eIF2 α (P-eIF2 α) in control and OPMD cells treated with 10 μ M GA for 72 h (Ala17 GA) compared to DMSO-treated cells (Ala17). No increase in phosphorylation of eIF2 α is observed in control cells treated with GA (Ctrl GA). (B) P-eIF2 α normalized to total eIF2 α . One-way analysis of variance (ANOVA) test with Bonferroni post-hoc test, *** P < 0.001. (C) Downstream key UPR markers are overexpressed in Ala17 cells treated with 10 μ M GA (dark grey) while unchanged in control cells (light grey). mRNA levels were normalized to RPLP0 mRNA level (P0). n = 3 per group. One-way ANOVA test * P < 0.05, *** P < 0.001, **** P < 0.0001, ns, not significant (n = 3). (D) 10 μ M GA treatment activates Xbp1 alternative splicing in Ala17 cells but not in control cells, visualized using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The level of total Xbp1 is comparable in Ala17 cells and in control cells. Xbp1-u: unspliced form; Xbp1-s: spliced form of Xbp1.

in A17 mouse (Fig. 3C). These data confirm that expPABPN1 expression in skeletal muscles induces the expression of ER stress markers, indicating that the A17 mouse is a relevant OPMD model to evaluate the effect of GA on ER stress and its therapeutic potential *in vivo*.

Treatment with GA in the A17 OPMD mouse model efficiently improves muscle strength, decreases pathological aggregates accumulation, myofiber turn-over and fibrosis

To test the effect of GA administration in the OPMD mouse model, 10–12-week-old A17 mice were injected intraperitoneally (i.p.) with 4 mg/kg of GA (n = 6) or with saline (n = 6) three times per week (for a final dose of 12 mg/kg/week of GA) for 13 weeks. We chose this dose because it is in the range of the dose of drug used for the marketed GA-based Wyntensin to treat hypertension in humans (48). Age-matched WT mice (FvB) (n = 6) were also injected with saline as controls. At the end of the experiment, all mice gained a similar bodyweight irrespective of the treatment (data not shown). As GA has been shown to induce dizziness, weakness and sedation as

possible side-effects (49), locomotor behavior of mice was examined by open field behavioral monitoring both after the first and before the last drug administration in the 13-week-long study (Supplementary Material, Table S2). After the first injection of GA (or saline in control mice), behavior of mice was monitored for 60 min and several parameters describing the animal activity were recorded (Fig. 4A). This analysis showed that mice treated with GA were less active than mice injected with saline soon after GA administration (one-way ANOVA test, Supplementary Material, Fig. S3A). However, the same analysis performed in mice just before the last injection of the study (with mice that were not under the effect of the drug at the time of the analysis) indicated that animals chronically treated with GA for 13 weeks are as active as mice injected with saline (one-way ANOVA test, Supplementary Material, Fig. S3B) suggesting no detrimental effect of a prolonged treatment with GA in locomotor activity of these mice. Before harvesting the samples from the treated mice, the forelimb force was analyzed by grip strength analysis. A17 mice have weaker forelimbs strength than FvB WT mice (25,50). The treatment with GA significantly increased the muscle strength of treated A17 mice compared with saline injected A17 mice (Fig. 4B). In a control pilot experiment, we verified that GA had no

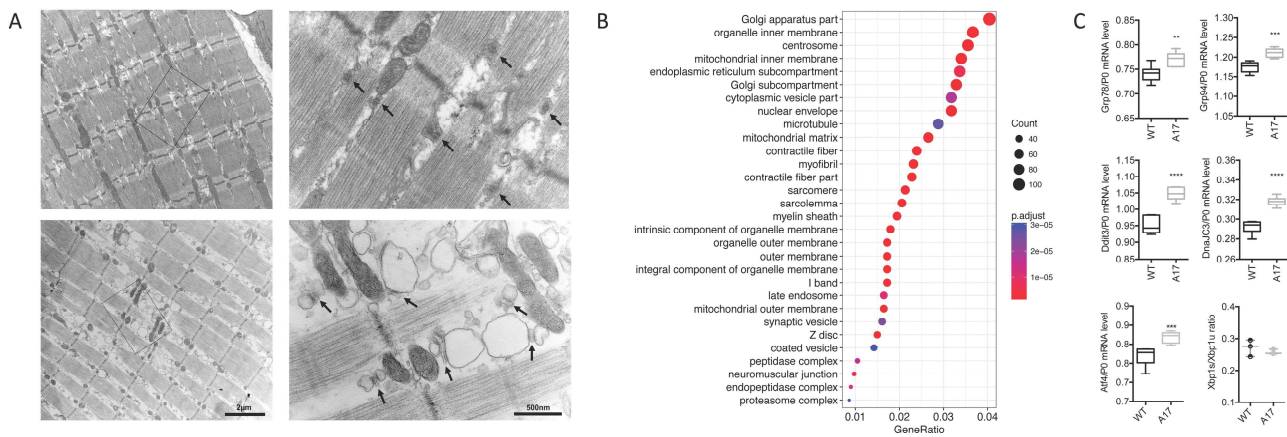


Figure 3. ER stress in the OPMD mouse model. (A) Electron micrograph of abnormally enlarged SR in A17 mouse (bottom) as compared to WT mouse (top panel). Arrows indicate T-tubules. Scale bar, 2 μ m. The boxed area in each left panel is enlarged in the right panel. Scale bar, 500 nm. (B) Scatter plot of cellular component ontology on 1099 DEGs from quadriceps muscles of 26-weeks-old A17 male mice ($n = 6$ per group) previously deposited on GEO (GSE26604). The top 30 cellular components are shown in the bubble chart. Gene ratio is shown on the x-axis, point size shows the gene counts and point color shows the adjusted P-value. (C) Key UPR downstream genes *Gp78*, *Grp94*, *Ddit3*, *Dnajc3* and *Atf4* are up-regulated in A17 mice compared to control mice. The 25-weeks-old mice ($n = 6$ per group) were used for this study. Only *Xbp1* splicing profile did not show any change between WT and A17 mice. *Xbp1*-u: unspliced form; *Xbp1*-s: spliced form of *Xbp1* ($n = 3$ mice per group). Unpaired t-test ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

effect on FvB WT mice (Supplementary Material, Fig. S4). To assess more precisely the muscle strength, tibialis anterior (TA) muscles of saline and GA-treated mice were then analyzed by in situ electrophysiology force measurement. Muscles were stimulated with nine consecutive trains of impulses from 10 to 180 Hz and the muscle strength provided after each train of stimulation was measured. GA treatment significantly increased the absolute maximal tetanic force generated by the muscles of A17 mice (Fig. 4C). Normalization of the maximal tetanic force with the cross-sectional area of the muscles provides a measure called maximal specific force, which is an indication of the muscle strength per unit of the muscle. Administration of GA to A17 mice significantly increased the maximal specific force and normalized the muscle strength to the WT level (Fig. 4D–E). No difference in muscle weight was observed for TA, extensor digitorum longus (EDL), soleus (Sol) or gastrocnemius (Gast) (Supplementary Material, Fig. S5). As GA is expected to reduce the amount of aggregates, muscles were analyzed for the presence of PABPN1 aggregates. The treatment with GA significantly reduced both the percentage of nuclei containing aggregates (one-way ANOVA test, from $\sim 31\%$ to $\sim 22\%$ of nuclei) and the size of aggregates in TA skeletal muscles of A17 mice (Fig. 5A–C), while the total level of PABPN1 protein was unchanged (Fig. 5D–E). Interestingly, the proportion of centrally nucleated (CN) myofibers, which is an index of muscle degeneration and regeneration, was reduced by almost 50% in GA-treated TA muscle (from 7.5% to 4%, Fig. 6A) suggesting a reduction on the pathology-derived myofiber turn-over. As the OPMD pathology is characterized both in humans and in the A17 mouse model by increased fibrosis and collagen deposition in affected muscles, we stained the FvB and A17 muscles for markers of fibrosis (i.e. Collagen I, III via sirius red staining and Collagen VI via immunostaining). As expected, saline-treated A17 muscles were more fibrotic than age-matched saline-treated FvB muscles. GA treatment significantly decreased the amount of collagen proteins detected compared with the WT levels (Fig. 6B–C). Overall, these data show that GA administration is beneficial in OPMD muscles where it improves muscle strength and reduces aggregates formation, cell turn-over and fibrosis with no significant side-effects.

Oral administration of GA increases muscle strength and reduces the amount of nuclear aggregates of OPMD mice

Since the GA-based drug Wytensin has been authorized for oral prescription in tablet form, we tested the effect of GA administered orally in OPMD mice. GA was tested in 10–12-weeks-old A17 mice ($n = 6$) by formulating the drug in food pellets to provide a final dose of 12 mg/kg of GA per week. Groups of A17 and FvB male mice ($n = 7$ and 8, respectively) were also fed with standard chow pellets as control. Food was provided *ad libitum*, weighed and changed twice a week. During the experiment, mice fed with GA-supplemented chow ate 15% less food than mice provided with standard chow possibly due to the unpleasant taste of the drug. However, at the end of the experiment all mice had gained a similar amount of weight (Supplementary Material, Fig. S6A–B). As performed for the i.p.-delivered drug experiments, we assessed whether GA affects locomotor activity of the mice and again no difference was observed between control groups and GA-treated mice for any of the parameters analyzed at the end of the treatment period (Supplementary Material, Fig. S7). Analysis of PABPN1-positive aggregates showed a decrease in both the percentage of nuclei-containing aggregates and the size of the aggregates in muscles treated with GA compared with muscles of control mice (Fig. 7A–C). However, we did not observe a change in the percentage of CN fibers (data not shown). As for the experiment based on i.p. administration, no change was observed in the muscle weight of TA, EDL, Sol and Gast at the end of the study (data not shown). Forelimb strength showed a strong trend toward an improvement in A17 mice treated with GA compared with control mice (unpaired t-test: $*P = 0.038$) and was essentially normalized to the level of WT FvB mice (Fig. 7D). Overall, these results indicate that GA provided orally is also effective in A17 mice by increasing the muscle strength and significantly reducing the size and number of aggregates.

Discussion

OPMD is a late onset disease associated with the formation of intracellular aggregates forming nuclear inclusions in affected

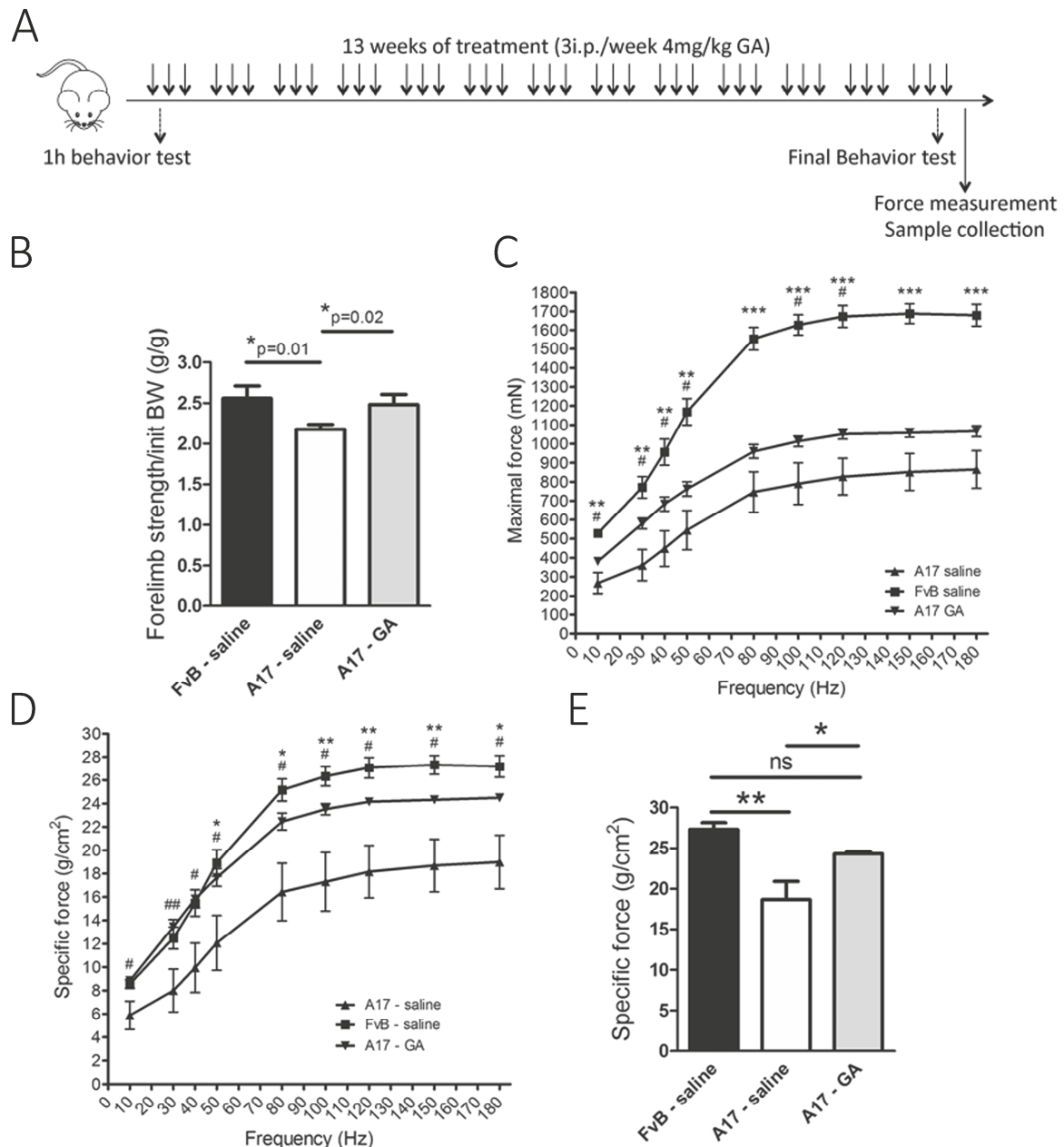


Figure 4. *In vivo* administration of GA improves the functionality of treated muscles. (A) Scheme with drug administration regimens and behavior test performed. (B) Grip-strength analysis performed in mice at the end of the 13-weeks-long treatment shows that forelimbs of mice treated with GA are significantly stronger than those of mice treated with saline. Unpaired *t*-test, **P* < 0.05. (C) *In situ* muscle physiology in muscles: force-frequency analysis of maximal force generated by TA muscles of treated mice shows that GA administration significantly increases the maximal force generated by TA muscles. * and # are used to show statistical difference between A17 mice and FvB or GA treated mice, respectively. One-way ANOVA test with Bonferroni post-hoc test, **P* < 0.05, ****P* < 0.001, #*P* < 0.05. (D) Normalization of maximal force by muscle cross-sectional area provides a measure of the muscle strength per unit of skeletal muscle called specific maximal force. * and # are used to show statistical difference between A17 mice and FvB or GA treated mice, respectively. One-way ANOVA test with Bonferroni post-hoc test, **P* < 0.05, ****P* < 0.01, #*P* < 0.01, #*P* < 0.05. (E) Specific maximal force of muscles treated with GA was normalized to the level of control WT muscles (150 Hz stimulation is shown). Mean ± s.e.m., *n* = 6; one-way ANOVA test with Bonferroni post-hoc test, **P* < 0.05, ****P* < 0.01, ns. Red and blue stars refer to A17 GA versus A17 saline or FvB saline versus A17 saline comparisons, respectively.

tissues, similar to what is found in other adult neurological proteinopathies like Huntington's, Parkinson's, Alzheimer's disease, frontotemporal dementia, spinocerebellar ataxias, inclusion body myositis, spinal and bulbar muscular atrophy, myotonic dystrophy and prion diseases like Creutzfeldt-Jakob (51–53). At present, the contribution of PABPN1 aggregates to the OPMD phenotype is still a subject of debate, but it is commonly

accepted that aggregates, the aggregation process and/or the early oligomeric species of expPABPN1 are toxic and crucially involved in the OPMD pathology (2). The development of pharmacological molecules targeting these nuclear aggregates may therefore provide a valid approach for the treatment of OPMD. Several drugs have demonstrated positive effects in preclinical models of OPMD, such as 6-aminophenanthridine

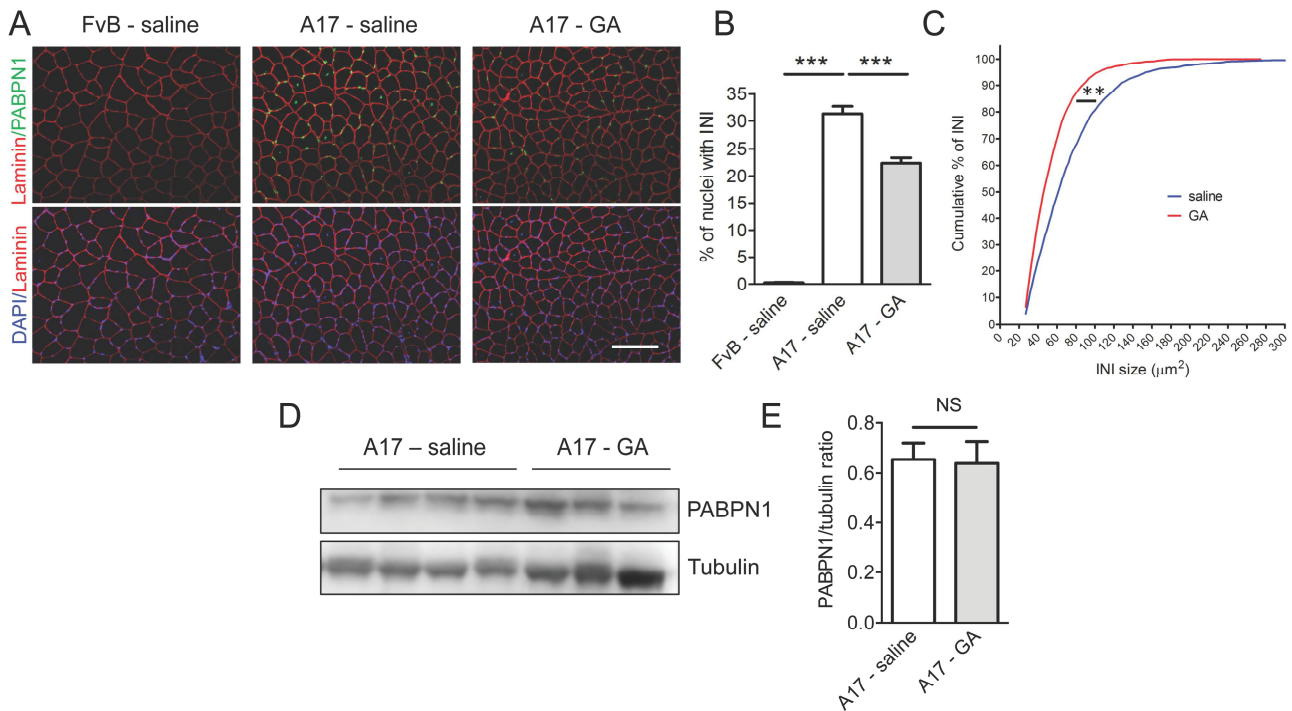


Figure 5. IP injection of GA reduces the amount and the size of aggregates. After 13 weeks of treatment by i.p injection of GA, TA muscles of treated mice were collected and PABPN1 expression was analyzed. (A) Detection of PABPN1 intranuclear aggregates (green) and laminin (red) by immunofluorescence in sections of treated muscles. Sections were pre-treated with 1 M KCl to discard soluble PABPN1 from the tissue. Nuclei are counterstained with DAPI (blue). Scale bar, 200 μm. (B) Quantification of nuclei containing aggregates in muscle sections indicates that treatment with GA significantly reduces the amount of aggregates to ~20% compared to A17 untreated mice (~35% nuclei containing aggregates). One-way ANOVA test with Bonferroni post-hoc test $***P < 0.001$. (C) GA administration reduces the size of intranuclear aggregates. Cumulative rank plots show the size of aggregates in A17 GA-treated group compared to A17 untreated group. Kolmogorov-Smirnov test with $**P < 0.01$. (D) Western blot for PABPN1 expression shows that GA treatment does not change the level of PABPN1. (E) Densitometric analysis of western blot for PABPN1 detection shows no difference in PABPN1 expression in saline and GA-treated A17 mice normalized to the relative tubulin expression. $n = 6$ in each group. Data are presented as mean \pm s.e.m. One-way ANOVA test with Bonferroni post-hoc test $***P < 0.001$, ns.

(6AP) and GA in *Drosophila* (24), doxycyclin (25), cystamine (27) and trehalose in mice, with the latter progressed to clinical trial stages in OPMD patients (NCT02015481 on clinicaltrials.gov).

In this study, we tested the effect of GA in a cellular model of OPMD and its therapeutic potential in a relevant mouse model of the disease. First of all, we showed that GA decreases the percentage and size of nuclear aggregates both *in vitro* and *in vivo*. GA and 6AP have previously been shown to reduce the size of aggregates and improve the pathology in a *Drosophila* model of OPMD (24). However, while 6AP was shown to use the ribosome-borne PFAR mechanism to reduce the size of aggregates, the mechanism of action of GA has not been addressed. Here the results are consistent with a model where GA promotes UPR in models of OPMD by acting through the UPR pathway initiated by PERK. In response to GA supplementation, we observed both an increase in the phosphorylation of eIF2 α and an increase in *Xbp1* splicing. It has been described that *Xbp1* splicing is regulated by activation of both PERK [through increased expression of Atf4 that is known to enhance *Xbp1* splicing (54)] and IRE1 α pathways. A cross-talk between PERK and IRE1 α has been previously demonstrated for miR-30c-2-3p expression that is activated by PERK/NF- κ B and inhibits the IRE1-dependant transcription factor *Xbp1* (55,56). Here, instead, we show that GA supplementation *in vitro* increases expression of Atf4 (mediated by PERK pathway) that is known to enhance *Xbp1* splicing (54).

It has been shown that GA on its own is not able to modulate UPR-related genes in unstressed cells (37). We found that cells

expressing expPABPN1 did not show a different expression of the markers we studied to assess UPR activation compared with control cells. However, Ala17 cells clearly responded to the treatment with GA by up-regulating such markers, suggesting that pre-existing ER stress is present in OPMD cells and that this allows a response to GA treatment. A possible explanation for the lack of detection of these UPR signatures in untreated Ala17 cells is that the expression of expPABPN1 in OPMD myotubes is not long enough to allow detection of UPR response. This is further supported by the observation that in the A17 OPMD mouse model, where expPABPN1 is expressed for a longer time, UPR activation is readily detectable.

Although our study strongly suggests a connection, the link between PABPN1 aggregates and ER stress in OPMD remains undefined. OPMD is characterized by mitochondrial, ubiquitin proteasome system (UPS) and apoptosis defects (26,50,57,58), all of which can potentially generate ER stress. Furthermore, protein misfolding in the ER, nutrient deprivation, oxidative stress, calcium disturbance, shortage of chaperone proteins and aging can also trigger ER stress (integrated stress response) (59–63) and all these features are likely present in OPMD cells. For example, it is possible that unresolved ER stress generates more substrates for the UPS that would consequently lead to the overwhelming and saturation of the UPS degradation machinery in a self-reinforcing pathological cycle (64). Alternatively, trapping protein chaperones like HSP70 in the aggregates (65,66) would make them less available for normal cellular functions, which could lead to ER stress.

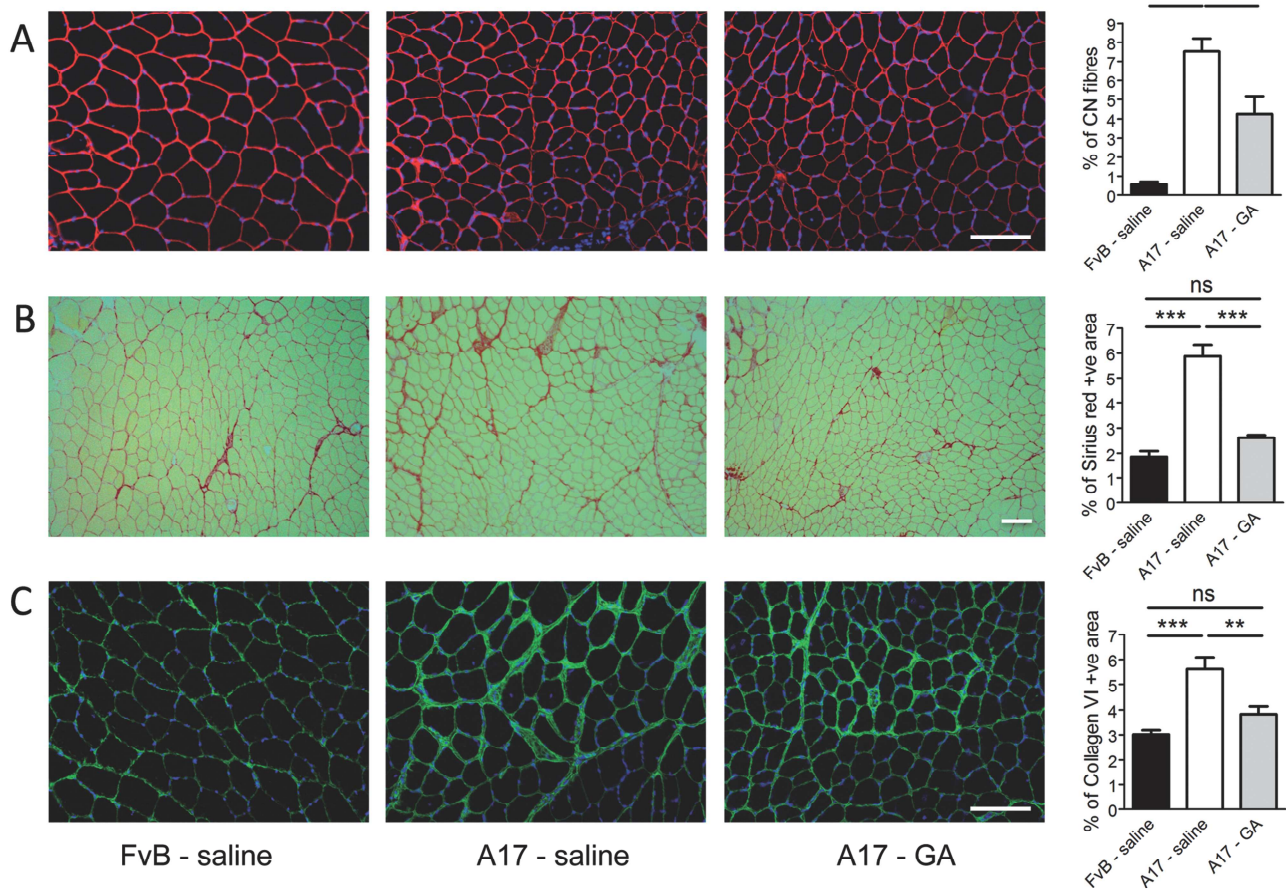


Figure 6. GA administration reduces the percentage of CN fibers and the fibrosis in muscle. (A) Representative images of histological stainings for laminin and DAPI were used to quantify the percentage of myofibers with central nuclei. GA treatment significantly reduces the percentage of CN fibers compared to saline treated A17 mice (right panel). One-way ANOVA test with Bonferroni post-hoc test $**P < 0.01$, $***P < 0.001$. (B) Representative images of the Sirius red staining used to quantify the area covered by Collagen I and III in TA muscles of treated mice. Muscle of mice treated with GA have significantly less Collagen I and III positive area (sirius red staining) compared to muscles of mice treated with saline (right panel). One-way ANOVA test with Bonferroni post-hoc test, $***P < 0.001$, ns. (C) Representative pictures of Collagen VI immunostaining used to quantify the collagen VI positive (+ve) area. Collagen VI +ve area is smaller in GA-treated muscles compared to saline-treated muscles (right panel). One-way ANOVA test with Bonferroni post-hoc test $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, ns. Scale bar, 200 μm . $n = 6$ in each group. Data are presented as mean \pm s.e.m.

Recently, it has been demonstrated that PABPN1 protein regulates nuclear structure and homeostasis of Ca^{2+} (67). The ER is an essential intracellular organelle for many cell functions including the maintenance of Ca^{2+} homeostasis. Calcium is one of the key regulators of cell survival and can induce ER stress-mediated apoptosis (68,69) mainly through mitochondrial cell death (70). It has been shown that PABPN1 mutation in OPMD gives rise to multiple Ca^{2+} defects such as alterations of the SR Ca^{2+} content, inhibition of the voltage-gated SR calcium release and reduced expression of ryanodine receptor (67). Moreover, the presence of TNNT3 pre-mRNA in nuclear aggregates (43) is associated with aberrant calcium sensitivity in muscle fibers. These studies show that disturbance of Ca^{2+} homeostasis plays a role in OPMD pathophysiology and suggests that this could be one of the major causes of ER stress in OPMD. Furthermore, OPMD has been proposed as a premature-aging disease (17) and ER stress is prone to be activated in aging since age-related changes such as increased oxidative stress, protein misfolding, impairment of calcium homeostasis and disturbance of protein synthesis are observed when the protein quality is altered (71). Similarly, the enrichment analysis of transcriptomic data from

the OPMD mouse revealed ER as one of the top five deregulated cellular components.

Following the positive effect of GA described in the *Drosophila* model of OPMD, this study is the first demonstration of the effectiveness of GA in a mammalian model of OPMD. Here we decided to dose the mice with 12 mg/kg/week as this translates, after conversion for the body surface area, to ~ 10 mg/day in a 70 kg human being which is in the mid-range for the administration of Wytensin, a recently discontinued anti-hypertensive drug whose active ingredient is GA (48). GA i.p. treatment efficiently reduced the percentage of nuclei-containing aggregates while simultaneously decreasing muscle fibrosis and improving muscle strength. Furthermore, by providing the drug via oral feeding, we demonstrated that the drug was still active and able to decrease the percentage of aggregates using the oral route of delivery, which is compatible with clinical application in humans.

A direct comparison with trehalose, the only anti-aggregate therapeutic strategy that has yet progressed to clinical application for OPMD, is impossible due to the different doses, route of delivery and outcome measures used to study these com-

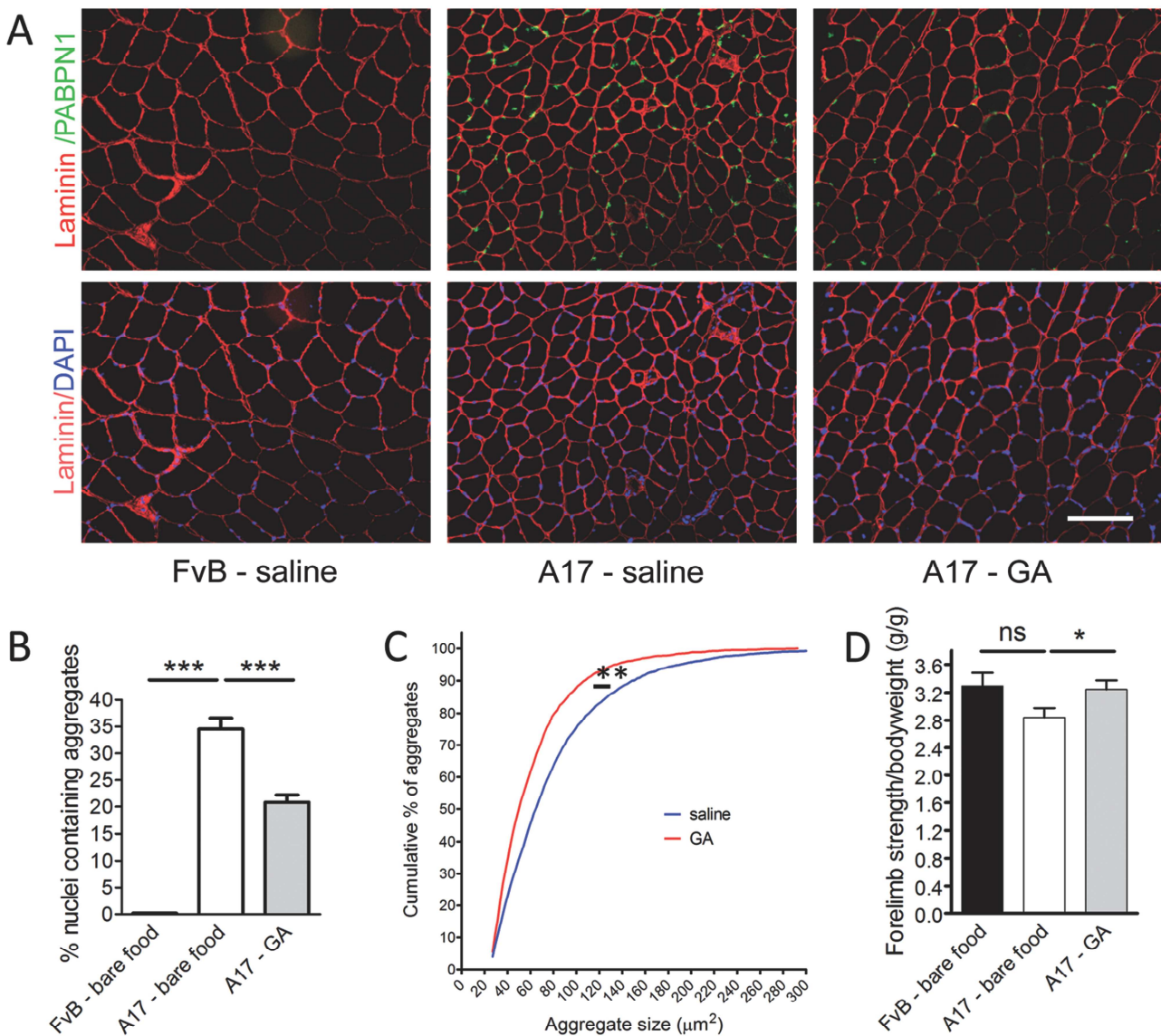


Figure 7. GA formulated in food has beneficial effects in forelimb strength and reduces the amount and the size of intranuclear aggregates. (A) Detection of PABPN1 nuclear aggregates (green) and laminin (red) by immunofluorescence in sections of treated muscles. Sections were pre-treated with 1 M KCl to discard all soluble PABPN1 from the tissue. Nuclei are counterstained with DAPI (blue). Scale bar, 200 μm . (B) Percentage of nuclei containing aggregates in muscle sections indicates that the treatment with GA significantly reduces the amount of aggregates to $\sim 20\%$ compared to A17 untreated mice. One-way ANOVA test with Bonferroni post-hoc test $***P < 0.001$ (C) GA administration reduces the size of intranuclear aggregates. $n = 6$ per group. Cumulative rank plots show the size of aggregates in A17 GA-treated group compared to A17 untreated group. Kolmogorov–Smirnov test with $**P < 0.01$. (D) Forelimb force of A17 mice treated with GA showed a trend toward an increase in strength compared to the force of mice treated with saline. Unpaired *t*-test, $*P < 0.05$, ns. Data are presented as mean \pm s.e.m. $n = 6\text{--}8$ per group.

pounds. However, the efficacy on reducing the amount of aggregates and the functional muscle improvement seem to be at least comparable if not substantially better after administration of GA and with the further advantage that GA is already a well-characterized drug that entered the market although for a different pathological condition. This drug (i.e. Wytensin) was discontinued mainly due to some side-effects (e.g. dizziness and lethargy) that we also observed in the current study soon after dosing the mice. However, our study demonstrates that the chronic administration with GA, at least at the doses used, does not affect the locomotor activity in the long term. In conclusion, we suggest that GA ameliorates OPMD acting, at least partially, by finely modulating the ER stress response and reducing the aggregate formation. GA and novel GA derivatives thus have sig-

nificant therapeutic potential for translation into clinical trials for the treatment of OPMD.

Materials and Methods

Drug preparation

For *in vitro* experiments, GA (G-110, Sigma) was prepared in dimethylsulfoxide (DMSO) at a stock concentration of 100 mM. Fresh aliquots were used for each new experiment at concentration ranging from 0.1 to 20 μM . For the *i.p.* injection, GA was first prepared in 5% DMSO and then diluted to the final concentration at 4 mg/kg of bodyweight with saline (NaCl 0.9% in water). For

the oral feeding experiments, food supplemented with GA was prepared using the 2016.12 based diet provided by Envigo.

Cell culture

Primary immortalized mouse myoblasts H2KB IM2 (control cells) are derived from conditionally immortalized mice using a temperature-sensitive SV40 large T-antigen (tsA58) transgene (72). Mutated PABPN1 (Ala17) stable cell line has been established from IM2 (Ctrl) cells transfected with a plasmid containing mutated PABPN1 under a desmin promoter driving myotube-specific expression and a resistant gene to geneticin antibiotic (44). Transfected cells were then cultivated with geneticin and grown at clonal density. The constructs are stable for at least 20 cellular divisions. Cells were cultivated on matrigel-coated surface in DMEM supplemented with 20% of foetal calf serum (Invitrogen), 0.5% of chick embryo extract (Seralab), 100 U/ml penicillin–streptomycin antibiotic (ThermoFisher) and 10 U/ml interferon gamma (Millipore) at 33°C in a humidified 5% CO₂ air atmosphere. For Ala17 cell lines containing a resistance gene, 500 µg/ml de geneticin (G418, Life Technologies) was added to the media. At 90% of confluency, cells were differentiated in DMEM supplemented with 10% horse serum and 1% penicillin–streptomycin at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere.

PABPN1 immunostaining in cells

For immunostaining, H2KB cells were cultivated in Ibidi 35 mm Dishes (Biovalley). Immunostaining of PABPN1 was performed at 5 days of differentiation. Cells were washed once in phosphate buffered saline (PBS) and fixed for 10 min with paraformaldehyde-PBS. Cells were then incubated for 15 min in PBS-glycine 0.1 M and permeabilized in blocking buffer containing 3% BSA, 5% goat serum in 0.2% PBS-Triton X-100. Anti-PABPN1 primary antibody (1/200, ab75855 Abcam) was incubated 1 h at room temperature in blocking buffer. Cells were washed three times with 0.1% PBS-Triton X-100 prior to incubation with goat anti rabbit secondary antibody conjugated to Alexa Fluor 488 (Life Technologies) together with Phalloidin 555 (Interchim).

Western blot

Proteins were extracted by sonicating the cells in RIPA buffer [0.15 M NaCl, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 8), 2 mM EDTA and 10% Triton-X-100 with protease inhibitor cocktail (Complete, Roche Diagnostics) and phosphatase inhibitor cocktail (Santa Cruz; sc-45064)]. Protein concentration was determined by colorimetric detection method (Pierce BCA Protein Assay, Thermo Fisher). Proteins were separated on 4–12% Bis-Tris gels (Invitrogen) and transferred onto a Polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane for 1 h at constant 250 mA at 4°C. Membranes were blocked by incubation in 5% fat free milk or BSA in 1X TBS, 0.1% Tween-20 (TBST) for 1 h at room temperature under agitation. Membranes were stained with primary antibodies (PABPN1 Abcam ab75855, eiF2 α -P Cell signaling #9721, eiF2 α total Cell signaling #9722) overnight at 4°C under agitation. The next day, membranes were washed in TBST and incubated with appropriate secondary antibodies. The G:Box system (Syngene) was used to detect the signals from the membranes.

RT-PCR and real-time qRT-PCR

Total RNA was extracted from cell and skeletal muscle samples using Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. RNA quality and purity was determined using a ND-1000 NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies). RNA (100 ng for muscle, 1 µg for cell pellets and mouse muscle biopsies) was reverse transcribed using M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The splicing of *Xbp1* mRNA was monitored by PCR with 0.5–1 µl of complementary DNA (cDNA) using Reddy mix polymerase (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. Primers sparing the 26 bp intron sequences are listed in [Supplementary Material, Table S1](#). The reaction mixture was heated to 94°C for 5 min and followed by 35 PCR cycles: 30 s at 94°C, 30 s at 55°C and 30 s at 72°C followed by a last elongation step at 72°C for 7 min. PCR products from unspliced and alternatively spliced *Xbp1* mRNAs, which are 172 and 146 bp, respectively, were resolved on 5% non-denaturing polyacrylamide or 2% agarose ethidium bromide stained gels. cDNA was used for quantitative PCR reaction using SYBR green mix buffer (LightCycler 480 Sybr green I Master) in a total reaction volume of 9 µl. The PCR reaction was carried out as follows. Eight minutes at 95°C followed by 50 cycles of the following: 15 s at 95°C, 15 s at 60°C and 15 s at 72°C. Specificity of the PCR products was checked by melting curve analysis using the following program: 65°C increasing by 0.11°C/s to 97°C. The expression level of each mRNA was normalized to that of human *B2M* mRNA (beta-2 microglobulin) or murine *Rpl0* mRNA (large ribosomal protein, subunit P0) expression. Expression levels were calculated according to the $\Delta\Delta C_t$ method. The sequences of primers used for RT-PCR and for real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) are listed in [Supplementary Material, Table S1](#).

Mice

A17 transgenic mice have been previously described (25,50). Male A17 and WT FvB controls were generated by crossing the heterozygous carrier strain A17 with FvB mice. The mice were genotyped by PCR about 4 weeks after birth. Animals were housed with food and water ad libitum in minimal disease facilities (Royal Holloway, University of London).

Drug administration

For the systemic treatment of OPMD, a total of 12 mg/kg/week of GA were administered using either food chow or i.p. injections. The total amount of GA administered per week is in the range of the dose of the GA-based Wytensin used in human [tested in clinical trial from ~0.23 to 3.7 mg/kg/week, (73)] for the dose conversion human/mouse, see FDA guidance for industry, 2005, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), July 2005. For the oral feeding experiment, a 2-week-long pilot experiment in FvB healthy mice was conducted to measure the amount of food needed for 13 weeks. The calculation resulted on mice eating an average of two pellets (2.8 g each) per day. For the experiment in OPMD mice, 10–12-week-old-mice per group (mice fed with GA or bare food) were caged individually and bare or the GA-supplemented pellets (GA was 10 mg/kg correspondent to 0.028 mg GA/pellet) changed twice a week for 13 weeks until the end of the experiment. During the experiment, food was weighted each time in order to assess the amount of food eaten

by the mice. For the i.p. injection, GA was bought from Sigma and diluted in 5% DMSO in saline. Groups of 10–12-week-old A17 or FvB mice were injected with either GA 4 mg/kg/injection or with 5% DMSO in saline three times per week for 13 weeks.

Assessment of functional readouts in living mice

Mouse open-field behavioral activity. Soon after the first i.p. injection of GA or saline, activity of mice was evaluated for 60 min (12 bins of 5 min each) using open-field behavioral monitoring (Supplementary Material, Table S2) and data obtained per each mouse were averaged. Activity cages from Linton Instruments were used and data were collected using Amonlite software (vs 1.4). During the last 2 weeks of treatment with either oral feeding or IP injections, the same cages were used to monitor the activity of treated mice according to a protocol designed following the TREAT-NMD guidelines (TREAT-NMD SOP: DMD_M.2.1.002). Briefly, mice were acclimatized to the test chamber for 60 min every day for four consecutive days. On the days of data collection, mice were acclimatized for 30 min before data acquisition and data were then acquired every 5 min for 1 h. This protocol was repeated for 4 days and data obtained per each mouse were averaged. As described in Results, only the first 30 min of analyses were considered indicative of the locomotor behavior.

Grip strength test

The forelimb strength of mice treated with either oral feeding or i.p. injections was assessed using a commercial grip strength monitor (Linton Instrumentation, Norfolk, UK). The protocol described in the TREAT-NMD guidelines was used for the oral feeding experiment (five tests per mouse over a 3-day period, TREAT-NMD SOP: DMD_M.2.2.001). Mice, held from the tail, were allowed to grab a metal mesh attached to a force transducer and the force produced after a gentle pull, was recorded. 30 s were left between each of five sequential tests per mouse per day. Data were expressed as gram force per gram of the initial body weight. While behavior of the mice orally fed with drugs was normal and similar along the 3-day-long procedure, we observed that all mice treated with chronic i.p. injections (and then manipulated thrice/week by the operator) voluntarily did not grab the mesh and preferred to be dragged during both the second and the third days of analyses, so only the measurements obtained from the first day of analysis were used for the study.

In situ muscle physiology

TA muscle strength was measured by *in situ* muscle physiology performed under terminal anesthesia using a protocol already reported in (74). Briefly 24 h after the last injection of saline or GA, muscle function was assessed using TA muscles of each mouse. Mice were deeply anesthetized and were carefully monitored throughout the experiment. The distal tendon of the TA muscle was dissected and tied with 4.0 braided surgical silk (Interfocus, Cambridge, UK). The sciatic nerve was exposed and superfluous branches axotomized. The TA tendon was fixed to the lever arm of a 305B dual-mode servomotor transducer (Aurora Scientific, Aurora, Ontario, Canada) via a custom made steel s-hook. Bipolar platinum electrodes located in the distal part of common peroneal nerve, were used to stimulate using supramaximal square-wave pulses of 0.02 ms (701A stimula-

tor, Aurora Scientific) TA muscles. Data acquisition and control of the servomotors were conducted using a Lab-View-based DMC program (dynamic muscle control and data acquisition, Aurora Scientific). Maximum isometric tetanic force (P_0) was determined from the plateau of the force–frequency relationship following a series of stimulations at 10, 30, 40, 50, 80, 100, 120, 150 and 180 Hz. Muscle length was measured using digital calipers based on well-defined anatomical landmarks near the knee and the ankle. The specific force (N/cm²) was calculated by dividing P_0 by TA muscle cross-sectional area. Overall, cross-sectional area was estimated using the following formula: muscle weight (g)/[TA fiber length (Lf; cm) \times 0.6 \times 1.06 (g/cm³)].

Samples harvesting, processing and storing

Animals were all culled at the end of the study and after the functional analyses. TA, EDL, Sol and Gast muscles were harvested from mice treated with i.p. injections and TA, EDL and Sol muscles were collected from mice treated with oral feeding. Muscles from a leg were snap-frozen in liquid nitrogen for Western Blot (WB) and RNA studies and the muscles of the contralateral leg were mounted in corks using optimal cutting temperature (OCT) and frozen in pre-chilled isopentane in liquid nitrogen for histological analyses. All samples were stored at -80°C before analysis.

Immunostaining and histological analyses

A Bright OTF 5000 cryostat (Bright Instruments, Huntingdon, UK) was used to section muscles at 10 μm thickness. Muscle sections, placed on coated glass slides (VWR, Lutterworth, UK) were stored at -80°C prior to use. Immunohistochemical staining was performed using the following antibodies: anti-PABPN1 (rabbit monoclonal, diluted 1:100, Abcam ab75855, ON, 4°C), anti-laminin (rat monoclonal, diluted 1:800, Sigma-Aldrich, 1 h room temperature (RT)), anti-Collagen VI (rabbit monoclonal, diluted 1:400, Abcam ab182744). Alexa fluor (Molecular Probes) antibodies conjugated to 488 or 594 fluorochromes were used to detect the primary antibodies. A published protocol (18,25,50) was used to counterstain the sarcolemma with laminin for PABPN1 immunostaining. Briefly, after fixing sections in paraformaldehyde 4% the slides were incubated with KCl buffer (1 M KCl, 30 mM HEPES, 65 mM PIPES, 10 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, pH 6.9) for 1 h at room temperature. Muscle sections were then blocked with 1% normal goat serum in 0.1 M PBS, 0.1% Triton X100 for 1 h and then incubated overnight at 4°C with both PABPN1 and laminin primary antibodies diluted in the same buffer. Slides were then washed with 0.1% tween 20 in PBS and incubated with fluorophore-conjugated secondary antibodies. Slides were mounted with mounting medium Vector containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma-Aldrich Ltd.) to detect nuclei. For Collagen VI staining 5% milk in PBST was used to block for 1 h at RT the unspecific binding and both the primary and secondary antibodies were incubated for 1 h at RT in 2.5% fat free milk in PBST. Five, 20 \times magnification images were randomly taken from a blinded observer and used to calculate the percentage of aggregates, the percentage of CN fibers and the area covered by collagen VI. A standard protocol for sirius red was used to detect the collagen I and III in TA muscles. Two to three 10 \times magnification images were randomly taken from a blinded observer and used to calculate the area stained by sirius red and expressed as % on the total area. NIH

ImageJ analysis software was used to analyze the largest section of each muscle.

Image acquisition and analysis

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

Electron microscopy

TA muscles were dissected, cut into small pieces and immediately fixed in 2% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde and 0.1 M phosphate buffer. After abundant washes and 2% OsO₄ post-fixation samples were dehydrated at 4°C in graded acetone including a 1% uranyl acetate in 70°C acetone step and were finally embedded in Epon resin. Thin (70 nm) sections were stained with uranyl acetate and lead citrate, observed using a Philips CM120 electron microscope (Philips Electronics NV) and photographed with a digital SIS Morada camera.

Gene profile analysis

Enrichment analysis have been performed on the 1099 differentially expressed genes (DEGs) from quadriceps muscles of 26-week-old A17 male mice ($n = 6$ per group) previously deposited on GEO (GSE26604) (see full description of the gene expression analysis in (50)). Briefly, total RNA extracted from muscles was hybridized to Illumina Mouse v1.1 Bead arrays). This has been done using overexpressed test (75) of clusterProfiler package (76) and genome wide annotation for Mouse (77) in R. The Benjamini & Hochberg correction method has been applied and results with a false discovery rate <5% and an absolute logFC >0.6 have been kept.

Statistical analysis

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

Study approval

Ethical and operational permission for *in vivo* experiments was granted by the RHUL Animal Welfare Committee and the UK Home Office and this work was conducted under statutory Home Office regulatory, ethics and licensing procedures, under the Animals (Scientific Procedures) Act 1986 (Project Licence 70/8271).

Conflict of Interest statement. The authors have declared that no conflict of interest exists.

Funding

Centre National de la Recherche Scientifique; Association Française contre les Myopathies (Research Program 17110); the Sorbonne University and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

Author contributions

A.M., G.D. and C.T. conceived and designed the study. A.M., F.R., P.H., J.D., N.L.N., O.C., S.J., Al.M., V.Y., J.L. and E.N. performed research. A.M., F.R., P.H., J.D., N.L.N., O.C., S.J., A.M., V.Y., J.L., E.N., E.A., M.S., P.G., V.M., G.B.B., C.V., G.D. and C.T. analyzed the research. A.M., F.R., G.D., C.T. wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

References

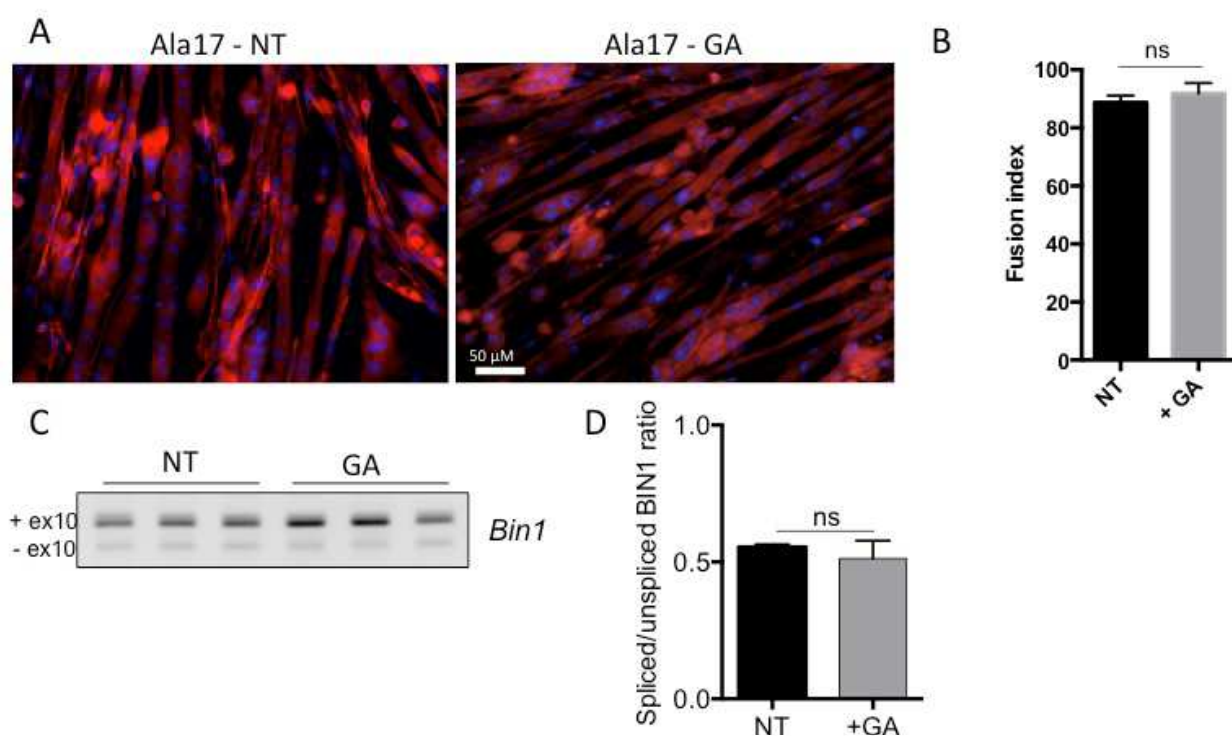
1. Abu-Baker, A. and Rouleau, G.A. (2007) Oculopharyngeal muscular dystrophy: recent advances in the understanding of the molecular pathogenic mechanisms and treatment strategies. *Biochim. Biophys. Acta*, **1772**, 173–185.
2. Davies, J.E. (2005) Trehalose reduces aggregate formation and delays pathology in a transgenic mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **15**, 23–31.
3. Brais, B., Bouchard, J.P., Xie, Y.G., Rochefort, D.L., Chrétien, N., Tomé, F.M., Lafrenière, R.G., Rommens, J.M., Uyama, E., Nohira, O. et al. (1998) Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nat. Genet.*, **18**, 164–167.
4. Apponi, L.H., Leung, S.W., Williams, K.R., Valentini, S.R., Corbett, A.H. and Pavlath, G.K. (2010) Loss of nuclear poly(A)-binding protein 1 causes defects in myogenesis and mRNA biogenesis. *Hum. Mol. Genet.*, **19**, 1058–1065.
5. Benoit, B., Mitou, G., Chartier, A., Temme, C., Zaessinger, S., Wahle, E., Busseau, I. and Simonelig, M. (2005) An essential cytoplasmic function for the nuclear poly(A) binding protein, PABP2, in poly(A) tail length control and early development in *Drosophila*. *Dev. Cell*, **9**, 511–522.
6. Jenal, M., Elkon, R., Loayza-Puch, F., van Haften, G., Kühn, U., Menzies, F.M., Oude Vrielink, J.A.F., Bos, A.J., Drost, J., Rooijers, K. et al. (2012) The poly(A)-binding protein nuclear 1 suppresses alternative cleavage and polyadenylation sites. *Cell*, **149**, 538–553.
7. de Klerk, E., Venema, A., Anvar, S.Y., Goeman, J.J., Hu, O., Trollet, C., Dickson, G., den Dunnen, J.T., van der Maarel, S.M., Raz, V. et al. (2012) Poly(A) binding protein nuclear 1 levels affect alternative polyadenylation. *Nucleic Acids Res.*, **40**, 9089–9101.
8. Bergeron, D., Pal, G., Beaulieu, Y.B., Chabot, B. and Bachand, F. (2015) Regulated intron retention and nuclear pre-mRNA decay contribute to PABPN1 autoregulation. *Mol. Cell. Biol.*, **35**, 2503–2517.
9. Muniz, L., Davidson, L. and West, S. (2015) Poly(A) polymerase and the nuclear poly(A) binding protein, PABPN1, coordinate the splicing and degradation of a subset of human pre-mRNAs. *Mol. Cell. Biol.*, **35**, 2218–2230.
10. Beaulieu, Y.B., Kleinman, C.L., Landry-Voyer, A.-M., Majewski, J. and Bachand, F. (2012) Polyadenylation-dependent control of long noncoding RNA expression by the poly(A)-binding protein nuclear 1. *PLoS Genet.*, **8**, e1003078.
11. Lemay, J.-F., D'Amours, A., Lemieux, C., Lackner, D.H., St-Sauveur, V.G., Bähler, J. and Bachand, F. (2010) The nuclear

- poly(A)- binding protein interacts with the exosome to promote synthesis of noncoding small nucleolar RNAs. *Mol. Cell*, **37**, 34–45.
12. Bresson, S.M. and Conrad, N.K. (2013) The human nuclear poly(A)- binding protein promotes RNA hyperadenylation and decay. *PLoS Genet.*, **9**, e1003893.
 13. Banerjee, A., Vest, K.E., Pavlath, G.K. and Corbett, A.H. (2017) Nuclear poly(A) binding protein 1 (PABPN1) and Matrin3 interact in muscle cells and regulate RNA processing. *Nucleic Acids Res.*, **45**, 10706–10725.
 14. Apponi, L.H., Corbett, A.H. and Pavlath, G.K. (2013) Control of mRNA stability contributes to low levels of nuclear poly(A) binding protein 1 (PABPN1) in skeletal muscle. *Skelet. Muscle*, **3**, 23.
 15. Gidaro, T., Negroni, E., Perié, S., Mirabella, M., Lainé, J., Lacau St Guily, J., Butler-Browne, G., Mouly, V. and Trollet, C. (2013) Atrophy, fibrosis, and increased PAX7-positive cells in pharyngeal muscles of oculopharyngeal muscular dystrophy patients. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **72**, 234–243.
 16. Tomé, F.M. and Fardeau, M. (1980) Nuclear inclusions in oculopharyngeal dystrophy. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, **49**, 85–87.
 17. Anvar, S.Y., Raz, Y., Verwey, N., van der Sluijs, B., Venema, A., Goeman, J.J., Vissing, J., van der Maarel, S.M., 't Hoen, P.A., van Engelen, B.G. et al. (2013) A decline in PABPN1 induces progressive muscle weakness in oculopharyngeal muscle dystrophy and in muscle aging. *Aging*, **5**, 412.
 18. Malerba, A., Klein, P., Bachtarzi, H., Jarmin, S.A., Cordova, G., Ferry, A., Strings, V., Espinoza, M.P., Mamchaoui, K., Blumen, S.C. et al. (2017) PABPN1 gene therapy for oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nat. Commun.*, **8**, 14848.
 19. Vest, K.E., Phillips, B.L., Banerjee, A., Apponi, L.H., Dammer, E.B., Xu, W., Zheng, D., Yu, J., Tian, B., Pavlath, G.K. et al. (2017) Novel mouse models of oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) reveal early onset mitochondrial defects and suggest loss of PABPN1 may contribute to pathology. *Hum. Mol. Genet.*, **26**, 3235–3252.
 20. Blumen, S.C., Brais, B., Korczyn, A.D., Medinsky, S., Chapman, J., Asherov, A., Nisipeanu, P., Codère, F., Bouchard, J.P., Fardeau, M. et al. (1999) Homozygotes for oculopharyngeal muscular dystrophy have a severe form of the disease. *Ann. Neurol.*, **46**, 115–118.
 21. Abu-Baker, A., Laganiere, J., Gaudet, R., Rochefort, D., Brais, B., Neri, C., Dion, P.A. and Rouleau, G.A. (2013) Lithium chloride attenuates cell death in oculopharyngeal muscular dystrophy by perturbing Wnt/ β -catenin pathway. *Cell Death Dis.*, **4**, e821.
 22. Bao, Y.P., Cook, L.J., O'Donovan, D., Uyama, E. and Rubinsztein, D.C. (2002) Mammalian, yeast, bacterial, and chemical chaperones reduce aggregate formation and death in a cell model of oculopharyngeal muscular dystrophy. *J. Biol. Chem.*, **277**, 12263–12269.
 23. Bao, Y.P., Sarkar, S., Uyama, E. and Rubinsztein, D.C. (2004) Congo red, doxycycline, and HSP70 overexpression reduce aggregate formation and cell death in cell models of oculopharyngeal muscular dystrophy. *J. Med. Genet.*, **41**, 47–51.
 24. Barbezier, N., Chartier, A., Bidet, Y., Buttstedt, A., Voisset, C., Galons, H., Blondel, M., Schwarz, E. and Simonelig, M. (2011) Antiprion drugs 6-aminophenanthridine and guanabenz reduce PABPN1 toxicity and aggregation in oculopharyngeal muscular dystrophy. *EMBO Mol. Med.*, **3**, 35–49.
 25. Davies, J.E., Wang, L., Garcia-Oroz, L., Cook, L.J., Vacher, C., O'Donovan, D.G. and Rubinsztein, D.C. (2005) Doxycycline attenuates and delays toxicity of the oculopharyngeal muscular dystrophy mutation in transgenic mice. *Nat. Med.*, **11**, 672–677.
 26. Anvar, S.Y., 't Hoen, P.A., Venema, A., Van Der Sluijs, B., Van Engelen, B., Snoeck, M., Vissing, J., Trollet, C., Dickson, G., Chartier, A. et al. (2011) Deregulation of the ubiquitin-proteasome system is the predominant molecular pathology in OPMD animal models and patients. *Skelet. Muscle*, **1**.
 27. Davies, J.E., Rose, C., Sarkar, S. and Rubinsztein, D.C. (2010) Cystamine suppresses polyalanine toxicity in a mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Sci. Transl. Med.*, **2**, 34ra40.
 28. Périé, S., Trollet, C., Mouly, V., Vanneaux, V., Mamchaoui, K., Bouazza, B., Marolleau, J.P., Laforêt, P., Chapon, F., Eymard, B. et al. (2014) Autologous myoblast transplantation for oculopharyngeal muscular dystrophy: a phase I/IIa clinical study. *Mol. Ther.*, **22**, 219–225.
 29. Argov, Z., Gliko-Kabir, I., Brais, B., Caraco, Y. and Megiddo, D. (2016) Intravenous trehalose improves dysphagia and muscle function in oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD): preliminary results of 24 weeks open label phase 2 trial (I4.007). *Neurology*, **86**, I4.007.
 30. Nash, D.T. (1973) Clinical trial with guanabenz, a new antihypertensive agent. *J. Clin. Pharmacol.*, **13**, 416–421.
 31. Tribouillard-Tanvier, D., Béringue, V., Desban, N., Gug, F., Bach, S., Voisset, C., Galons, H., Laude, H., Vilette, D. and Blondel, M. (2008) Antihypertensive drug guanabenz is active in vivo against both yeast and mammalian prions. *PLoS One*, **3**, e1981.
 32. Blondel, M., Soubigou, F., Evrard, J., Nguyen, P.H., Hasin, N., Chédin, S., Gillet, R., Contesse, M.-A., Friocourt, G., Stahl, G. et al. (2016) Protein folding activity of the ribosome is involved in yeast prion propagation. *Sci. Rep.*, **6**, 32117.
 33. Nguyen, P.H., Hammoud, H., Halliez, S., Pang, Y., Evrard, J., Schmitt, M., Oumata, N., Bourguignon, J.-J., Sanyal, S., Béringue, V. et al. (2014) Structure-activity relationship study around guanabenz identifies two derivatives retaining antiprion activity but having lost α 2-adrenergic receptor agonistic activity. *ACS Chem. Neurosci.*, **5**, 1075–1082.
 34. Reis, S.D., Pang, Y., Vishnu, N., Voisset, C., Galons, H., Blondel, M. and Sanyal, S. (2011) Mode of action of the antiprion drugs 6AP and GA on ribosome assisted protein folding. *Biochimie*, **93**, 1047–1054.
 35. Vieira, F.G., Ping, Q., Moreno, A.J., Kidd, J.D., Thompson, K., Jiang, B., Lincecum, J.M., Wang, M.Z., De Zutter, G.S., Tassinari, V.R. et al. (2015) Guanabenz treatment accelerates disease in a mutant SOD1 mouse model of ALS. *PLoS One*, **10**, e0135570.
 36. Wang, L., Popko, B., Tixier, E. and Roos, R.P. (2014) Guanabenz, which enhances the unfolded protein response, ameliorates mutant SOD1-induced amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.*, **71**, 317–324.
 37. Tsaytler, P., Harding, H.P., Ron, D. and Bertolotti, A. (2011) Selective inhibition of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 restores proteostasis. *Science*, **332**, 91–94.
 38. Carrara, M., Sigurdardottir, A. and Bertolotti, A. (2017) Decoding the selectivity of eIF2 α holophosphatases and PPP1R15A inhibitors. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **24**, 708–716.
 39. Das, I., Krzyzosiak, A., Schneider, K., Wrabetz, L., D'Antonio, M., Barry, N., Sigurdardottir, A. and Bertolotti, A. (2015) Preventing proteostasis diseases by selective inhibition of a phosphatase regulatory subunit. *Science*, **348**, 239–242.
 40. Choy, M.S., Yusoff, P., Lee, I.C., Newton, J.C., Goh, C.W., Page, R., Shenolikar, S. and Peti, W. (2015) Structural and functional

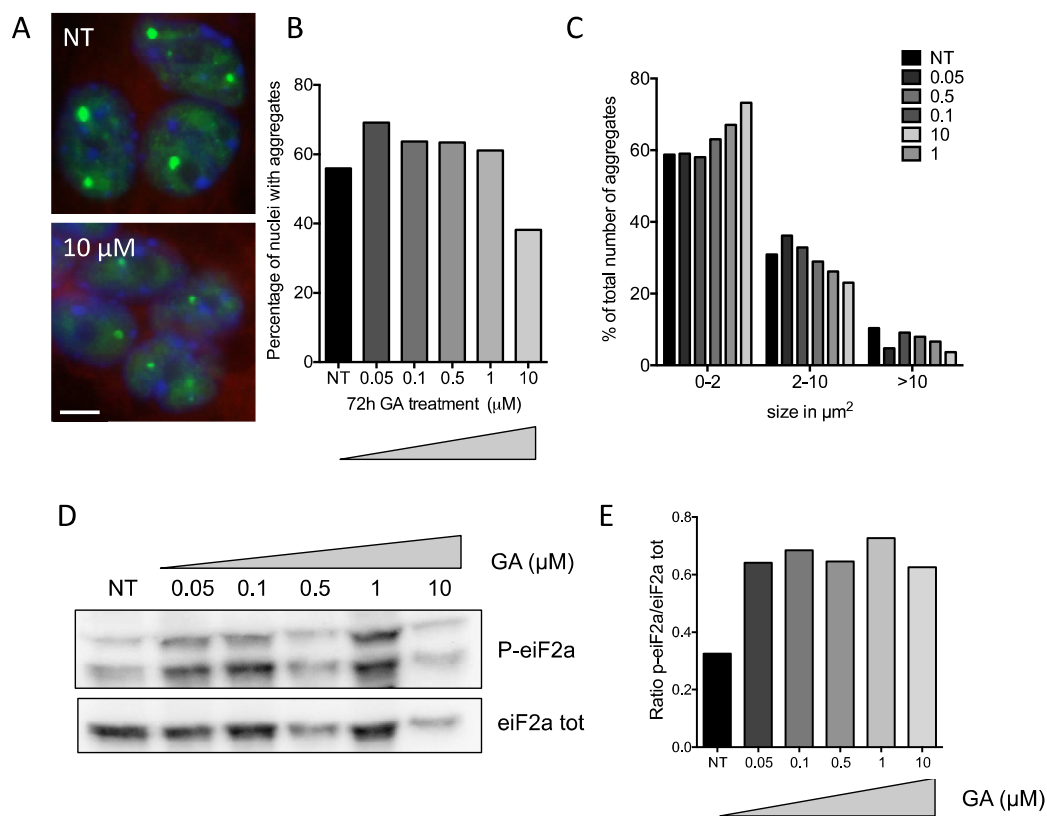
- analysis of the GADD34:PP1 eIF2 α phosphatase. *Cell Rep.*, **11**, 1885–1891.
41. Crespillo-Casado, A., Chambers, J.E., Fischer, P.M., Marciniak, S.J. and Ron, D. (2017) PPP1R15A-mediated dephosphorylation of eIF2 α is unaffected by Sephin1 or guanabenz. *Elife*, **6**, pii: e26109.
 42. Crespillo-Casado, A., Claes, Z., Choy, M.S., Peti, W., Bollen, M. and Ron, D. (2018) A Sephin1-insensitive tripartite holophosphatase dephosphorylates translation initiation factor 2 α . *J. Biol. Chem.*, **293**, 7766–7776.
 43. Klein, P., Oloko, M., Roth, F., Montel, V., Malerba, A., Jarmin, S., Gidaro, T., Popplewell, L., Perie, S., Lacau St Guily, J. et al. (2016) Nuclear poly(A)-binding protein aggregates misplace a pre-mRNA outside of SC35 speckle causing its abnormal splicing. *Nucleic Acids Res.*, doi: [10.1093/nar/gkw703](https://doi.org/10.1093/nar/gkw703).
 44. Raz, V., Routledge, S., Venema, A., Buijze, H., van der Wal, E., Anvar, S., Straasheijm, K.R., Klooster, R., Antoniou, M. and van der Maarel, S.M. (2011) Modeling oculopharyngeal muscular dystrophy in myotube cultures reveals reduced accumulation of soluble mutant PABPN1 protein. *Am. J. Pathol.*, **179**, 1988–2000.
 45. Neuber, C., Uebeler, J., Schulze, T., Sotoud, H., El-Armouche, A. and Eschenhagen, T. (2014) Guanabenz interferes with ER stress and exerts protective effects in cardiac myocytes. *PLoS One*, **9**, e98893.
 46. Akiyama, M., Hatanaka, M., Ohta, Y., Ueda, K., Yanai, A., Uehara, Y., Tanabe, K., Tsuru, M., Miyazaki, M., Saeki, S. et al. (2009) Increased insulin demand promotes while pioglitazone prevents pancreatic beta cell apoptosis in Wfs1 knockout mice. *Diabetologia*, **52**, 653–663.
 47. Riggs, A.C., Bernal-Mizrachi, E., Ohsugi, M., Wasson, J., Fatrai, S., Welling, C., Murray, J., Schmidt, R.E., Herrera, P.L. and Permutt, M.A. (2005) Mice conditionally lacking the Wolfram gene in pancreatic islet beta cells exhibit diabetes as a result of enhanced endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Diabetologia*, **48**, 2313–2321.
 48. Weidler, D.J., Garg, D.C. and Jallad, N.S. (1984) Dose-response relationship of single oral doses of guanabenz in hypertensive patients. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **6**(Suppl 5), S762–S765.
 49. Walker, B.R., Deitch, M.W., Schneider, B.E., Hare, L.E. and Gold, J.A. (1981) Long-term therapy of hypertension with guanabenz. *Clin. Ther.*, **4**, 217–228.
 50. Trollet, C., Anvar, S.Y., Venema, A., Hargreaves, I.P., Foster, K., Vignaud, A., Ferry, A., Negroni, E., Hourde, C., Baraibar, M.A. et al. (2010) Molecular and phenotypic characterization of a mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy reveals severe muscular atrophy restricted to fast glycolytic fibres. *Hum. Mol. Genet.*, **19**, 2191–2207.
 51. Lindholm, D., Korhonen, L., Eriksson, O. and Kõks, S. (2017) Recent insights into the role of unfolded protein response in ER stress in health and disease. *Front. Cell Dev. Biol.*, **5**, 48.
 52. Reyes, J.M. and Hoenig, E.M. (1981) Intracellular spiral inclusions in cerebral cell processes in Creutzfeldt–Jakob disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **40**, 1–8.
 53. Tanaka, S., Saito, M., Morimatsu, M. and Ohama, E. (2000) Immunohistochemical studies of the PrP(CJD) deposition in Creutzfeldt–Jakob disease. *Neuropathology*, **20**, 124–133.
 54. Tsuru, A., Imai, Y., Saito, M. and Kohno, K. (2016) Novel mechanism of enhancing IRE1 α -XBP1 signalling via the PERK-ATF4 pathway. *Sci. Rep.*, **6**, 24217.
 55. Byrd, A.E., Aragon, I.V. and Brewer, J.W. (2012) MicroRNA-30c-2* limits expression of proadaptive factor XBP1 in the unfolded protein response. *J. Cell Biol.*, **196**, 689–698.
 56. Chhabra, R., Dubey, R. and Saini, N. (2011) Gene expression profiling indicate role of ER stress in miR-23a~27a~24-2 cluster induced apoptosis in HEK293T cells. *RNA Biol.*, **8**, 648–664.
 57. Chartier, A., Benoit, B. and Simonelig, M. (2006) A Drosophila model of oculopharyngeal muscular dystrophy reveals intrinsic toxicity of PABPN1. *EMBO J.*, **25**, 2253–2262.
 58. Chartier, A., Klein, P., Pierson, S., Barbezier, N., Gidaro, T., Casas, F., Carberry, S., Dowling, P., Maynadier, L., Bellec, M. et al. (2015) Mitochondrial dysfunction reveals the role of mRNA poly(A) tail regulation in oculopharyngeal muscular dystrophy pathogenesis. *PLoS Genet.*, **11**, e1005092.
 59. Brown, M.K. and Naidoo, N. (2012) The endoplasmic reticulum stress response in aging and age-related diseases. *Front. Physiol.*, **3**, 263.
 60. Fritz, J.M., Dong, M., Apsley, K.S., Martin, E.P., Na, C.-L., Sitaraman, S. and Weaver, T.E. (2014) Deficiency of the BiP cochaperone ERdj4 causes constitutive endoplasmic reticulum stress and metabolic defects. *Mol. Biol. Cell*, **25**, 431–440.
 61. Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calfon, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R. et al. (2003) An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol. Cell*, **11**, 619–633.
 62. Jiang, P., Gan, M., Lin, W.-L. and Yen, S.-H.C. (2014) Nutrient deprivation induces α -synuclein aggregation through endoplasmic reticulum stress response and SREBP2 pathway. *Front. Aging Neurosci.*, **6**, 268.
 63. Krebs, J., Agellon, L.B. and Michalak, M. (2015) Ca(2+) homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: an integrated view of calcium signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **460**, 114–121.
 64. Hamdan, N., Kritsiligkou, P. and Grant, C.M. (2017) ER stress causes widespread protein aggregation and prion formation. *J. Cell Biol.*, **216**, 2295–2304.
 65. Corbeil-Girard, L.-P., Klein, A.F., Sasseville, A.M.-J., Lavoie, H., Dicaire, M.-J., Saint-Denis, A., Pagé, M., Duranceau, A., Codère, F., Bouchard, J.-P. et al. (2005) BAPBN1 overexpression leads to upregulation of genes encoding nuclear proteins that are sequestered in oculopharyngeal muscular dystrophy nuclear inclusions. *Neurobiol. Dis.*, **18**, 551–567.
 66. Tavanez, J.P., Bengoechea, R., Berciano, M.T., Lafarga, M., Carmo-Fonseca, M. and Enguita, F.J. (2009) Hsp70 chaperones and type I PRMTs are sequestered at intranuclear inclusions caused by polyalanine expansions in PABPN1. *PLoS One*, **4**, e6418.
 67. García-Castañeda, M., Vega, A.V., Rodríguez, R., Montiel-Jaen, M.G., Cisneros, B., Zarain-Herzberg, A. and Avila, G. (2017) Functional impact of an oculopharyngeal muscular dystrophy mutation in PABPN1. *J. Physiol.*, **595**, 4167–4187.
 68. Bahar, E., Kim, H. and Yoon, H. (2016) ER stress-mediated signaling: action potential and Ca(2+) as key players. *Int. J. Mol. Sci.*, **17**.
 69. Pinton, P., Giorgi, C., Siviero, R., Zecchini, E. and Rizzuto, R. (2008) Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis. *Oncogene*, **27**, 6407–6418.
 70. Lee, K., Tirasophon, W., Shen, X., Michalak, M., Prywes, R., Okada, T., Yoshida, H., Mori, K. and Kaufman, R.J. (2002) IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev.*, **16**, 452–466.
 71. Deldicque, L. (2013) Endoplasmic reticulum stress in human skeletal muscle: any contribution to sarcopenia? *Front. Physiol.*, **4**, 236.

72. Morgan, J.E., Beauchamp, J.R., Pagel, C.N., Peckham, M., Ataliotis, P., Jat, P.S., Noble, M.D., Farmer, K. and Partridge, T.A. (1994) Myogenic cell lines derived from transgenic mice carrying a thermolabile T antigen: a model system for the derivation of tissue-specific and mutation-specific cell lines. *Dev. Biol.*, **162**, 486–498.
73. Holmes, B., Brogden, R.N., Heel, R.C., Speight, T.M. and Avery, G.S. (1983) Guanabenz. A review of its pharmacodynamic properties and therapeutic efficacy in hypertension. *Drugs*, **26**, 212–229.
74. Malerba, A., Sharp, P.S., Graham, I.R., Arechavala-Gomez, V., Foster, K., Muntoni, F., Wells, D.J. and Dickson, G. (2011) Chronic systemic therapy with low-dose morpholino oligomers ameliorates the pathology and normalizes locomotor behavior in mdx mice. *Mol. Ther.*, **19**, 345–354.
75. Boyle, E.I., Weng, S., Gollub, J., Jin, H., Botstein, D., Cherry, J.M. and Sherlock, G. (2004) GO::TermFinder—open source software for accessing Gene Ontology information and finding significantly enriched Gene Ontology terms associated with a list of genes. *Bioinformatics*, **20**, 3710–3715.
76. Yu, G., Wang, L.-G., Han, Y. and He, Q.-Y. (2012) clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS*, **16**, 284–287.
77. Carlson, M. (2018) [org.Mm.eg.db](https://org.mmm.org): Genome wide annotation for Mouse. R package version 3.6.0. Bioconductor.

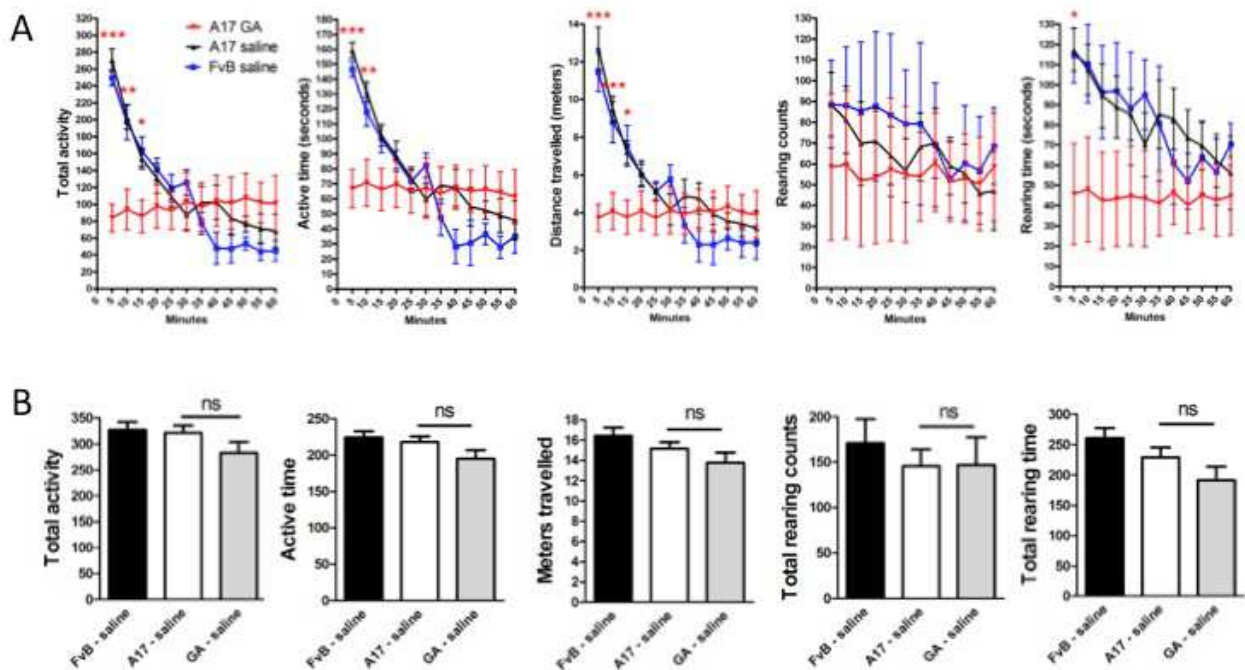
Supplementary Information



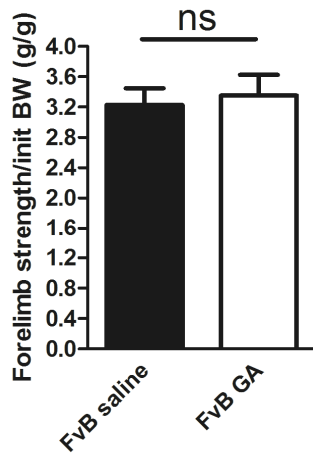
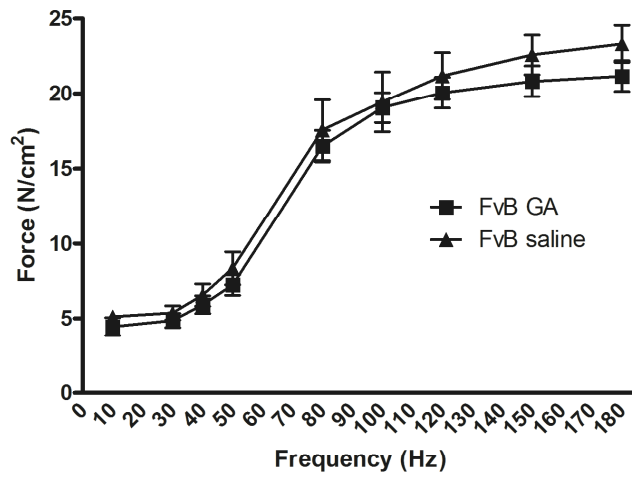
Supplementary figure 1: Muscle differentiation is not altered in Ala17 murine cell model of OPMD after GA treatment. Ala17 cells were treated with 10 μ M GA at day 2 of differentiation for 3 additional days. **(A)** Muscle differentiation is similar in non-treated and treated Ala17 cells. Phalloidin staining (red) is used to visualize myotubes. Nuclei are stained with Hoechst (blue). **(B)** Fusion index was similar in non-treated (NT) and treated (+GA) Ala17 cells. Fusion index is calculated as the percentage of nuclei included in myotubes on the total percentage of nuclei. Unpaired t-test, ns: not significant; 1000 nuclei counted per condition. **(C-D)** The splicing inclusion of *Bin1* exon 10 (physiologically enhanced during myoblast differentiation) is comparable in Ala17 non-treated and GA-treated cells. Unpaired t-test, ns, not significant.



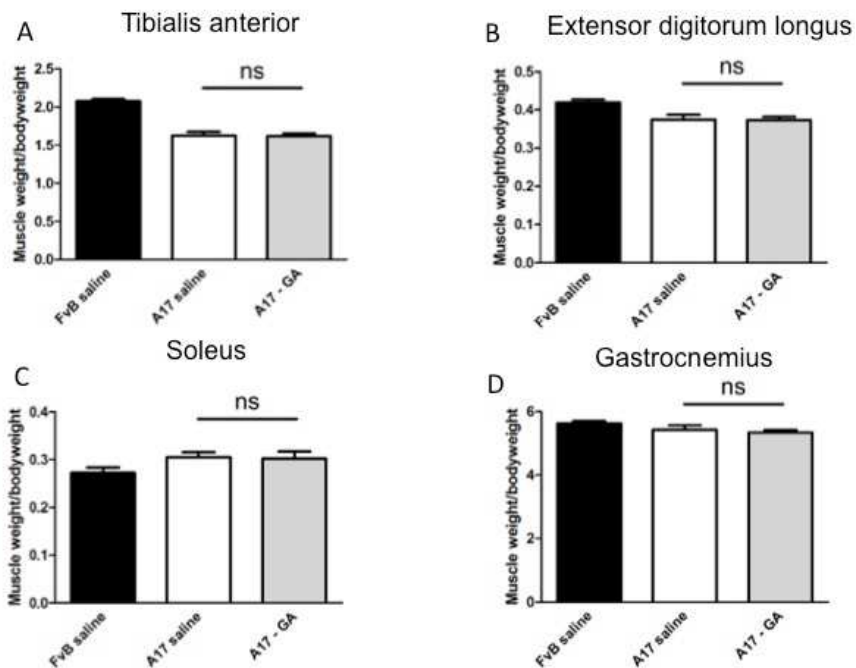
Supplementary figure 2: PABPN1 nuclear aggregates are sensitive to GA treatment in a dose-dependent manner. (A) Representative image of the size of nuclear aggregates in Ala17 cells treated with 10 μM of GA compared with non-treated OPMD cells (NT). Nuclear aggregates are stained with PABPN1 antibody (green) and nuclei are counterstained with Hoechst (blue). Scale bar = 5 μm. (B) Percentage of nuclei with aggregates decreased with 10 μM GA treatment. Percentage of nuclear aggregates is calculated as the number of nuclei with aggregates on the number of nuclei in myotubes. NT=non treated (DMSO). (C) The size of nuclear aggregates is gradually impacted with increasing doses of GA (μM). Size of nuclear aggregates was determined using image J in an automatic manner. The sizes are arbitrary classified in 3 categories: small: 0-2 μm²; medium: 2-10 μm² and large: >10 μm². (D-E) Western blot and quantification showing an increase in phosphorylated eIF2α (P-eIF2α) in Ala17 cells treated with a range of concentration of GA (0.05 to 10 μM) compared to DMSO-treated cells (NT).



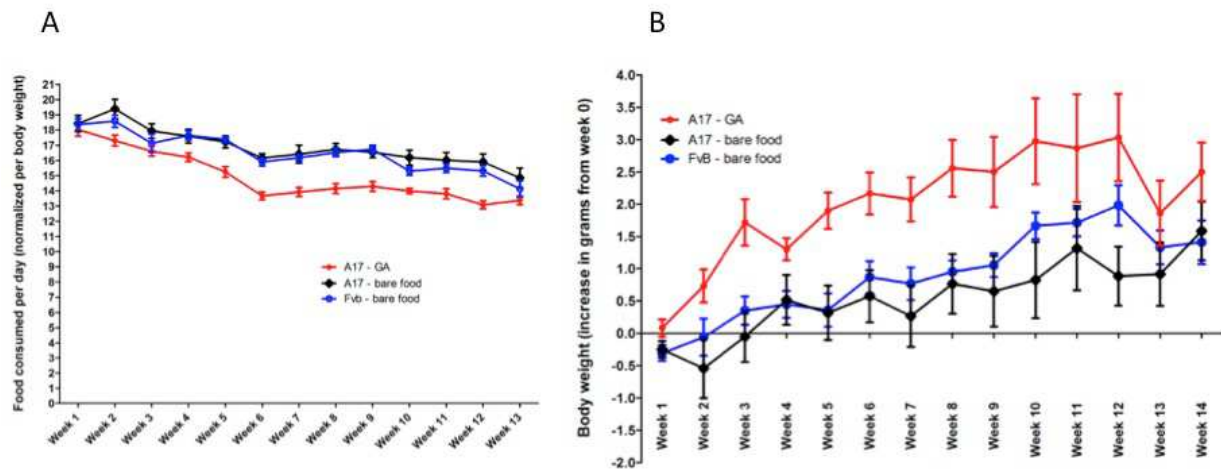
Supplementary figure 3: GA administration affects locomotor behavior of A17 mice soon after a single injection but effects are transient. After either the first or the last injections of the study mice were housed for 60 minutes in activity cages to monitor their locomotor behavior and 21 parameters were analyzed. (A) Data on total activity, active time, distance travelled, number of rearing and rearing time show that during the first 30 minutes of monitoring, mice treated with GA are less active than control mice treated with saline. One-way ANOVA test with Bonferroni post-hoc test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Red stars refer to A17 GA vs A17 saline comparison. (B) The same parameters analyzed in mice at the end of the treatment (more than 24h after the last GA administration) show that mouse behavior is not significantly affected by the drug administration. One-way ANOVA test with Bonferroni post-hoc test. ns: not significant. Data are presented as mean \pm s.e.m. $n = 6$ per group.

A**B**

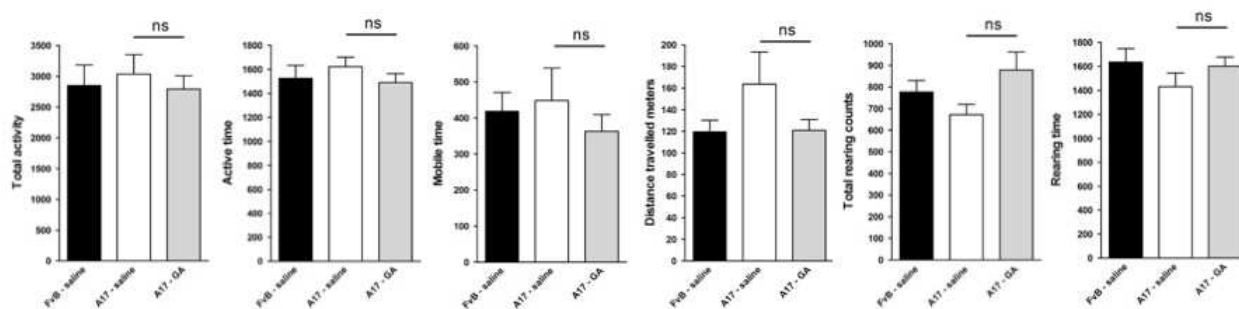
Supplementary figure 4: GA administration has no effect on FvB mice. (A) Grip-strength analysis performed in mice at the end of a 13-week long treatment shows that forelimbs of FvB mice treated with GA were indistinguishable from FvB mice treated with saline. Unpaired t-test, ns non significant. (B) *in situ* muscle physiology in muscles: force-frequency analysis of maximal force generated by TA muscles of treated mice shows that GA administration has no effect on the maximal force generated by TA muscles of FvB mice.



Supplementary figure 5: Muscle weight is not affected by i.p. administration of GA. Muscles from mice treated by i.p. injection of GA or saline were harvested and weighted: weight of Tibialis anterior, Extensor digitorum longus, Soleus and Gastrocnemius were normalized by the initial bodyweight of each treated mice. No statistical difference was present among groups for any muscle. One-way ANOVA test with Bonferroni post-hoc test. ns: not significant.



Supplementary figure 6: Mice orally fed with chow supplemented with GA ate and grew similarly to mice fed with bare food. n=6-8, 10-12 week old mice per group were fed with GA supplemented chow or bare food. Mice were caged individually and the pellets changed twice a week for 13 weeks until the end of the experiment. **(A)** During the experiment, food was weighted each time in order to assess the amount of food eaten by the mice. Mice treated with GA ate about 10% less food than mice supplemented with bare food. **(B)** Mice were weighted weekly. All mice grew similarly and consistently along the 13-week long experiment.



Supplementary figure 7: GA administration does not affect locomotor behavior of A17 mice orally fed with GA supplemented food. At the end of the study mice were housed for 60 minutes in activity cages to monitor their locomotor behavior and several parameters were analyzed. Data on total activity, active time, distance travelled, number of rearing and rearing time show that locomotor behavior of mice treated with GA is similar to the one of mice eating bare food. Data are presented as mean \pm s.e.m. One-way ANOVA test with Bonferroni post-hoc test. ns: not significant.

Table S1: primers used for the study

| Name | Séquence 5'->3' |
|-----------|------------------------|
| mXbp1-F | AGTTAAGAACACGCTTGGGAAT |
| mXbp1-R | AAGATGTTCTGGGGAGGTGAC |
| mAtf4-F | GACCGAGATGAGCTTCCTGA |
| mAtf4-R | GCCAAGCCATCATCCATAGC |
| mGrp78-F | CTTGATCAGCGGGTCATGG |
| mGrp78-R | AGCTCTTCAAATTTGGCCCG |
| mDdit3-F | TCACTACTCTTGACCCTGCG |
| mDdit3-R | ACTGACCACTCTGTTTCCGT |
| mDnajc3-F | TAAGGATGAGAAGCCCGTGG |
| mDnajc3-R | TCCCGAATCTGCTGGTCATT |
| mGrp94-F | AGTCGGGAAGCAACAGAGAA |
| mGrp94-R | TCTCCATGTTGCCAGACCAT |

Table S2: Physical activity and behavior of mice were analyzed using open-field behavioral cages where two levels of lasers were used to monitor the activity of mice. 6 parameters were evaluated.

| Parameters measured by activity cages | |
|--|---|
| Total Activity | Total beam breaks |
| Active Time | This count is incremented every time an animal is active (breaking the same or different beams) in any given second |
| Distance travelled in meters | Calculation of meters travelled by the mice into the cage |
| Mobile Time | This count is incremented every time an animal is mobile (breaks different beams) in any given second |
| Total Rearing Counts | Count of second (higher) level beam breaks |
| Rearing Time | This count is incremented every time an animal is rearing in any given second |

II. Discussion et résultats complémentaires

Dans notre étude, nous avons démontré le rôle bénéfique du GA à la fois *in vitro* dans un modèle cellulaire OPMD et *in vivo* dans le modèle murin A17.1 de l'OPMD. Le traitement diminue le nombre et la taille des agrégats de PABPN1 et permet d'améliorer la force musculaire et de réduire la fibrose chez la souris. Nous avons pu démontrer *in vitro* que le GA agissait (1) via la voie PERK en activant la phosphorylation de eIF2 α et (2) via la voie IRE1 en activant l'épissage de *XBPI*. Cette étude nous a également permis de mettre en évidence pour la première fois la présence de stress du réticulum endoplasmique dans l'OPMD.

Activation de stress de l'ER dans les dystrophies musculaires

Une augmentation des marqueurs UPR a été observée dans quelques maladies musculaires : on observe une augmentation de *ATF4*, *DDIT3*, *ATF6* et *XBPI* dans les muscles des patients atteints de myosites à inclusion sporadiques (Vattemi et al., 2004) et une augmentation de l'expression de *GRP78* et *GRP94* dans les muscles des patients atteints de myasthénie grave (Iwasa et al., 2014; Suzuki et al., 2011) ou encore de dystrophie myotonique de type 1 (Ikezoe et al., 2007). Bien que ces observations permettent aux auteurs de conclure à un stress de l'ER dans les muscles de ces pathologies, les raisons pour lesquelles ce stress est activé ne sont pas connues.

Origine du stress de l'ER dans l'OPMD

PABPN1 est une protéine nucléaire et n'est donc ni sécrétée ni transmembranaire. Ainsi, par définition, PABPN1 n'a aucune raison de transiter par l'ER. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en utilisant la méthode de profilage ribosomale spécifique du ER qui consiste à déterminer toutes les protéines associées à des ribosomes spécifiques du ER (Jan et al., 2014). Si PABPN1 est effectivement absente du ER, on peut exclure l'hypothèse que le stress de l'ER observé dans l'OPMD soit dû au mauvais repliement de la protéine PABPN1 mutée au sein du réticulum.

L'ER stress pourrait être lié à la séquestration dans les agrégats de GRP78 aboutissant à une perte de fonction de cette dernière dans l'ER.

Le stress de l'ER pourrait également être secondaire aux agrégats et être déclenché en réaction à un autre défaut observé l'OPMD. Par exemple, il a été récemment démontré que la

mutation dans PABPN1 aboutissait à des défauts de l'homéostasie calcique en altérant le contenu en calcium de l'ER, en inhibant la relargage du calcium de l'ER et en réduisant l'expression du récepteur calcium ryanodine (García-Castañeda et al., 2017). De plus, il a été proposé que le piégeage du pré-ARNm de *TNNT3* dans les agrégats de PABPN1 entraînait une diminution de la sensibilité des fibres au calcium (Klein et al., 2016). Ces études suggèrent que des dérégulations de l'homéostasie du calcium jouent un rôle dans l'OPMD et nous proposons que ces dérégulations pourraient être une des causes majeures du stress de l'ER dans l'OPMD.

Le lien entre le stress de l'ER et les autres défauts moléculaires

Nos résultats *in vitro* permettent de montrer que la GA active la voie UPR cependant, *in vivo*, le niveau d'expression des gènes UPR reste inchangé. Nous proposons l'hypothèse selon laquelle le stress de l'ER est une cause d'un ou de plusieurs défauts cellulaires comme des altérations du système ubiquitine/protéasome (UPS), des défauts mitochondriaux ou de l'apoptose déjà décrits dans l'OPMD. En effet, il a été montré qu'une activation excessive du stress de l'ER pouvait aboutir à de l'apoptose notamment médiée par la voie mitochondriale (Malhotra and Kaufman, 2011) mais été également associée à des dérégulations du système UPS (Menéndez-Benito et al., 2005). On peut ainsi proposer que le traitement au GA induit une réponse UPR qui permet de diminuer le nombre d'agrégats et ainsi de libérer les facteurs piégés dans les agrégats. Ceci aurait pour conséquence d'alléger le stress de l'ER et donc pourrait améliorer un ou plusieurs des défauts observés dans l'OPMD. Nous proposons que l'action du GA sur le stress de l'ER se fasse de manière très transitoire ce qui explique que chez la souris, nous n'ayons pas été en mesure de détecter son action moléculaire ni sur le stress de l'ER ni sur les autres défauts associés à l'OPMD. Cependant, l'action cumulée du GA sur l'UPR pendant les 13 semaines de traitement aboutit à une amélioration des phénotypes musculaires.

Cependant, nous ne pouvons pas exclure que chez la souris, les gènes UPR soient fortement surexprimés en raison de la surexpression de la protéine PABPN1 mutée tout au long de la vie de l'animal. Ainsi il est possible que du fait de cette surexpression, il ne soit pas possible d'agir d'avantage sur la réponse UPR ou alors que des changements modestes ne puissent pas être détectés.

L'activité PPAR joue-t-elle un rôle dans la formation des agrégats?

Nos résultats *in vitro* et *in vivo* montrent une diminution de 30% des noyaux contenant des agrégats après traitement au GA. Ceci pourrait provenir du fait que le stress de l'ER n'est pas la seule voie impliquée dans la formation des agrégats et que l'activité PFAR pourrait également jouer un rôle. Bien que cette activité de l'ARNr ne soit que très peu décrite chez les mammifères, nous allons utiliser plusieurs stratégies pour évaluer si elle entre en jeu dans la formation des agrégats: 1/ transfecter nos cellules H2k-Ala17 avec un ARN 28S transcrit *in vitro* ; 2/ éteindre le gène *Ltv1* qui code la petite sous-unité 18s du ribosome par ARN interférant. Ceci devrait pouvoir permettre d'augmenter l'activité du 28s portant l'activité PFAR; 3/ utiliser d'autres drogues connues pour leur activité anti-PFAR comme par exemple le 6AP (Banerjee and Sanyal, 2014). Si PFAR est impliqué dans la formation des agrégats, les résultats des expériences 1/ et 2/ devraient nous montrer des agrégats plus gros ou plus nombreux par rapport à la condition H2K-Ala17 contrôle. Les résultats de l'expérience 3/ devraient eux nous montrer une diminution de la taille ou du nombre des noyaux avec agrégats.

Comment améliorer l'efficacité du traitement chez la souris ?

Pour améliorer l'efficacité du traitement chez la souris, augmenter la dose administrée ne serait pas envisageable car la concentration de GA injectée chez la souris a été calculée pour coller à ce qui serait administré chez l'homme. En revanche, il serait envisageable d'augmenter le temps de traitement pour voir si l'efficacité du traitement est croissante avec le temps. Par ailleurs, sur cellules comme chez la souris, il serait intéressant d'administrer le GA tardivement, lorsque les agrégats sont déjà formés afin de voir si le traitement empêche la formation des agrégats ou agit sur les agrégats déjà formés.

Peut-on envisager un traitement chez l'homme ?

Notre traitement au GA ne permet de diminuer « que » de 30% le pourcentage de noyaux avec agrégats. Il est important de garder à l'esprit que dans ce modèle murin, la surexpression de PABPN1 aboutit à un pourcentage d'agrégat avoisinant les 30% de noyaux avec agrégats, ce qui est en moyenne au moins trois fois plus que chez l'homme. On peut ainsi imaginer qu'une diminution de 30% des noyaux avec agrégats chez l'homme aurait un impact plus significatif en diminuant le pourcentage d'agrégats de 7% à moins de 5% en moyenne.

En raison de sa forte action hypotensive, cette molécule ne peut cependant pas être envisagée comme traitement thérapeutique chez l'homme (Das et al., 2015). Les perspectives de cette étude sont donc de 1/ étudier plus précisément le stress de l'ER chez les patients OPMD en

évaluant par western blot et par immunomarquage lesquelles des voies PERK, IRE1 ou ATF6 sont activées chez l'homme; 2/ tester d'autres molécules dérivés du guanabenz qui modulent d'une part le stress de l'ER et d'autre part l'activité PFAR.

Discussion générale

Les résultats de ces travaux nous permettent de mieux comprendre le rôle des agrégats de PABPN1 dans l'OPMD mais aussi de confirmer qu'une approche pharmacologique ciblant les agrégats est une stratégie thérapeutique pertinente. Cependant, de nombreuses questions restent en suspens et les différentes hypothèses présentées ci-dessous peuvent apporter des éléments de réponse.

1. Pourquoi le niveau de PABPN1 est-il plus faible dans le muscle ?

PABPN1 est plus faiblement exprimé dans le muscle que dans les autres tissus (Apponi et al., 2013b) et nous confirmons que son niveau est exceptionnellement bas dans le muscle cricopharyngien (CPM), qui est cliniquement atteint dans l'OPMD. Ceci met en évidence l'importance cruciale d'étudier sa régulation dans un contexte musculaire. Quelques éléments de la régulation des transcrits de *PABPN1* ont été proposés : 1/ la fixation de la protéine de liaison à l'ARN HUR dans la région 3'UTR de PABPN1 régule négativement l'expression de la protéine (Phillips et al., 2018) ; 2/ l'expression de l'ARN circulaire circPABPN1 aboutit à une diminution de la traduction de PABPN1 (Abdelmohsen et al., 2017) et 3/ PABPN1 autorégule son expression protéique en influençant le ratio pré-ARNm non épissé/ARNm épissé, le pré-ARNm étant dégradé (Bergeron et al., 2015).

Nous avons au laboratoire tout le matériel nécessaire pour regarder si ces régulations sont conservées dans le muscle humain, si elles sont dérégulées dans l'OPMD et si elles sont différentes entre le CPM et les autres muscles (par exemple le sternocléidomastoidien, SCM). Nous pourrions ainsi regarder à partir de biopsies musculaires de peau, de muscle SCM et de muscle CPM de patients contrôles et OPMD 1/ l'expression de circPABPN1 par qRT-pcr ou RT-pcr, 2/ l'expression de HUR par western blot et 3/ le ratio transcrit non épissé/épissé par Northern blot. Identifier les mécanismes qui régulent l'expression de PABPN1 dans le muscle contrôle et OPMD nous permettra éventuellement d'envisager des stratégies thérapeutiques visant à augmenter l'expression protéique de PABPN1 dans le CPM.

2. Pourquoi n'y a-t-il des agrégats que dans le muscle ?

Les agrégats de PABPN1 sont spécifiquement retrouvés dans le muscle. Il a été montré que ces agrégats renaient à la fois la forme sauvage et la forme mutée de PABPN1

(Klein et al., 2008) mais aussi d'autres protéines et ARN (Corbeil-Girard et al., 2005; Fan et al., 2003; Klein et al., 2016; Tavanez et al., 2009).

On peut ainsi supposer que leur formation dépend d'une **protéine ou d'un ARN spécifique du muscle**. Par conséquent, il est indispensable de pouvoir isoler ces agrégats pour en étudier la composition. Nous envisageons pour cela plusieurs stratégies complémentaires les unes des autres: **1/** une extraction des agrégats à partir de biopsies OPMD humaine en utilisant un tampon détergent pour ne récupérer que la forme agrégée résistante à la dégradation (Ayyadevara et al., 2016). **2/** de la microdissection laser sur coupes OPMD pour étudier l'enrichissement en ARN ou en protéines des noyaux avec agrégats comparés aux noyaux sans agrégats. **3/** un gradient de sédimentation sur biopsies de patient contrôle et OPMD pour voir si PABPN1 se trouve dans des complexes protéiques différents entre les deux conditions. Un protocole pour observer les différents complexes de PABPN1 sauvage est déjà au point sur cellules murines (Banerjee et al., 2017) **4/** une double immunoprécipitation (IP) pour isoler spécifiquement les agrégats. Cette double IP sera effectuée en deux étapes : tout d'abord une IP dirigée contre PABPN1 qui nous permettra de purifier PABPN1 sous sa forme sauvage et mutée, soluble et agrégée. Puis, pour ne récupérer que les agrégats, une seconde IP sera dirigée contre des protéines contenues dans les agrégats comme HSP70 ou PRMT1 ou sur d'autres protéines comme CUG-BP1, FKBP1A, SRSF3, HNRPA1 ou PRMT3 dont la présence dans les agrégats a été confirmée par immunofluorescence sur biopsies de patients (Bao et al., 2002; Corbeil-Girard et al., 2005; Fan et al., 2003; Tavanez et al., 2009).

Chacune de ces expériences sera complétée par de la spectroscopie de masse et du RNA seq et les résultats des 4 stratégies seront croisés afin d'identifier la composition exacte en ARN et en protéines des agrégats. L'objectif est de comprendre quelles molécules spécifiques du muscle sont contenues dans ces agrégats afin d'identifier des protéines/ARN cibles pour d'éventuelles stratégies anti-agrégats.

A l'inverse, nous pouvons aussi émettre l'hypothèse que contrairement aux autres tissus, **le muscle n'est pas capable d'éliminer les agrégats de PABPN1**. Le muscle adulte est un tissu post-mitotique où le renouvellement protéique est relativement lent par rapport à d'autres tissus prolifératifs (Wagenmakers, 1998). On peut imaginer que dans le muscle, l'élimination plus lente de PABPN1 muté aboutisse à la formation d'agrégats. Il a proposé que le cerveau, qui est l'autre tissu post-mitotique du corps, pouvait également être atteint dans l'OPMD (Dubbioso et al., 2012) cependant, il faudrait pouvoir valider cette hypothèse sur un plus grand nombre de patients. Des d'agrégats de PABPN1 ont été observés une fois

dans le cerveau d'un patient OPMD (Dion et al., 2005) ce qui pourrait signifier soit que ce tissu est effectivement atteint soit que dans le cerveau, ces agrégats sont asymptomatiques peut-être en raison d'un niveau élevé de PABPN1 (Apponi et al., 2013b). Un nouveau modèle murin de l'OPMD a été mis au point par recombinaison homologue permettant d'exprimer PABPN1 muté à un niveau endogène (Vest et al., 2017). Nous allons regarder si nous confirmons la présence d'agrégats de PABPN1 dans le cerveau de ces souris ce qui étayerait l'hypothèse selon laquelle les agrégats s'accumulent dans des tissus post-mitotiques probablement du à un défaut de dégradation. Nous pourrions alors faire l'hypothèse que stimuler les machineries de dégradation telles que le système ubiquitine-protéasome ou l'autophagie est une bonne stratégie anti-agrégats dans le muscle.

2. Quels éléments permettent de stimuler la formation des agrégats?

Les agrégats de PABPN1 sont observés dans le muscle des patients OPMD et on les retrouve également dès un mois après régénération dans notre modèle de xéno greffe. Cependant, l'étude *in vitro* de myoblastes OPMD isolés à partir de muscles de patients ne nous permet pas d'observer d'agrégats nucléaires de PABPN1. La seule étude montrant des agrégats en culture a été réalisée en 1989, grâce à une co-culture de myotubes de patients OPMD avec des motoneurons de rats pendant deux mois (Tomé et al., 1989).

Au vu de ces observations, nous pensons que plusieurs facteurs entrent en jeu dans la formation des agrégats. Nous pouvons proposer que ces agrégats apparaissent lorsque les cellules sont dans une structure musculaire mature. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que, dans le cas de la xéno greffe par exemple, ces agrégats soient produits en raison du stress infligé au muscle lors de la greffe. Enfin en condition de co-culture les agrégats mettent deux mois à apparaître ce qui suggère que le temps joue également un rôle dans leur formation.

Afin de pouvoir observer des agrégats en culture, nous avons donc mis en place plusieurs stratégies pour **rendre d'avantage matures nos myotubes**: 1/ **ajouter du matrigel**, qui est riche en éléments de la matrice extracellulaire, sur nos myotubes afin de les maintenir le plus longtemps possible en culture. Grâce à cette technique, nous sommes parvenus à maintenir 10-12 jours nos cellules en culture, contre 5-6 jours sans matrigel, mais nous n'avons pas observé d'agrégats. 2/ Nous avons essayé de reproduire les expériences de **co-culture avec des motoneurons** de souris afin de mimer d'avantage la structure musculaire *in vivo*. Nous avons observé des connexions nerveuses dès 3 jours de co-culture mais nous ne sommes parvenus à maintenir les cellules en culture que 17 jours et nous

n'avons pas non plus observé d'agrégats. Nous prévoyons d'optimiser cette expérience en rajoutant par exemple des facteurs de croissance neuronaux ou en empêchant la contraction des myotubes avec de la tétradoxine ce qui pourra aider à maintenir les cellules en culture (Vilmont et al., 2016). 3/ La dernière stratégie que nous allons mettre en place consiste à établir des **muscles artificiels en 3D** à partir de nos cellules OPMD afin d'être le plus proche possible du tissu musculaire humain qui est vascularisé, innervé et soumis à des forces de contraction (Maffioletti et al., 2018)

Afin d'identifier les **stimuli qui permettent l'apparition des agrégats** dans le muscle, nous avons envisagé plusieurs stratégies : **1/ stimuli cataboliques** : il a été montré dans des modèles cellulaires sur-exprimant PABPN1 muté que bloquer l'action du protéasome en utilisant des inhibiteurs spécifiques permettait d'augmenter le pourcentage de noyaux avec agrégats (Abu-Baker et al., 2003; Raz et al., 2011b). Pour voir si l'inhibition du protéasome permet la formation d'agrégats dans nos cellules OPMD humaines, nous les avons traitées avec du MG132, un inhibiteur spécifique du protéasome, à différentes concentrations et à différents temps mais ceci ne nous a pas permis d'observer d'agrégats. Ces résultats suggèrent soit que la formation des agrégats ne provient pas d'un défaut de dégradation soit qu'un autre système de dégradation est en jeu. Pour tester cette deuxième hypothèse, nous pourrions par exemple inhiber l'autophagie dans nos cellules en utilisant des inhibiteurs de Beclin1, une des protéines impliquées dans les premières étapes de cette voie catabolique (Li et al., 2013) **2/ Stimuli mécaniques** : Pour voir si c'est la contraction musculaire qui permet l'apparition des agrégats, nous prévoyons de réaliser *in vitro* des contractions mécaniques de nos myotubes. Ceci consiste à différencier nos cellules sur des plaques de culture spécifiques auxquelles des stimulations mécaniques de force et de durée différentes pourront être appliquées (Riehl et al., 2012). **3/ Stimuli liés au vieillissement**: si on suppose que le vieillissement musculaire joue un rôle dans l'apparition des agrégats, on peut imaginer que les changements moléculaires liés à l'âge puissent avoir un rôle dans leur formation. Nous pouvons ainsi prévoir de transfecter nos cellules avec des ARN codant des protéines associées au vieillissement comme la progérine. En effet, il a été montré que transfecter des fibroblastes provenant de cellules pluripotentes induites (iPSC) avec de la progérine, permettait d'obtenir un profil d'expression ressemblant à celui de fibroblastes de patients âgés (Miller et al., 2013). **4/ Stimuli spécifiques du muscle**. Si l'isolation des agrégats par les 4 techniques proposées plus haut nous permet d'identifier des ARN ou des protéines spécifiques du muscle, nous pourrons transfecter nos cellules avec ces molécules pour voir si elles permettent la formation des agrégats.

L'objectif ici est de comprendre quels sont les stimuli permettant l'apparition des agrégats de PABPN1 spécifiquement dans le muscle afin de pouvoir éventuellement mieux les cibler dans la recherche de nouvelles thérapies. De plus, ceci nous permettrait d'avoir un modèle *in vitro* de cellules humaines OPMD contenant des agrégats afin de pouvoir tester l'efficacité de molécules anti-agrégats.

3. Pourquoi une restriction d'atteinte dans l'OPMD?

Dans l'OPMD, les muscles du pharynx et en particulier le muscle cricopharyngien (CPM) ainsi que les muscles releveurs de la paupière (RPM) sont les premiers touchés. Ces muscles partagent des caractéristiques particulières à savoir une hypotrophie musculaire ainsi qu'une accumulation de tissu conjonctif. D'un point de vue embryonnaire, ces derniers se distinguent des autres muscles squelettiques ce qui pourrait en partie expliquer leurs différences morphologiques. En effet, le CPM et le RPM partagent la même origine embryonnaire que les muscles de la tête qui proviennent d'un mésoderme différent de celui des muscles du tronc. Cependant, d'autres muscles de la tête comme les muscles du cou ou les muscles de la mastication proviennent eux aussi du mésoderme de la tête mais ne sont pas atteints dans l'OPMD ce qui suggère que l'atteinte spécifique du CPM et du RPM dans l'OPMD ne peut pas être expliquée uniquement par cette hypothèse embryologique (Michailovici et al., 2015). Une explication complémentaire pourrait venir du fait que contrairement aux autres muscles de la tête, ces deux muscles sont constamment sollicités. En effet le CPM est fréquemment contracté pour permettre la déglutition et le RPM pour permettre de garder les paupières ouvertes. Ainsi, l'utilisation constante et automatique de ces deux muscles pourrait les « user » plus rapidement que les autres muscles, les rendant plus susceptibles à la maladie.

Une des caractéristiques propre du CPM et du RPM est que malgré leur aspect histologique, ils possèdent un **pourcentage élevé de cellules satellites en l'absence de régénération évidente**. Avec l'OPMD, ces caractéristiques sont exacerbées (Gidaro et al., 2013). Nous faisons l'hypothèse que l'absence de régénération musculaire soit due à une dérégulation des cellules satellites qui reçoivent des signaux empêchant leur activation. Ces signaux peuvent être de nature intrinsèque ou extrinsèque:

1/ Les signaux de nature intrinsèque : Ils peuvent correspondre à des modifications génétiques ou épigénétiques de la cellule satellite elle-même. Par exemple, il a été montré qu'avec l'âge la méthylation du gène *Sprouty* impliqué dans l'auto-renouvellement des cellules souches est augmentée. Ceci engendre une diminution de l'expression de la protéine

Sprouty et donc à une diminution du stock de cellules satellites quiescentes PAX7⁺ (Bigot et al., 2015). On peut proposer que ce genre de méthylation ait lieu avec l'âge dans le CPM ce qui expliquerait un pourcentage élevé de cellules PAX7 ne participant pas à la régénération musculaire. Afin de confirmer cette hypothèse, on pourrait comparer le méthylome de cellules issues de CPM comparées à des cellules issues de SCM afin d'identifier si des gènes impliqués dans la quiescence ou l'activation des cellules satellites sont spécifiquement méthylés.

2/ des signaux de nature extrinsèques : En raison du pourcentage élevé de matrice extracellulaire dans le CPM, nous pouvons faire l'hypothèse que des signaux provenant de cet environnement fibrotique gênent l'activation des cellules satellites. Nous cherchons alors à identifier des voies impliquées dans la quiescence/activation des cellules souches qui pourraient être dérégulées dans le CPM. Par exemple l'activation de la voie Notch est connue pour maintenir les cellules souches en quiescence (Bjornson et al., 2012). Une étude récente chez la souris montre que l'activation de cette voie permet la sécrétion de collagène V dans la niche des cellules satellites (Baghdadi et al., 2018). Ce collagène se fixe au récepteur à la calcitonine (calcR) qui est spécifiquement exprimé à la surface des cellules satellites quiescentes permettant justement de les maintenir en quiescence (Yamaguchi et al., 2015). Dans le cas du CPM, nous pourrions faire l'hypothèse que la fibrose environnante sécrète du collagène V qui irait se fixer au CalcR présent à la surface des cellules satellites. Ceci maintiendrait leur quiescence expliquant donc le pourcentage élevé de cellules PAX7 et l'absence de régénération dans le CPM. Pour confirmer cette hypothèse, nous pourrions dans un premier temps regarder sur biopsie CPM si du collagène V est sécrété dans la niche des cellules satellites et si ces dernières expriment le récepteur à la calcitonine.

4. Les thérapies envisageables chez l'homme ?

A l'heure d'aujourd'hui, aucun traitement curatif n'existe pour l'OPMD et seule une chirurgie des muscles CPM et RPM permet d'alléger les symptômes. Alors que la chirurgie du RPM permet de corriger le ptosis, la myotomie préconisée pour la dysphagie n'est pas efficace sur le long terme. Plusieurs stratégies thérapeutiques sont en cours d'essai clinique pour soigner l'OPMD : 1/ une thérapie cellulaire par greffe autologue de cellules musculaires de quadriceps dans le CPM de patients OPMD (Périé et al., 2014), 2/ une thérapie génique par extinction et remplacement de PABPN1 (Malerba et al., 2017) et 3/ une thérapie pharmacologique anti-agrégats utilisant le tréhalose (Argov et al., 2016).

Les résultats de notre étude montre que le stress de l'ER est activé dans l'OPMD. Chez l'homme, il a récemment été montré que la pratique d'une activité physique régulière permettait d'alléger le stress de l'ER (Passos et al., 2015). De plus, il a été montré dans un modèle murin de la dystrophie myotonique de type 1 (DM1) que faire courir les souris permet de diminuer le pourcentage d'agrégats nucléaires et ainsi de libérer la protéine MBNL1 piégée dans ces derniers (Manta et al., 2019). Dans notre modèle murin de l'OPMD, on pourrait effectuer les mêmes expériences et voir si l'exercice physique permet de diminuer le pourcentage d'agrégat et si ceci se traduit par une modification de la réponse UPR. Si tel est le cas, préconiser l'exercice physique chez les patients OPMD permettrait peut être d'améliorer les symptômes ou de retarder l'aggravation progressive de la maladie.

Nos résultats supportent l'hypothèse selon laquelle le niveau de PABPN1 est critique dans le muscle, rendant le CPM plus susceptible à l'OPMD. Il a d'ailleurs été montré que diminuer l'expression de la protéine dans des modèles cellulaires ou animaux impactait la myogenèse (Apponi et al., 2010; Malerba et al., 2017; Riaz et al., 2016). De plus, il a été montré que sur-exprimer PABPN1 sauvage au même niveau que PABPN1 muté dans le modèle murin A17 permettait d'améliorer les phénotypes musculaires (Davies et al., 2008). Contrairement aux modèles, le niveau de PABPN1 muté n'est pas surexprimé chez les patients OPMD. On peut alors faire l'hypothèse qu'**augmenter simplement l'expression de PABPN1 dans le CPM** de patients OPMD permettrait de combler la perte de fonction de la protéine et d'alléger les symptômes de la dysphagie. Le problème de cette stratégie est que la ré-expression de PABPN1 sauvage ne permet pas d'éliminer les agrégats nucléaires. Le risque est alors que l'accumulation des agrégats avec l'âge piège de plus en plus PABPN1 ce qui conduira de nouveau à la perte de la fonction de la protéine. On pourrait alors proposer une **stratégie thérapeutique double** où la ré-expression de PABPN1 pourrait être combinée à une stratégie anti-agrégat ce qui pourrait améliorer les symptômes propres à l'OPMD sur le long terme.

Annexes

Contribution :

J'ai participé à la réalisation de chacun de ces articles à des niveaux différents :

La revue nommée « Dystrophie musculaire oculopharyngée » EMC 2016 fait l'état de l'art de l'OPMD en présentant la génétique de la maladie, le diagnostic clinique et moléculaire, la physiopathologie ainsi que les modèles d'études et les thérapies. Dans cette revue, j'ai réalisé intégralement les parties « génétique » et « pathogenèse moléculaire » et j'ai participé pour le reste à la relecture et l'uniformisation de l'ensemble du manuscrit.

L'article « Nuclear poly(A)-binding protein aggregates misplace a pre-mRNA outside of SC35 speckle causing its abnormal splicing » NAR 2016 présente un défaut d'épissage du pré-ARNm *TNNT3* dans l'OPMD en raison de sa capture dans les agrégats de PABPN1. Dans cet article, j'ai réalisé les marquages immunofluorescents, pour détecter les agrégats de PABPN1, notamment dans la souris A10 (figure supp 7). J'ai également relu et corrigé l'article.

L'article « Inhibition of myostatin improves muscle atrophy in oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) » JCSM 2019 présente l'utilisation d'un anticorps anti-myostatine RK35 comme stratégie thérapeutique dans la souris OPMD. Pour cet article, j'ai récupéré les muscles des souris après traitement et j'ai extrait toutes les protéines (n=18) afin de réaliser des western blot pour l'étude de la voie impliquée dans l'inhibition de la myostatine (protéines étudiées (forme normale et phosphorylée) : AKT, mTOR, GSK3, Smad3). Nous n'avons pas réussi à conclure sur ces résultats et avons finalement décidé de ne pas les inclure dans le manuscrit, ils n'apparaissent donc pas dans l'article sous forme de figure. J'ai également relu et corrigé l'article.

Chapitre de livre

Dystrophie musculaire oculopharyngée

P. Richard, F. Roth, T. Stojkovic, C. Trollet

EMC 2016

Dystrophie musculaire oculopharyngée

P. Richard, F. Roth, T. Stojkovic, C. Trollet

La dystrophie musculaire oculopharyngée est une myopathie progressive de transmission autosomique dominante caractérisée par l'apparition tardive des signes cliniques, le plus souvent après 50 ans. Il s'agit d'une affection rare, dont la prévalence est inférieure à 1/100 000 en France. Les symptômes précoces sont constitués par un ptosis progressif symétrique provoquant une contraction compensatoire du muscle du front et une dysphagie. L'évolution se fait vers l'apparition d'une faiblesse des muscles proximaux, en particulier au niveau de la ceinture pelvienne. Le gène responsable a été localisé sur le chromosome 14 (PABPN1). Il code une protéine nucléaire (polyadénylate-binding protein nuclear 1) jouant un rôle dans la maturation et stabilité des acides ribonucléiques messagers (ARNm). La maladie est la conséquence d'une expansion anormale d'une répétition de triplets (GCN) dans l'exon 1 du gène PABPN1. Cette expansion dont la taille normale est de dix répétitions se trouve anormalement augmentée entre 11 et 18 répétitions. La protéine anormale résultante est responsable de la présence d'inclusions tubulofilamentaires observées dans les noyaux des fibres musculaires des patients et pathognomoniques de la maladie. Bien qu'il n'existe pas de traitement spécifique de cette affection, la chirurgie du ptosis et la myotomie cricopharyngienne améliorent de façon significative la qualité de vie de ces patients.

© 2016 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots-clés : Dystrophie musculaire oculopharyngée; PABPN1; Agrégats; Ptosis; Dysphagie; Expansion de triplets

Plan

| | |
|--|---|
| ■ Introduction | 1 |
| ■ Historique | 2 |
| ■ Épidémiologie | 3 |
| ■ Clinique | 3 |
| ■ Génétique | 3 |
| ■ Diagnostic | 4 |
| Clinique | 4 |
| Diagnostics différentiels | 5 |
| Morphologique | 6 |
| Moléculaire | 6 |
| Conseil génétique | 6 |
| ■ Pathogenèse moléculaire | 7 |
| Multiples fonctions de PABPN1 | 7 |
| Rôle des agrégats dans la dystrophie musculaire oculopharyngée | 7 |
| ■ Modèles cellulaires et animaux | 7 |
| ■ Approches thérapeutiques | 8 |
| ■ Conclusion | 9 |

■ Introduction

La dystrophie musculaire oculopharyngée (DMOP) (Online Mendelian Inheritance in Man [OMIM] #164300) est une maladie neuromusculaire de début tardif, les premiers symptômes

n'apparaissant qu'après la cinquième ou sixième décennie^[1]. Cette affection se caractérise par un ptosis bilatéral puis une atteinte des muscles oropharyngés entraînant une dysphagie^[2]. L'évolution est lente, et dans les formes avancées, les muscles faciaux et les muscles des ceintures pelviennes et scapulaires peuvent être affectés. Récemment, des troubles cognitifs et des désordres psychologiques ont été décrits chez des patients^[3,4].

La première description clinique de la DMOP a été rapportée dans une famille d'origine franco-canadienne^[5] avant que Victor et al. la reconnaissent comme affection musculaire à part entière^[2].

La biopsie musculaire révèle un aspect dystrophique associé à des vacuoles bordées et en microscopie électronique des inclusions tubulofilamentaires de 8,5 nm de diamètre et d'une longueur inférieure à 0,25 µm sont observées dans les noyaux des fibres musculaires^[6].

La DMOP présente une distribution géographique très étendue à travers le monde, puisqu'elle est identifiée dans plus de 30 pays. Le plus important cluster se trouve dans la population franco-canadienne dans laquelle la prévalence est estimée à 1 : 1000^[7]. En Europe, la prévalence est estimée à 1 : 100 000 alors que la prévalence la plus élevée de 1 : 600 se trouve dans la population juive de Bukhara en Israël^[8].

Dans la grande majorité des cas, la transmission de cette affection se fait selon un mode autosomique dominant avec une pénétrance complète (tous les sujets portant la mutation vont exprimer la maladie) bien que de rares formes autosomiques récessives aient été rapportées^[9-11].

Le locus responsable de la maladie a été localisé en 1995 sur le chromosome 14q11.2-q13. Il contient le gène PABPN1

(NG_008239) codant la *polyadenylate-binding protein nuclear 1*, protéine interagissant avec les queues polyA des acides ribonucléiques messagers (ARNm). Le défaut moléculaire de ce gène responsable de la DMOP a été identifié en 1998^[9]. Brais et al. ont montré que le gène *PABPN1* normal contenait à son extrémité 5', dans le premier exon, une répétition de six trinucéotides (GCG) codant un groupe (stretch) de six résidus alanines. Chez les patients, une expansion anormale de ce triplet a été montrée, pouvant aller de sept (GCG)7 à 14 répétitions (GCG)14. Toutefois, de par la présence de quatre triplets (GCA)3 (GCG) adjacents à la répétition (GCG)6 et codant également des résidus alanines, la nomenclature actuelle^[12] des allèles est la suivante: (GCN)10 correspondant à l'allèle normal et (GCN)11-18 correspondant aux allèles mutants^[9] codant un stretch de 11 à 18 alanines dans le domaine N-terminal de la protéine. L'allèle (GCN)11 avec une seule expansion du triplet correspondrait à des formes récessives de la maladie ou à des formes dominantes d'expression retardée^[13].

■ Historique

Pendant de nombreuses années, la DMOP a été confondue avec les myopathies oculaires. Dans les deux conditions, il y a une atteinte progressive des muscles élévateurs des paupières et des muscles oculaires externes. Bien qu'aujourd'hui, la DMOP soit bien différenciée des autres maladies oculaires, il est difficile d'identifier le type exact de maladie décrite lors des premiers rapports cliniques^[7]. Le premier cas rapporté de faiblesse musculaire extraoculaire progressive et de ptosis a été établi en 1868 par von Gräfe^[14]. En 1890, l'Allemand Fuchs décrit cinq patients âgés de 30 à 61 ans atteints de ptosis et démontre chez l'un d'entre eux une atrophie des fibres musculaires du muscle élévateur supérieur des paupières^[15]. Il émet alors l'hypothèse, dès 1917, d'une atrophie myogénique et nomme la maladie « ptosis myopathique ». En France, d'autres cas de ptosis non congénitaux et héréditaires sont notés par Dutil en 1892 et Delord en 1903^[16,17]. En 1892, Möbius suppose plutôt une atteinte des noyaux oculomoteurs dans cette maladie et introduit le terme « ophthalmoplégie chronique nucléaire progressive »^[18]. Alors que d'autres études vont dans le sens d'une origine neurologique, Kiloh et Nevin émettent une hypothèse différente en 1951^[19]. En effet, à partir des études histologiques, ils concluent que l'implication du muscle oculaire n'est pas secondaire à la dégénérescence des noyaux mais que la myopathie oculaire correspond bien à une dystrophie progressive des muscles extraoculaires. En 1966, Zintz remarque des anomalies mitochondriales par microscopie électronique dans le muscle oculaire de cinq patients atteints de myopathie oculaire^[20]. Ces anomalies sont détectées à l'aide de la coloration trichrome de Gomori qui révèle au microscope des taches rouges anormales dans les fibres musculaires. Les myopathies oculaires sont alors reconnues comme d'origine musculaire et caractérisées par ces anomalies mitochondriales. C'est pour la première fois en 1915 que le neurologue E.W. Taylor décrit cinq membres d'une famille franco-canadienne qui présentent un ptosis à apparition tardive après 50 ans associé à une dysphagie progressive menant à une sévère dénutrition^[5]. Tout comme Möbius, il suggère alors une implication non pas musculaire, mais plutôt neurologique de ces deux signes cliniques avec une atteinte probable des nerfs vagues, glossopharyngés et des noyaux oculomoteurs. Le rapport clinique établi par Taylor décrit de nouveaux cas mais ses conclusions passent inaperçues pendant près d'un demi-siècle. Il faut attendre 1962 pour que les travaux de Victor et al.^[2] permettent de publier un tableau clinique qui individualise la DMOP et qui la classe définitivement dans la catégorie des maladies musculaires. Ces auteurs rapportent dix observations: un cas sporadique et neuf patients issus de trois générations d'une famille juive nord américaine originaire de l'Europe de l'Est. L'analyse de la ségrégation de la maladie au sein de la famille leur permet tout d'abord de démontrer que la maladie est héréditaire et que le mode de transmission est probablement dominant. Ils mettent l'accent sur l'apparition tardive du déficit mais également sur l'éventuelle association avec une atteinte des muscles proximaux des membres. Suite à la caractérisation clinique de la maladie, de nombreuses études ont été

conduites dans différentes communautés comme le Canada, le Nouveau Mexique ou encore l'Écosse. Contrairement aux myopathies oculaires, aucune anomalie mitochondriale n'est décrite dans les fibres musculaires des biopsies de patients atteints de DMOP. Grâce à ces études, la DMOP est définitivement distinguée des myopathies oculaires. À partir de 1965, le neurologue québécois André Barbeau commence à s'intéresser à la maladie de manière fortuite. En rassemblant toutes les familles décrites dans la littérature comme étant atteintes de ptosis et de dysphagie, il remarque que, malgré leur non-apparenté, toutes ces familles sont d'origine franco-canadienne. À partir de cette observation, il mène des études généalogiques lui permettant de relier toutes ces familles à un couple ancestral originaire de Niort en France, ayant émigré au Canada au cours de l'année 1634. Durant les sept années qui ont suivi, Andrée Barbeau a travaillé à l'élaboration d'un arbre généalogique fondé sur 249 individus atteints, originaires de plus de dix grandes familles différentes. C'est à partir de cet arbre établi en 1967 qu'est née l'idée « d'effet fondateur » pour la DMOP expliquant la fréquence de cette maladie particulièrement élevée dans certaines provinces du Québec.

“ Point fort

Rôle de l'effet fondateur dans la fréquence de la DMOP

Historiquement, les 10 000 à 12 000 immigrants français s'étant installés en Nouvelle France au XVII^e et XVIII^e siècles sont à l'origine des Québécois actuels. En effet, les régions du Québec ont été colonisées par des petits groupes émigrés de France ou par leur descendant. La population nouvellement fondée à partir de ce petit groupe possède un bagage génétique qui ne subit quasiment aucun brassage. Elle a donc plus de chance, sous l'effet aléatoire de la dérive génétique, de fixer après quelques générations un allèle muté responsable d'une maladie: cela correspond à ce que l'on appelle un effet fondateur. C'est ainsi que l'allèle muté du gène responsable de la DMOP a été introduit au Canada français par trois sœurs ayant immigré dans la colonie en 1648. Leur descendance nombreuse, porteuse de la maladie, explique la fréquence élevée de la DMOP au Québec.

En plus de ses travaux généalogiques, André Barbeau insiste sur le fait que nombre de ces patients présentent au cours de l'évolution de la maladie une faiblesse d'autres groupes musculaires que ceux du muscle élévateur de la paupière et des muscles pharyngés. En 1980, Tomé et Fardeau ont été les premiers à décrire un marqueur histopathologique de la maladie dans les muscles deltoïdes de trois patients DMOP non apparentés: en observant au microscope électronique des biopsies de muscles striés de patients DMOP, qu'ils ont décrits dans les noyaux des fibres musculaires des inclusions filamenteuses (INIs, *intranuclear inclusions*)^[6]. Ces inclusions correspondent à des filaments tubulaires souvent arrangés en palissade ou enchevêtrés avec une longueur d'environ 0,25 µm. L'observation de noyaux provenant d'autres cellules de ces biopsies (cellules musculaires satellites, cellules endothéliales, fibroblastes, cellules de Schwann des nerfs intramusculaires) n'a pas révélé ce type d'inclusion. Ces inclusions n'avaient jamais été rapportées auparavant, que ce soit dans des conditions normales ou pathologiques, faisant d'elles une caractéristique morphologique de la maladie. Suite à cette découverte, plusieurs équipes ont suggéré une corrélation entre le pourcentage de noyaux avec des inclusions et l'expression du gène muté dans le tissu. Coquet et al. ont par exemple montré que 8 % des noyaux provenant des muscles pharyngés les plus atteints contenaient des inclusions filamenteuses contre 4 % des noyaux du deltoïde du même patient^[21]. D'autres ont ensuite montré que,

chez des patients homozygotes atteints de DMOP, on observait deux fois plus d'inclusions dans les noyaux musculaires que chez des patients hétérozygotes [22]. Aujourd'hui, il est reconnu que ces inclusions correspondent à des agrégats protéiques, contenant notamment la protéine PABPN1 mutée. Ils représentent toujours un marqueur pathologique déterminant de la maladie, même si leur rôle physiopathologique est encore discuté.

■ Épidémiologie

En 1966, André Barbeau a décrit un important cluster de cas de patients atteints de DMOP dans la province canadienne de Québec (cf. « Historique ») et a montré que les nombreux cas rapportés dans cette population pouvaient être issus d'un ancêtre unique ayant émigré de France au XVI^e siècle [23, 24].

Dans les années qui suivirent, de nombreux autres cas ont été décrits et la DMOP est maintenant décrite dans au moins 33 pays à travers le monde [25-35]. Actuellement, le plus grand cluster de patients se trouve dans la population franco-canadienne avec une prévalence estimée à 1 : 1000 [7, 9, 36]. La plus forte prévalence de la maladie, de l'ordre de 1/600, se trouve dans la population juive de Bukhara en Israël [8]. En Europe, la prévalence estimée est de 1/100 000 [37].

■ Clinique

Les manifestations cliniques de la DMOP débutent généralement de façon insidieuse, et ne deviennent manifestes que vers la cinquième ou la sixième décennie de par une évolution lentement progressive, jusqu'à devenir complètes vers l'âge de 70 ans [38, 39]. Les symptômes principaux sont le ptosis palpébral et la dysphagie [2]. Ils sont dus à la faiblesse des muscles élévateurs palpébraux et des muscles pharyngés. L'âge moyen de début du ptosis est de 48 ans (extrêmes : 26-65 ans) et celui de la dysphagie de 51 ans (extrêmes : 40-63 ans) [1].

Le ptosis est la plupart du temps d'emblée bilatéral mais peut être unilatéral dans certains cas. Il entraîne une hyperactivité du muscle frontal compensant la chute des paupières et la limitation du champ visuel.

Bien que d'autres muscles extraoculaires puissent être affectés, il est rare d'observer une ophtalmoplégie externe complète (diagnostic différentiel avec une maladie mitochondriale). Néanmoins, une ophtalmoparésie caractérisée par une limitation du regard vers le haut ou le bas, peut être notée. Les muscles intrinsèques de l'œil (ciliaire, sphincter) ne sont pas affectés.

La dysphagie observée dans la DMOP est caractérisée en premier par un trouble d'absorption de la nourriture solide puis plus tardivement des liquides. Chez certains patients, une faiblesse et une atrophie de la langue peuvent être observées [1]. Cette dysphagie peut entraîner des complications, telles que des fausses routes, des régurgitations, des pneumonies d'inhalation [40]. Chez les patients ne s'alimentant plus correctement, un état de malnutrition, voire de dénutrition, s'installe, représentant fréquemment la cause du décès chez les patients âgés.

L'évolution se fait vers une atteinte progressive de l'ensemble de la musculature striée en épargnant les muscles lisses et le cœur. Après les muscles palpébraux, la langue, les muscles pharyngés et extraoculaires, l'amyotrophie et le déficit s'étendent de façon spécifique et symétrique aux muscles faciaux et aux muscles cervicaux, puis aux muscles de la ceinture pelvienne (iliopsoas, fessiers), muscles adducteurs et muscles de la loge postérieure de la cuisse. Un déficit des muscles de la ceinture scapulaire peut être associé. À un âge avancé (\pm 70 ans), certains patients sont en fauteuil roulant alors que d'autres ne présentent aucune faiblesse des muscles des membres inférieurs à 80 ans [11]. Jusqu'à récemment, la DMOP était considérée comme une myopathie isolée et il n'y avait pas d'arguments en faveur d'une atteinte neurologique. Une implication du système nerveux périphérique a toutefois été suggérée chez des patients montrant une forte diminution de fibres myélinisées au niveau des nerfs extraoculaires, pharyngés et lingual [41-43]. Par la suite, des neuropathies axonales

sensitivomotrices ont été rapportées chez des patients atteints de DMOP [44, 45], posant la question d'une composante neurologique dans la DMOP [46]. Des arguments plus fondamentaux viennent renforcer cette hypothèse. En effet, la présence d'inclusions intranucléaires contenant la protéine PABPN1 ubiquitinylée dans les cellules neuronales d'animaux transgéniques atteints de DMOP a été démontrée [47]. De façon semblable, des inclusions similaires ont été retrouvées dans des coupes de cerveau d'un patient également atteint de DMOP. Ces études semblent indiquer que la protéine PABPN1 mutante, contenant une expansion anormale de polyalanines, peut entraîner la formation d'inclusions intranucléaires dans les cellules nerveuses pouvant jouer un rôle dans l'atteinte neurologique. Sur le plan clinique, une diminution des fonctions cognitives a été décrite chez des patients homozygotes qui évoluent vers le développement d'une démence avec des symptômes sur les plans psychologique et psychiatrique [3]. Une étude récente montre également des scores neuropsychologiques et neuropsychiatriques inférieurs chez des patients hétérozygotes comparés à des sujets contrôles. Il semble également que les scores neuropsychologiques soient corrélés au nombre d'expansions du triplet GCN, étant moins favorables chez les patients avec des expansions les plus grandes [4]. Il est toutefois nécessaire de bien faire la part des choses, à savoir si la neuropathie est une conséquence de la maladie, se développant avec l'évolution de la pathologie, ou s'il s'agit d'une association avec une autre affection hérédodégénérative du système nerveux périphérique.

L'évolution de la maladie est lentement progressive. Actuellement, la prise en charge de la dysphagie et l'entretien régulier des muscles squelettiques (kinésithérapie, balnéothérapie) permettent une espérance de vie normale.

■ Génétique

La DMOP est transmise selon un mode monofactoriel autosomique dominant avec une pénétrance complète, mais variable selon l'âge et sans préférence de sexe.

Avant la révolution technologique du séquençage haut débit, les techniques d'identification de gène candidat dans le cadre de maladies monogéniques se révélaient plus longues et plus laborieuses. Cependant, l'émergence des premières cartographies du génome humain, notamment la première carte physique établie par le Génethon en 1992, a permis une analyse génétique plus aisée. En 1995, Brais et al. ont entrepris une croisade génétique afin d'identifier le gène responsable de la DMOP. Ils ont recensé 469 individus d'origine québécoise dont 73 sont diagnostiqués pour la DMOP [24]. Ces individus appartiennent à 21 familles dont trois ont été sélectionnées, de par leur taille et leur structure, comme potentiellement informatives dans une étude de liaison génétique. Ce crible permet d'identifier une séquence ayant une forte homologie avec le gène bovin de la protéine de fixation à la poly (A) (*PABP2*). Ce gène, jusque-là non connu chez l'homme, constitue alors un excellent candidat pour la maladie : il est fortement exprimé dans les muscles et sa protéine se localise exclusivement dans le noyau (où sont également retrouvées les inclusions décrites par Tomé et Fardeau [6]). C'est l'amplification par *polymerase chain reaction* (PCR) de ce gène chez les patients DMOP qui a confirmé son implication dans la maladie. La séquence codante du gène *PABPN1* normal comporte sept exons. Elle contient au niveau de son premier exon, six répétitions consécutives de trois nucléotides GCG ([GCG]₆) codant une répétition de six résidus alanine (stretch polyA) à l'extrémité N-terminale de la protéine (Fig. 1). Le séquençage a mis en évidence l'identification d'une petite expansion d'un triplet (GCG) dans l'exon 1 du gène *PABPN1* chez tous les patients présentant la maladie [9]. Un allèle (GCG)₆ est observé chez 98 % des individus québécois contrôles alors que 2 % d'entre eux portent un allèle polymorphe (GCG)₇. En revanche, chez les patients, une expansion de deux à sept triplets (GCG) est systématiquement trouvée. Cette mutation entraîne une expansion de la répétition d'alanine au niveau N-terminal de la protéine. En raison de sa localisation, cette protéine est par la suite nommée « protéine nucléaire de fixation à la poly (A) », soit PABPN1. Depuis 20 ans,

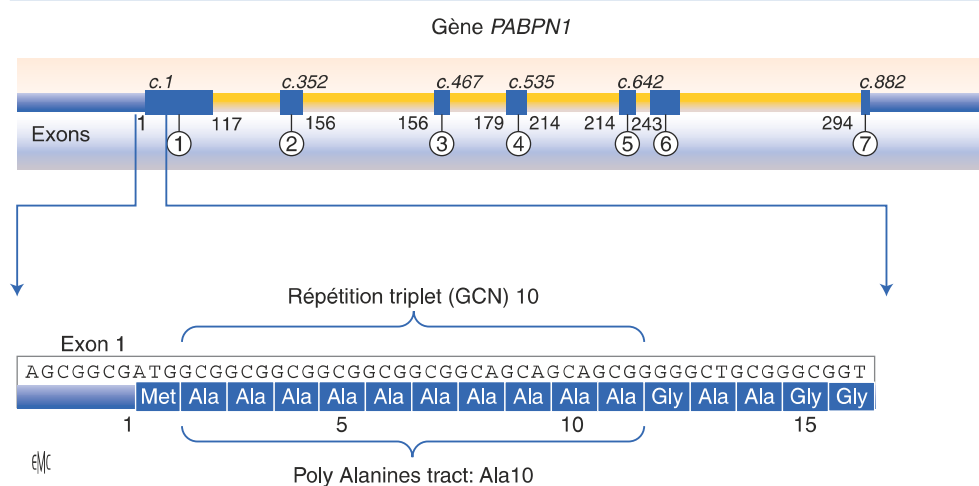


Figure 1. Représentation schématique du gène *PABPN1* et d'une partie de l'exon 1 contenant la répétition du triplet (GCN)10 et le stretch polyA correspondant sur la séquence protéique.

les études se multiplient pour comprendre le rôle de cette protéine et les mécanismes moléculaires qui aboutissent à la maladie. Les analyses de liaison ont ensuite montré que la forme dominante de la DMOP était homogène, c'est-à-dire sans autre locus potentiellement impliqué [28, 33, 48, 49]. La DMOP est donc une maladie à répétition de triplets.

Brais et al. ont démontré que l'allèle (GCG)9 était très largement majoritaire dans la population franco-canadienne et avait été importé en 1648. Une étude portant sur 81 familles présentant les allèles de toutes tailles d'expansions, montrait que le pourcentage de fréquence des allèles était de 5 % (GCG)8, 40 % (GCG)9, 26 % (GCG)10, 21 % (GCG)11, 7 % (GCG)12, et 1 % (GCG)13. Toutefois, ce pourcentage est dépendant de la population étudiée et varie d'une population à une autre. Certaines populations comme les franco-canadiens ou les juifs de Bukhara présentent des effets fondateurs et la plupart des familles partagent la même mutation ancestrale [9, 50]. Une étude portant sur le séquençage de la mutation chez 86 patients [51] a montré que le mécanisme responsable de la mutation (de l'expansion du tract polyA au niveau de la protéine) était complexe, impliquant des recombinaisons génétiques inégales et conduisait à des génotypes variés.

Depuis quelques années, la numérotation des allèles a changé pour refléter l'effet de l'expansion au niveau de la protéine plutôt que celle au niveau du gène. En effet, de par la présence d'une séquence codante (GCA)3 (GCG) adjacente à la répétition du triplet (GCG)6, qui code également pour des résidus alanine, la protéine *PABPN1* normale possède un stretch de dix résidus alanine, et non pas six, comme décrit initialement. La conséquence est que la protéine mutée doit maintenant être référée (GCN)11-18. L'allèle (GCG)11 est décrit très fréquemment comme étant responsable de la forme récessive de la DMOP (c'est-à-dire présent à l'état homozygote chez les patients, alors que leurs parents porteurs hétérozygotes ne présentent pas les signes de la maladie au moment de l'examen) mais peut également se trouver présent à l'état hétérozygote (donc autosomique dominant) mais avec une pénétrance faible, chez des patients, présentant une forme typique mais tardive de la maladie [13].

À la différence de beaucoup des maladies liées à une expansion de répétitions de triplets, la DMOP est la seule dont l'expansion est très courte et méiotiquement stable. Cela signifie que lors des méioses, la taille de l'expansion n'augmente pas et il n'est pas observé de phénomène d'anticipation au fur et à mesure des générations dans les familles concernées.

À ce jour, aucune corrélation évidente entre la taille de l'expansion et la sévérité de la maladie n'a pu être établie. Toutefois, les patients hétérozygotes composites pour les allèles (GCG)9 et (GCG)7 présentent un phénotype plus sévère que les patients hétérozygotes (GCG)9 et (GCG)6, ce qui peut suggérer que l'allèle (GCG)7 pourrait agir comme allèle modificateur d'un phénotype dominant. Il semble de même que les patients les plus sévèrement atteints soient ceux porteurs de mutations homozygotes pour des mutations dominantes du gène *PABPN1* [52]. La dose de gène muté a donc clairement une influence sur l'âge de début et la sévérité des

symptômes observés dans la DMOP [9]. Les patients les plus sévèrement atteints sont ceux qui sont homozygotes pour un allèle dominant, en particulier l'allèle (GCN)13 (ex-[GCG]9) comme le montrent les études dans les familles juives de Bukhara [9, 22, 52]. Chez ces patients, l'âge de début est de 18 ans inférieur à celui des patients hétérozygotes (en moyenne vers 40 ans) et la sévérité très marquée puisque dès l'âge de 60 ans, ces patients présentent tous les signes de l'évolution de la maladie (ptosis, dysphagie, faiblesse musculaire distale et proximale).

■ Diagnostic

Jusqu'à l'identification de la cause génétique de la DMOP et de la mise en place des tests moléculaires, le diagnostic reposait essentiellement sur l'examen clinique des patients avec, en parallèle, un examen de la biopsie musculaire en microscopie électronique qui montrait la présence d'inclusions intranucléaires dans les noyaux des fibres musculaires [7]. La biopsie musculaire systématique est désormais remplacée par l'analyse moléculaire [9].

Clinique

Le diagnostic de cette affection est souvent assez aisé dès le stade de l'examen clinique. L'association de la triade suivante :

- histoire familiale avec une transmission verticale dominante de la maladie sur plusieurs générations, affectant aussi bien des femmes que des hommes ;
- présence d'un ptosis bilatéral défini par une fisure palpébrale mesurant moins de 8 mm de hauteur au repos ou des antécédents de chirurgie corrective des paupières pour ptosis ;
- et une dysphagie définie par un temps de déglutition supérieur à sept secondes lors de l'ingestion de 80 ml d'eau froide [53] permet la quasi-certitude du diagnostic.

Une étude de la déglutition par vidéo-endoscopie (VESS) et vidéo-fluoroscopie (VFSS) est essentielle pour apprécier l'importance de la dysfonction des muscles pharyngés et du sphincter œsophagien (UES) [54-57]. Cette analyse montre une réduction des contractions des muscles pharyngés. Une exception à la triade diagnostique est la forme autosomique récessive dans laquelle les symptômes, bien que plus tardifs (> 60 ans), sont identiques et l'absence d'antécédents familiaux de DMOP. L'électromyographie met en évidence des tracés myogènes sur les muscles faciaux ainsi que sur ceux de la ceinture pelvienne et scapulaire. Les conductions nerveuses sont normales. L'étude de la transmission neuromusculaire est normale. Le taux de créatine kinase (CK) est variable (normal ou à deux à cinq fois les valeurs usuelles). L'imagerie musculaire révèle une dégénérescence graisseuse des muscles soléaires, des muscles adducteurs de cuisse et du semi-membraneux, du biceps fémoral ainsi que des muscles fessiers.

À un stade plus évolué, on note également à la cuisse une atrophie graisseuse des muscles semi-tendineux et des muscles vastes

Tableau 1.

Diagnostiques différentiels de la dystrophie musculaire oculopharyngée.

| | OMIM | Âge de début | Atteinte oculaire | Atteinte pharyngée | Atteinte musculaire | EMG | Autres signes |
|-----------------------------------|-------------|--------------|--------------------------------------|------------------------|--|------------------------|--|
| Myopathies mitochondriales | OMIM.157640 | 30–60 ans | Ptosis Ophtalmoplégie | Dysphagie | Amyotrophie faciale Atteinte ceinture scapulaire puis pelvienne | Myogène | Fibres rouges déchiquetées |
| Myasthénie | OMIM.254200 | 20–40 ans | Ptosis uni- ou bilatéral Diplopie | Dysphagie Dysphonie | Diplégie faciale Atteinte muscles membres, tronc, respiratoires Symptômes fluctuants | Neurogène Décrément | Ac Anti Rach |
| Dystrophie myotonique de Steinert | OMIM.160900 | 20–25 ans | Ptosis bilatéral Cataracte | Dysphagie | Atrophie faciale Atteinte muscles distaux Myotonie | Salves myotoniques | Troubles de conduction cardiaque |
| Myopathie oculo-pharyngo-distale | OMIM.164310 | 20–40 ans | Ptosis | Dysphagie | Amyotrophie distale (avant-bras, mains, jambes, pieds) | Myogène | Absence INIs |
| Amyotrophie spinale distale | OMIM.158580 | 20–30 ans | Non | Dysphagie Dysphonie | Atrophie musculaire spinale | Neurogène | |
| Myosite à inclusions | OMIM.147421 | 50 ans | Non | Dysphagie | Faiblesse muscles proximaux | Myogène et neurogène | Vacuoles bordées, inflammation, corps à inclusions |

OMIM : Online Mendelian Inheritance in Man ; EMG : électromyogramme ; Ac : anticorps ; INIs : filaments intranucléaires spécifiques.

intermédiaires et du vaste médial et à la jambe des muscles gastrocnémiens latéraux et des muscles péronéaux.

Les muscles tibiaux antérieurs, gracilis et sartorius sont épargnés^[58,59]. Ces derniers auteurs ont également observé une corrélation entre les scores fonctionnels de faiblesse musculaire et la dégénérescence graisseuse des muscles mise en évidence en imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM).

Les examens cardiaques sont normaux sans cardiopathie ni troubles du rythme cardiaque. Les explorations fonctionnelles respiratoires peuvent montrer une réduction modérée de la capacité vitale. Dans une étude récente portant sur 13 patients, une réduction de la capacité vitale a été identifiée chez six patients âgés de plus de 60 ans, allant de 23 à 59 %. Aucun de ces patients ne requerrait une ventilation au masque^[60]. En revanche, il est possible que les apnées nocturnes soient sous-estimées dans cette pathologie : on recommande une évaluation polysomnographique ou une polygraphie chez ces patients.

Diagnostiques différentiels

Le diagnostic différentiel peut parfois se poser avec différentes autres atteintes neuromusculaires, surtout en l'absence de tous antécédents familiaux (Tableau 1). Il doit inclure toutes les atteintes neuromusculaires de début tardif et présentant un ptosis et/ou une dysphagie.

Myopathies d'origine mitochondriale^[61]

Avec ou sans ophtalmoplégie externe, notamment la maladie de Kearns-Sayre, elles restent un diagnostic différentiel majeur. Il y est observé un ptosis et une amyotrophie faciale et des muscles oropharyngés. Néanmoins, le début est souvent plus précoce (avant 40 ans) et l'ophtalmoplégie est plus marquée. La biopsie musculaire est très utile car elle montre l'absence des fibres musculaires dépourvues d'activité cytochrome C oxydase, des fibres rouges déchiquetées, des accumulations mitochondriales et une délétion unique de grande taille de l'acide désoxyribonucléique (ADN) mitochondrial.

Myasthénie

C'est une atteinte de la jonction neuromusculaire caractérisée par une absence d'antécédents familiaux, et des fluctuations dans la symptomatologie. Le diagnostic est clinique (fluctuations et aggravation des symptômes lors des efforts), électromyographique

(présence d'un décrement d'au moins 10 % à la stimulation répétitive à 3 Hz) et/ou la présence d'anticorps anti-récepteur de l'acétylcholine (Rach) ou Musk.

Dystrophie myotonique de Steinert^[62]

C'est une maladie de transmission autosomique dominante, à pénétrance incomplète et marquée par l'anticipation. Les signes cliniques se caractérisent par une myotonie, un ptosis, une atrophie faciale, une dysphagie et une faiblesse distale et axiale. Elle affecte plusieurs organes (le squelette, les muscles lisses, l'œil, le cœur, le système endocrinien et le système nerveux).

Myopathie oculopharyngodistale (OMIM_164310)

Elle est de transmission autosomique dominante, dans laquelle les similitudes cliniques avec la DMOP sont évidentes. Bien qu'ayant un âge de début plus précoce que la DMOP (environ 40 ans), elle se caractérise par un ptosis comme signe initial, une atteinte faciale associée à une atteinte des muscles oropharyngés (dysphagie), mais elle se distingue de la DMOP par l'existence d'un déficit moteur et d'une amyotrophie distale des quatre membres (mains et membres inférieurs) entraînant la perte de la marche après 20 ans d'évolution^[63–65]. L'atteinte extraoculaire et de la musculature distale la distingue des DMOP. L'absence des mutations génétiques caractéristiques^[66] permet d'exclure le diagnostic de DMOP.

Amyotrophie spinale distale autosomique dominante

Il s'agit de la maladie de Harper-Young dans laquelle l'atrophie musculaire spinale est associée à une faiblesse des cordes vocales et des muscles pharyngés mais le ptosis fait défaut^[67,68]. L'EMG permet de poser le diagnostic.

Myosites à inclusions

Au sein desquelles on peut observer, outre le déficit proximal des membres inférieurs, une atteinte faciale et pharyngolaryngée, en revanche, le ptosis fait défaut.

Fibrose congénitale des muscles extraoculaires

C'est également un des diagnostics à éliminer. Dans cette maladie, le ptosis/ophtalmoplégie est congénital et il n'est pas observé de dysphagie.

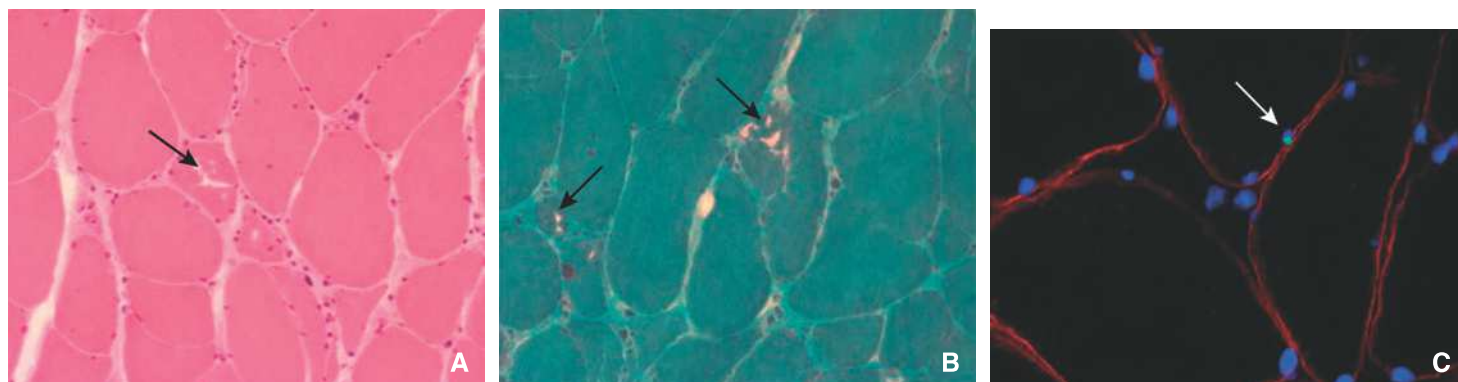


Figure 2. Histopathologie du muscle deltoïde chez un patient présentant une dystrophie musculaire oculopharyngée.

A. Coloration à hématoxyline-éosine ($\times 20$).

B. Coloration au trichrome de Gomori ($\times 20$). Ces coupes transversales montrent une inégalité de taille de fibres, des centralisations nucléaires et la présence de vacuoles bordées (flèches).

C. Immunodétection d'agrégats de PABPN1 ($\times 60$) sur une coupe musculaire (PABPN1 en vert, dystrophine en rouge, noyaux en bleu) après un lavage au chlorure de potassium 1M pour retirer les protéines solubles et ainsi révéler les agrégats insolubles (flèche).

Morphologie

L'examen par microscopie optique des biopsies musculaires de patients avec DMOP révèle, dans les fibres musculaires, la présence de vacuoles bordées, de fibres « ragged red » (fibres musculaires ayant un aspect rouge déchiqueté à la biopsie), de fibres atrophiées et irrégulières non spécifiques^[7,69] et des inclusions intranucléaires (agrégats) spécifiques de la maladie (Fig. 2).

Les vacuoles bordées bien qu'éventuellement utiles pour aider au diagnostic, ne sont pas toujours présentes sur la biopsie et ne sont pas spécifiques de la DMOP puisqu'elles sont trouvées de façon consistante et plus importante dans d'autres dystrophies musculaires telles que les myosites à inclusion (IBM)^[70,71].

En 1980, Tomé et Fardeau, en étudiant en microscopie optique et en microscopie électronique des muscles deltoïdes, ont identifié pour la première fois une accumulation de filaments intranucléaires dans les fibres musculaires des patients avec une DMOP^[6]. De nombreuses publications ont par la suite confirmé cette découverte.

Sous un microscope électronique, les inclusions intranucléaires de la DMOP (INIs) peuvent être visualisées comme des filaments qui ont une apparence tubulaire avec un diamètre extérieur de 8,5 nm, un diamètre intérieur de 3 nm et une longueur inférieure à 0,25 μm . La proportion de noyaux contenant ces inclusions peut varier de 2 à 15 % par coupe étudiée. Il a été démontré qu'elles contenaient notamment la protéine PABPN1^[72] et elles ne doivent pas être confondues avec tous les autres types d'inclusions décrites dans les noyaux des fibres musculaires. La présence de ces inclusions intranucléaires est un critère pathognomonique qui permet de poser le diagnostic de certitude de la DMOP. Il est également possible de détecter les agrégats sur une coupe musculaire par simple immunomarquage dirigé contre la protéine PABPN1 après avoir lavé les sections pendant une heure dans une solution de chlorure de potassium 1M qui retire les protéines solubles^[13,69] (Fig. 2C).

Moléculaire

L'analyse moléculaire dans la DMOP est très facile à réaliser et constitue le diagnostic de certitude de la maladie. À partir d'une simple prise de sang, une extraction de l'ADN des cellules sanguines du patient (globules blancs) puis une réaction d'amplification en chaîne (PCR) d'une région de l'exon 1 du gène *PABPN1* sont effectuées. La réaction de PCR révèle un fragment dont la taille est directement proportionnelle au nombre de répétitions du triplet. Ainsi, une simple détermination de cette taille moléculaire, soit après migration sur gel résolutif, soit désormais par détection laser après marquage fluorescent des produits lors de leur amplification permet de déterminer la taille de l'expansion du triplet (GCN)^[9].

Ce test rapide est très sensible et spécifique permettant donc le diagnostic de certitude des patients symptomatiques et ainsi

la confirmation du diagnostic clinique évocateur. Dans les cas où le diagnostic clinique est moins évident, il permet de faire le diagnostic différentiel avec les autres atteintes neuromusculaires (notamment une maladie mitochondriale de début tardif et la myopathie oculopharyngodistale). La détermination de la taille de l'expansion permet également d'évaluer la sévérité de l'atteinte ou la présence de deux allèles mutés (hétérozygotes composites), voire de patients homozygotes.

Conseil génétique

Le conseil génétique consiste à informer le patient et sa famille de la nature de la maladie, de sa transmission, de son évolution, et à les accompagner dans leur prise en charge aussi bien médicale que psychologique.

Le rôle majeur du conseil génétique s'exerce en particulier chez les apparentés d'un patient symptomatique, en fonction de leur risque d'hériter de la mutation pathogène et de la transmettre.

Étant donné l'existence de formes dominantes, dans la très grande majorité des cas, mais également de formes récessives, le conseil génétique doit être adapté à chaque situation.

Dans le cadre d'un mode de transmission dominant

Chaque patient atteint doit avoir un parent atteint. Cette information peut manquer si le patient présente un âge avancé et que ses parents sont décédés avant l'apparition ou la détection des symptômes (il est parfois demandé au patient de venir à la consultation avec des photos de famille). Il est noté que, dans certaines familles consanguines, un patient génétiquement homozygote pour deux allèles mutés a ses deux parents atteints de la maladie. Hors du contexte de consanguinité, une autre situation peut être rencontrée lorsque les deux parents d'un patient sont atteints : chacun des parents porte un allèle muté différent et le transmet à leur enfant qui porte donc deux allèles mutés avec un nombre différent d'expansions. Ce patient est alors dit « hétérozygote composite » pour la maladie. Si les parents du patient sont disponibles pour l'analyse génétique, celle-ci doit être proposée afin de vérifier la coségrégation familiale de l'anomalie.

En ce qui concerne les enfants du patient, si celui-ci est hétérozygote pour la mutation (muté sur un allèle), le risque pour un enfant d'hériter de la mutation est de 50 %. Si le parent est muté sur ses deux allèles (homozygote ou hétérozygote composite), le risque pour les enfants de recevoir une mutation est de 100 %. Toute la descendance d'un patient homozygote est affectée par la maladie.

En ce qui concerne les frères et sœurs du patient hétérozygote muté, chacun a 50 % de risque d'hériter de la mutation. Statistiquement, la moitié des enfants est à risque de développer la

maladie et l'autre moitié est indemne. Si le patient est homozygote ou hétérozygote composite, tous ses frères et sœurs sont atteints puisque recevant chacun un allèle muté.

Dans le cadre d'un mode de transmission récessif

Il n'y a pas d'antécédents familiaux et le patient semble être le seul de la famille à être malade. Ses parents, bien qu'asymptomatiques, sont tous deux porteurs obligatoires d'un allèle muté à l'état hétérozygote. Le risque de transmission chez les frères et sœurs du patient est de 50 % d'hétérozygotes asymptomatiques (un seul allèle muté), de 25 % de transmission homozygote (deux allèles mutés) et de 25 % de non-transmission (aucun allèle muté). Les enfants du patient atteint de la forme récessive de la DMOP ont 100 % de risque de recevoir un allèle muté. Ils sont alors porteurs hétérozygotes mais asymptomatiques puisque l'allèle récessif ne s'exprime pas à l'état hétérozygote. En revanche, ils ont 50 % de risque de transmettre à leur tour leur allèle muté. Dans ce cas, un test moléculaire chez un conjoint, encadré par le conseil génétique, peut alors permettre d'éviter que ce conjoint n'apporte un autre allèle muté à la descendance et ainsi d'avoir des enfants atteints de la maladie.

Assez fréquemment, cette demande de diagnostic moléculaire est demandée dans le cadre d'un diagnostic présymptomatique dans les familles à risque. Un individu jeune, le plus souvent, et indemne de tout signe de la maladie, demande à connaître son statut génétique afin de savoir s'il va développer la maladie dans son futur. Il faut être très prudent devant de telles demandes, mesurer l'impact psychologique et les conséquences sur la qualité de vie de la personne. Dans tous les cas, cette détermination ne peut être réalisée que dans le cadre d'une consultation spécialisée de conseil génétique afin que la personne puisse bénéficier d'une prise en charge adaptée, en particulier sur le plan psychologique, puisqu'aucun traitement, ni préventif, ni curatif, n'existe à ce jour.

■ Pathogenèse moléculaire

Multiples fonctions de PABPN1

Ce gène, nommé *PABPN1* pour la protéine qu'il code (protéine nucléaire 1 de fixation à la poly [A]), a été sujet à de nombreuses études visant à définir de manière la plus précise possible ses différentes fonctions (pour une revue détaillée sur PABPN1 et ses fonctions [73]). Brièvement, PABPN1 est divisée en trois domaines majeurs : un domaine N-terminal, affecté dans la DMOP et contenant une région nécessaire à la fixation de PAP (région « coil-coiled »), un domaine central permettant une haute affinité de fixation avec les ARN poly (A) (domaine *RNA recognition motif* [RRM]) et un domaine C-terminal contenant un signal de localisation nucléaire (NLS). En 1991, Wahle décrit PABPN1 comme étant une protéine ubiquitaire nucléaire modulant la polyadénylation des ARNm en stimulant la polymérase poly (A) (PAP) [74]. La polyadénylation des ARNm, c'est-à-dire l'ajout successif de ribonucléotide adénosine à leur extrémité 3', est un des processus physiologique indispensable à la bonne maturation des ARNm. La protéine PABPN1 va se fixer à la queue poly (A) naissante des ARNm permettant de déclencher une addition rapide de poly (A) par PAP. Les ARNm maturés peuvent ensuite être exportés vers le cytoplasme où ils sont traduits en protéine. La DMOP est causée par une expansion du triplet (GCN) dans l'exon 1 de PABPN1 résultant en une addition excessive d'alanine sur la partie N-terminale de la protéine. Lorsque s'est posée la question de l'impact de la mutation de PABPN1 sur la stimulation de PAP, des études biochimiques ont révélé que cette expansion d'alanine permettait la stimulation de PAP de la même manière que la protéine sauvage [75]. Ce résultat montre que, dans un contexte biochimique, la mutation de PABPN1 en position N-terminale de la protéine n'impacte pas sur cette fonction de la protéine. Cette observation suggère que la mutation observée chez les patients DMOP touche une autre fonction de PABPN1, rendant la maladie muscle spécifique. Depuis, de nombreuses fonctions de PABPN1 ont été mises en évidence. Globalement, cette protéine

joue un rôle essentiel dans les processus de maturation post-transcriptionnelle des ARNm. Les fonctions de PABPN1 décrites à ce jour sont :

- la fixation directe de PABPN1 avec la protéine poly (A) polymérase (PAP) et la stimulation de l'interaction entre cette dernière et le facteur de clivage et de polyadénylation (CPSF) permettant ainsi la régulation de la taille des queues poly (A) des ARNm [74, 76] ;
- la participation à l'export des ARNm du noyau vers le cytoplasme [77] ;
- la participation aux premières étapes de traduction des ARNm [74]. En 2012, de nouvelles fonctions de PABPN1 ont été mises en évidence ;
- son rôle dans la détermination du choix du site de polyadénylation dans le 3' untranslated region (3'UTR) des ARNm [78, 79] ;
- et la régulation de la stabilisation des longs ARN non codants (lncARN) [80].

Les longs ARN non codants correspondent à des séquences d'ADN qui sont transcrites en ARNm mais non traduites. Pendant longtemps, leur rôle a été grandement sous-évalué mais, aujourd'hui, ils sont de plus en plus étudiés et plusieurs travaux démontrent qu'ils ont un rôle clé dans différents processus biologiques et qu'ils sont impliqués dans de nombreuses maladies humaines, notamment des cancers [81, 82]. L'ensemble de ces études propose différentes fonctions pour PABPN1. L'altération d'une ou plusieurs de ces fonctions dans la DMOP reste à démontrer.

Rôle des agrégats dans la dystrophie musculaire oculopharyngée

Depuis les travaux de Tomé et Fardeau en 1980, la présence d'inclusions ou d'agrégats dans les noyaux des fibres musculaires des patients DMOP est une caractéristique morphologique avérée de la maladie. De nombreuses maladies neurodégénératives, telles Alzheimer, Parkinson, ou Huntington, sont caractérisées par des agrégats intracellulaires et le dépôt de protéines pathogènes [83]. Un des mécanismes proposés pour la toxicité de ces agrégats est la séquestration de facteurs critiques essentiels pour la cellule [84], tels que des facteurs d'épissage, ou de transcription [85]. Il a été montré que les inclusions contiennent, entre autres des protéines telles que PABPN1, des protéines chaperonnes, appartenant aux protéines de choc thermique, HSP70 et HSP40, l'ubiquitine, les sous-unités du protéasome et des ARNm [86]. La formation d'agrégats constitue l'une des caractéristiques majeures de la DMOP, bien que leur rôle ne soit pas connu. Est-ce un gain de fonction toxique ou une conséquence d'un mécanisme de défense cellulaire ? La fréquence des agrégats est plus élevée chez les patients homozygotes que chez les patients hétérozygotes [52] et la réduction de ces agrégats dans un modèle de souris transgénique DMOP entraîne une atténuation de la faiblesse musculaire [87]. Cependant, il a aussi été montré que le domaine polyalanine de PABPN1 n'est pas essentiel à la formation des agrégats [88] et que la forme soluble de la protéine mutée serait elle-même pathogénique, les agrégats étant alors une forme de protection [89, 90]. Enfin ces agrégats sont observés autant dans les muscles atteints que non atteints chez les patients DMOP [69], ce qui alimente encore le débat sur le rôle exact de ces inclusions.

■ Modèles cellulaires et animaux

Bien que la mutation dans le gène *PABPN1* ait été découverte en 1998, les mécanismes moléculaires et physiopathologiques conduisant de cette expansion de triplet aux conséquences musculaires restent encore mal expliqués et peu précis. De nombreux modèles cellulaires et animaux ont donc été développés par des chercheurs afin d'étudier cette maladie et de tester de nouvelles pistes thérapeutiques.

La plupart des modèles cellulaires (Tableau 2) [47, 79, 85, 89, 91-106] repose sur la surexpression de PABPN1 muté par transfection transitoire. Dans la grande majorité des cas, il s'agit de modèles non musculaires (cellules COS-7, Hela, HEK293, U2OS) assez loin du contexte DMOP. Cette surexpression de PABPN1 muté entraîne

Tableau 2.

Modèles cellulaires de la dystrophie musculaire oculopharyngée.

| Année | Auteur | Cellule | Organisme | Méthode |
|-------|---------------------|---|-----------------------|--------------|
| 2002 | Bao [97] | COS-7 | Singe | Transfection |
| 2003 | Abu-Baker [47] | Hela, COS-7 | Humain, singe | Transfection |
| 2004 | Bao [98] | COS-7 | Singe | Transfection |
| 2005 | Corbeil-Girard [85] | A549-tTA | Humain | Transduction |
| 2005 | Abu-Baker [99] | Hela | Humain | Transfection |
| 2005 | Wang [100] | Hela | Humain | Transfection |
| 2005 | Tavanez [101] | Hela, C2C12 ^a | Humain, souris | Transfection |
| 2006 | Verheesen [94] | Hela, COS-1 | Humain, souris | Transfection |
| 2006 | Sasseville [102] | A549-tTA | Humain | Transduction |
| 2006 | Davies [95] | COS-7 | Singe | Transfection |
| 2008 | Catoire [89] | COS-7 | Singe | Transfection |
| 2010 | Apponi [103] | Culture primaire de myoblastes ^a | Souris | Transfection |
| 2010 | Davies [96] | C2C12 ^a , HEK293 ^a , COS-7 ^a , myoblastes ^a | Souris, humain, singe | Transfection |
| 2011 | Raz [104] | U2OS | Humain | Transfection |
| 2011 | Raz [91] | Myoblastes immortalisés ^a | Souris | Transduction |
| 2011 | Anvar [93] | C2C12 ^a | Souris | Transfection |
| 2012 | Bengoecha [105] | Culture primaire de myoblastes ^a | Humain | Transfection |
| 2012 | Bhattacharjee [106] | Hela, HEK293 | Humain | Transfection |
| 2012 | Jenal [79] | U2OS | Humain | Transfection |
| 2011 | Mamchaoui [92] | Myoblastes immortalisés ^a | Humain | Transduction |

GFP : *green fluorescent protein* ; KD : *knock-down* (extinction par acide ribonucléique [ARN] interférence).^a Lignées cellulaires musculaires.**Tableau 3.**

Modèles animaux de la dystrophie musculaire oculopharyngée.

| | Souris | | Drosophile | | Nématode | |
|-----------------------|---------------------------------|------------------------|--|----------------------------------|---|--|
| Références | Hino [108], 2004 | Davies [87], 2005 | Dion [109], 2005 | Mankodi [110], 2012 | Chartier [107], 2006 | Catoire [89], 2008 |
| Promoteur | CAG - ubiquitaire | HS - muscle spécifique | PABPN1 - ubiquitaire | Inductible MFP - ubiquitaire | (Mhc)-Gal4/UAS - muscle spécifique | Myo3 - muscle spécifique |
| Transgène | (GCN)13/Ala13 | (GCN)17/Ala17 | (GCN)17/Ala17 | (GCN)16/Ala16 | (GCN)17/Ala17 | (GCN)13/Ala13 coexprimé avec GFP nucléaire |
| Agrégats | Oui | Oui | Oui - neurones | Oui - réversible | Oui | Non |
| Phénotype musculaire | Faiblesse progressive | Faiblesse progressive | Faiblesse mais pathologie neuronale prédominante | Perte de muscle | Défauts de position des ailes et dégénération | Défauts de motilité et dégénération cellulaire |
| Phénotype additionnel | Survie diminuée, perte de poids | Aucun | Défauts locomoteurs Phénotype neuronal | Survie diminuée, cardiomyopathie | Aucun | |
| Fond génétique | C57Bl6 | FvB | C57Bl6 | FVB/C57Bl6 | | |

cependant la formation d'agrégats intranucléaires, permettant néanmoins d'étudier le rôle de ces structures et les mécanismes physiopathologiques en jeu. Quelques modèles cellulaires musculaires ont cependant été développés, il convient de citer en particulier un modèle de myoblastes murins immortalisés exprimant de façon stable PABPN1 muté en différenciation [91] et une lignée de myoblastes humains immortalisés d'un patient avec DMOP [92].

Plusieurs modèles animaux (Tableau 3) [87, 89, 107-110] ont été développés [111], les plus utilisés étant :

- un modèle de nématode qui exprime une forme mutée de PABPN1 sous contrôle d'un promoteur muscle spécifique (myo3). Ce modèle présente des défauts de motilité et une dégénérescence cellulaire [89] ;
- un modèle drosophile [107] qui exprime une forme mutée de PABPN1 sous contrôle d'un promoteur muscle spécifique également (Mhc-Gal4/UAS). Ce modèle présente des agrégats intranucléaires, des défauts de position des ailes et une dégénérescence musculaire ;
- un modèle de souris A17.1 surexprimant une forme mutée de PABPN1 sous contrôle d'un promoteur muscle spécifique (HSA). Ce modèle présente des agrégats intranucléaires et une faiblesse musculaire progressive [87, 112].

Les modèles drosophile et souris ont des caractéristiques proches de celles observées dans la maladie chez l'homme. Deux études ont d'ailleurs montré que des défauts moléculaires mis en évidence dans ces modèles se confirmaient chez l'homme (défauts mitochondriaux [113], dérégulation du système ubiquitine/protéasome [93]).

Bien sûr les biopsies musculaires de patients constituent un matériel idéal pour l'étude des mécanismes physiopathologiques [69] – puisque reflétant directement les phénotypes cellulaires et moléculaires de la protéine dans un contexte endogène – mais ces biopsies sont rares. C'est donc la combinaison de l'ensemble de ces matériels d'étude [93, 113] qui va permettre d'avoir un champ d'investigation le plus large possible pour la compréhension des mécanismes en cause dans la DMOP.

■ Approches thérapeutiques

À ce jour, il n'existe pas de traitement médicamenteux de la DMOP. Cependant, plusieurs recommandations peuvent être faites permettant grandement d'améliorer la qualité de vie des patients. La chirurgie du ptosis est indiquée dès lors que celui-ci devient invalidant. Elle consiste souvent en une résection du

muscle releveur de la paupière ou en la suspension de la paupière supérieure au muscle frontal [114]. De même, lorsque la dysphagie devient invalidante, il convient d'adapter l'alimentation (épaissir les aliments, passer aux aliments mixés, associer des compléments nutritifs) et de prévoir une consultation de diététicienne. Les examens biologiques tels que le dosage de préalbumine, la numération formule sanguine (NFS), le ionogramme sanguin, la fonction rénale, le dosage de vitamines, du fer, du cholestérol et des triglycérides permettent de s'assurer de l'absence de carences importantes qui, le cas échéant, sont corrigées. Une intervention chirurgicale telle que la myotomie cricopharyngienne extramuqueuse permet d'améliorer pendant au moins trois à quatre ans la dysphagie [115]. Il faut cependant noter qu'un tiers des patients présentent après trois ans une récurrence de la dysphagie, accessible néanmoins à une myotomie transmuqueuse réalisée par voie endoscopique. Un essai clinique de phase I/IIa (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00773227) de thérapie cellulaire a été mené en France associant myotomie cricopharyngienne et greffe de myoblastes autologues dans les muscles pharyngés. Lors d'une première étape, 12 patients ont été traités avec ce protocole par le groupe des professeurs J. Lacau Saint Guily et S. Perié (service d'oto-rhino-laryngologie [ORL], hôpital Tenon, Paris) avec une bonne tolérance, une amélioration de la déglutition et de la qualité de vie. Un effet dose-dépendant de la quantité de cellules injectées a été noté dans cette étude [116]. Cet essai est maintenant prolongé avec 16 nouveaux patients.

D'autres pistes thérapeutiques sont à l'essai dans des modèles cellulaires et animaux :

- des anticorps spécifiques de la protéine PABPN1 (« intrabodies ») empêchent la formation des agrégats dans des modèles cellulaires et dans le modèle drosophile [94, 117] ;
- le tréhalose et la doxycycline réduisent l'importance des agrégats et en limiteraient la toxicité dans les modèles cellulaires et souris de DMOP [87, 95]. À la suite de ce résultat, un essai clinique fondé sur des injections intraveineuses de tréhalose a été lancé par la société Bioblast (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02015481) ;
- le sirtinol protège contre la toxicité induite par la protéine PABPN1 anormale chez le nématode [89, 118, 119] ;
- deux molécules anti-prion (le 6-aminophénanthridine et l'acétate de guanabenz) réduisent la toxicité des protéines PABPN1 anormales et la dégénérescence musculaire chez la drosophile [120] ;
- la cystamine réduit la formation et la toxicité des agrégats, diminue l'apoptose et améliore la faiblesse musculaire dans la souris modèle de DMOP [96] ;
- la réduction de l'apoptose par le croisement de souris modèles de la DMOP avec des souris qui surexpriment une protéine anti-apoptotique, *B-cell lymphoma 2* (BCL2), améliore le phénotype pathologique des souris DMOP [121] ;
- la réduction de l'apoptose avec le chlorure de lithium dans un modèle de myoblastes de souris surexprimant PABPN1 muté [122].

■ Conclusion

La dystrophie musculaire oculopharyngée est une entité clinique bien établie, caractérisée par un début le plus souvent tardif après 50 ans, de transmission autosomique dominante dans la plupart des cas. L'atteinte musculaire affecte de façon prédominante les muscles oculaires et pharyngés, mais évolue vers une faiblesse musculaire lentement progressive prédominant au niveau des muscles du tronc et des membres. L'élément le plus caractéristique est la présence d'inclusions filamenteuses intranucléaires de 8,5 nm de diamètre, observées dans les noyaux des fibres musculaires.

Une avancée majeure dans la compréhension de cette pathologie a été réalisée en 1998 avec l'identification du gène *PABPN1* puis de la mutation génétique responsable de la DMOP [9]. Cette mutation consiste en une expansion d'une répétition de triplets (GCN) dans l'exon 1 du gène *PABPN1*, ce qui fait de la DMOP une maladie à répétition de triplets. Les mécanismes moléculaires

en jeu dans cette maladie sont encore mal connus et de nombreuses questions restent encore sans réponses. Dans la DMOP comme dans la plupart des myopathies et dystrophies musculaires, bien que les gènes en cause soient exprimés de façon ubiquitaire dans tous les tissus, l'implication sélective de certains muscles est une observation non encore élucidée. Malgré des connaissances accrues concernant la structure et la fonction de la protéine PABPN1, le mécanisme, selon lequel des expansions de ce petit domaine polyA entraînent l'atteinte musculaire, n'est pas encore complètement déterminé.

“ Points essentiels

- La DMOP se caractérise cliniquement par une triade diagnostique : histoire familiale de DMOP, ptosis, le plus souvent bilatéral, et dysphagie.
- La DMOP est une maladie autosomique dominante sans hétérogénéité génétique.
- La mutation à l'origine de la DMOP est une expansion stable d'un triplet (GCN) dans l'exon 1 du gène *PABPN1*. Il n'y a pas de phénomène d'anticipation.
- Le diagnostic peut être évoqué en microscopie électronique sur la biopsie musculaire par la présence de filaments intranucléaires spécifiques (INIs) de 8,5 nm de diamètre et dont la longueur est inférieure à 0,25 µm.
- La pathophysiologie est encore non complètement élucidée ; l'effet toxique pourrait être dû à un défaut d'élimination de la protéine mutée et une accumulation dans les noyaux des cellules musculaires.
- Il n'existe pas de traitement médicamenteux de la DMOP. Toutefois, la chirurgie du ptosis et la myotomie cricopharyngienne permettent d'améliorer les symptômes. Une adaptation de l'alimentation permet d'éviter les carences, les fausses routes et les risques de pneumopathies d'inhalation et ainsi d'améliorer la qualité de vie du patient.

Déclaration d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts en relation avec cet article.



■ Références

- [1] Bouchard JP, Brais B, Brunet D, Gould PV, Rouleau GA. Recent studies on oculopharyngeal muscular dystrophy in Quebec. *Neuromuscul Disord* 1997;7(Suppl. 1):S22-9.
- [2] Victor M, Hayes R, Adams RD. Oculopharyngeal muscular dystrophy. A familial disease of late life characterized by dysphagia and progressive ptosis of the eyelids. *N Engl J Med* 1962;267:1267-72.
- [3] Blumen SC, Bouchard JP, Brais B, Carasso RL, Paleacu D, Drory VE, et al. Cognitive impairment and reduced life span of oculopharyngeal muscular dystrophy homozygotes. *Neurology* 2009;73:596-601.
- [4] Dubbioso R, Moretta P, Manganeli F, Fiorillo C, Iodice R, Trojano L, et al. Executive functions are impaired in heterozygote patients with oculopharyngeal muscular dystrophy. *J Neurol* 2012;259:833-7.
- [5] Taylor E. Progressive vagus-glossopharyngeal paralysis with ptosis: a contribution to the group family diseases. *J Nerv Ment Dis* 1915:129-39.
- [6] Tomé FM, Fardeau M. Nuclear inclusions in oculopharyngeal dystrophy. *Acta Neuropathol* 1980;49:85-7.
- [7] Tomé F, Fardeau M. Oculopharyngeal muscular dystrophy. In: *Myology*. New York: MacGraw-Hill; 1994:233-45.
- [8] Blumen SC, Nisipeanu P, Sadeh M, Asherov A, Tomé FM, Korczyn AD. Clinical features of oculopharyngeal muscular dystrophy among Bukhara Jews. *Neuromuscul Disord* 1993;3:575-7.

- [9] Brais B, Bouchard JP, Xie YG, Rochefort DL, Chretien N, Tomé FM, et al. Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nat Genet* 1998;**18**:164–7.
- [10] Semmler A, Kress W, Vielhaber S, Schroder R, Kornblum C. Variability of the recessive oculopharyngeal muscular dystrophy phenotype. *Muscle Nerve* 2007;**35**:681–4.
- [11] Van Der Sluijs BM, Hoefsloot LH, Padberg GW, Van Der Maarel SM, Van Engelen BG. Oculopharyngeal muscular dystrophy with limb girdle weakness as major complaint. *J Neurol* 2003;**250**:1307–12.
- [12] Raz V, Butler-Browne G, Van Engelen B, Brais B. 191st ENMC international workshop: recent advances in oculopharyngeal muscular dystrophy research: from bench to bedside 8–10 June 2012, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 2013;**23**:516–23.
- [13] Richard P, Trollet C, Gidaro T, Demay L, Brochier G, Malfatti E, et al. PABPN1 (GCN)11 as a dominant allele in oculopharyngeal muscular dystrophy –Consequences in clinical diagnosis and genetic counseling. *J Neuromuscul Dis* 2015;**2**:175–80.
- [14] von Gräfe A. Verhandlungen ärztlicher Gesellschaftern: Sitzung vom 19 Februar 1868 der Berliner medicinische Gesellschaft. *Berl Klin Wochenschr* 1868;**5**:1868.
- [15] Fuchs E. Ueber isolirte doppelseitige Ptosis. *Arch Ophthalmol* 1890;**36**:234.
- [16] Delord. Sur une forme de ptosis non congénital et héréditaire. *Presse Med* 1903;**11**:592.
- [17] Dutil A. Note sur une forme de ptosis non congénital et héréditaire. *Prog Med* 1892;**16**:401.
- [18] Möbius P. Ueber infantilen Kernschwund. *Munch Med Wochenschr* 1892;**39**:17.
- [19] Kiloh L, Nevin S. Progressive dystrophy of the external ocular muscles (ocular myopathy). *Brain* 1951;**74**:115.
- [20] Zintz R. Dystrophische Veränderungen in äusseren Augenmuskeln und Schultermuskeln bei der sog. In: Kuhn E, editor. *Progressiven Graefeschen Ophthalmoplegie*. Berlin: Springer-Verlag; 1966.
- [21] Coquet M, Vital C, Julien J. Presence of inclusion body myositis-like filaments in oculopharyngeal muscular dystrophy. Ultrastructural study of 10 cases. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1990;**16**:393–400.
- [22] Blumen SC, Sadeh M, Korczyn AD, Rouche A, Nisipeanu P, Asherov A, et al. Intranuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy among Bukhara Jews. *Neurology* 1996;**46**:1324–8.
- [23] Barbeau A. Ocular myopathy in French Canada. A preliminary study. *J Genet Hum* 1966;**15**(Suppl.):49–55.
- [24] Brais B, Xie YG, Sanson M, Morgan K, Weissenbach J, Korczyn AD, et al. The oculopharyngeal muscular dystrophy locus maps to the region of the cardiac alpha and beta myosin heavy chain genes on chromosome 14q11.2-q13. *Hum Mol Genet* 1995;**4**:429–34.
- [25] Vita G, Dattola R, Santoro M, Messina C. Familial oculopharyngeal muscular dystrophy with distal spread. *J Neurol* 1983;**230**:57–64.
- [26] Lim CT, Chew CT, Chew SH. Oculopharyngeal muscular dystrophy: a case report and a review of literature. *Ann Acad Med Singapore* 1992;**21**:399–403.
- [27] Uyama E, Nohira O, Chateau D, Tokunaga M, Uchino M, Okabe T, et al. Oculopharyngeal muscular dystrophy in two unrelated Japanese families. *Neurology* 1996;**46**:773–8.
- [28] Teh BT, Sullivan AA, Farnebo F, Zander C, Li FY, Strachan N, et al. Oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD)–report and genetic studies of an Australian kindred. *Clin Genet* 1997;**51**:52–5.
- [29] Fardeau M, Tomé FM. Oculopharyngeal muscular dystrophy in France. *Neuromuscul Disord* 1997;**7**(Suppl. 1):S30–3.
- [30] Blumen SC, Nisipeanu P, Sadeh M, Asherov A, Blumen N, Wirguin Y, et al. Epidemiology and inheritance of oculopharyngeal muscular dystrophy in Israel. *Neuromuscul Disord* 1997;**7**(Suppl. 1):S38–40.
- [31] Medici M, Pizzarossa C, Skuk D, Yorio D, Emmanuelli G, Mesa R. Oculopharyngeal muscular dystrophy in Uruguay. *Neuromuscul Disord* 1997;**7**(Suppl. 1):S50–2.
- [32] Meola G, Sansone V, Rotondo G, Tomé FM, Bouchard JP. Oculopharyngeal muscular dystrophy in Italy. *Neuromuscul Disord* 1997;**7**(Suppl. 1):S53–6.
- [33] Porschke H, Kress W, Reichmann H, Goebel HH, Grimm T. Oculopharyngeal muscular dystrophy in a northern German family linked to chromosome 14q, and presenting carnitine deficiency. *Neuromuscul Disord* 1997;**7**(Suppl. 1):S57–62.
- [34] Grewal RP, Karkera JD, Grewal RK, Detera-Wadleigh SD. Mutation analysis of oculopharyngeal muscular dystrophy in Hispanic American families. *Arch Neurol* 1999;**56**:1378–81.
- [35] Becher MW, Morrison L, Davis LE, Maki WC, King MK, Bicknell JM, et al. Oculopharyngeal muscular dystrophy in Hispanic New Mexicans. *JAMA* 2001;**286**:2437–40.
- [36] Brunet G, Tomé FM, Eymard B, Robert JM, Fardeau M. Genealogical study of oculopharyngeal muscular dystrophy in France. *Neuromuscul Disord* 1997;**7**(Suppl. 1):S34–7.
- [37] Fan X, Rouleau GA. Progress in understanding the pathogenesis of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Can J Neurol Sci* 2003;**30**:8–14.
- [38] Brais B. Oculopharyngeal muscular dystrophy: a late-onset polyalanine disease. *Cytogenet Genome Res* 2003;**100**:252–60.
- [39] Ruegg S, Lehky Hagen M, Hohl U, Kappos L, Fuhr P, Plasilov M, et al. Oculopharyngeal muscular dystrophy - an under-diagnosed disorder? *Swiss Med Wkly* 2005;**135**:574–86.
- [40] Little BW, Perl DP. Oculopharyngeal muscular dystrophy. An autopsied case from the French-Canadian kindred. *J Neurol Sci* 1982;**53**:145–58.
- [41] Probst A, Tackmann W, Stoekli HR, Jerusalem F, Ulrich J. Evidence for a chronic axonal atrophy in oculopharyngeal “muscular dystrophy”. *Acta Neuropathol* 1982;**57**:209–16.
- [42] Schmitt HP, Krause KH. An autopsy study of a familial oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) with distal spread and neurogenic involvement. *Muscle Nerve* 1981;**4**:296–305.
- [43] Hardiman O, Halperin JJ, Farrell MA, Shapiro BE, Wray SH, Brown Jr RH. Neuropathic findings in oculopharyngeal muscular dystrophy. A report of seven cases and a review of the literature. *Arch Neurol* 1993;**50**:481–8.
- [44] Schober R, Kress W, Grahmann F, Kellermann S, Baum P, Gunzel S, et al. Unusual triplet expansion associated with neurogenic changes in a family with oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neuropathology* 2001;**21**:45–52.
- [45] Muller T, Schroder R, Zierz S. GCG repeats and phenotype in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 2001;**24**:120–2.
- [46] Boukriche Y, Maisonobe T, Masson C. Neurogenic involvement in a case of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 2002;**25**:98–101.
- [47] Abu-Baker A, Messaied C, Laganier J, Gaspar C, Brais B, Rouleau GA. Involvement of the ubiquitin-proteasome pathway and molecular chaperones in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 2003;**12**:2609–23.
- [48] Grewal RP, Cantor R, Turner G, Grewal RK, Detera-Wadleigh SD. Genetic mapping and haplotype analysis of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neuroreport* 1998;**9**:961–5.
- [49] Stajich JM, Gilchrist JM, Lennon F, Lee A, Yamaoka L, Rosi B, et al. Confirmation of linkage of oculopharyngeal muscular dystrophy to chromosome 14q11.2-q13 in American families suggests the existence of a second causal mutation. *Neuromuscul Disord* 1997;**7**(Suppl. 1):S75–81.
- [50] Blumen SC, Korczyn AD, Lavoie H, Medynski S, Chapman J, Asherov A, et al. Oculopharyngeal MD among Bukhara Jews is due to a founder (GCG)9 mutation in the PABP2 gene. *Neurology* 2000;**55**:1267–70.
- [51] Robinson DO, Hammans SR, Read SP, Sillibourne J. Oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD): analysis of the PABPN1 gene expansion sequence in 86 patients reveals 13 different expansion types and further evidence for unequal recombination as the mutational mechanism. *Hum Genet* 2005;**116**:267–71.
- [52] Blumen SC, Brais B, Korczyn AD, Medynski S, Chapman J, Asherov A, et al. Homozygotes for oculopharyngeal muscular dystrophy have a severe form of the disease. *Ann Neurol* 1999;**46**:115–8.
- [53] Bouchard JP, Marcoux S, Gosselin F, Pineault D, Rouleau GA. A simple test for the detection of the dysphagia in members of families with oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD). *Can J Neurol Sci* 1992;**19**:296–7.
- [54] St Guily JL, Moine A, Perie S, Bokowy C, Angelard B, Chaussade S. Role of pharyngeal propulsion as an indicator for upper esophageal sphincter myotomy. *Laryngoscope* 1995;**105**(7Pt1):723–7.
- [55] Dodds WJ, Logemann JA, Stewart ET. Radiologic assessment of abnormal oral and pharyngeal phases of swallowing. *AJR Am J Roentgenol* 1990;**154**:965–74.
- [56] Langmore SE, Schatz K, Olson N. Endoscopic and videofluoroscopic evaluations of swallowing and aspiration. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1991;**100**:678–81.
- [57] Perie S, Laccourreye L, Flahault A, Hazebroucq V, Chaussade S, Lacau St Guily J. Role of videoendoscopy in assessment of pharyngeal function in oropharyngeal dysphagia: comparison with videofluoroscopy and manometry. *Laryngoscope* 1998;**108**(11Pt1):1712–6.
- [58] Fischmann A, Gloor M, Fasler S, Haas T, Rodoni Wetzler R, Bieri O, et al. Muscular involvement assessed by MRI correlates to motor function measurement values in oculopharyngeal muscular dystrophy. *J Neurol* 2011;**258**:1333–40.

- [59] Gloor M, Fasler S, Fischmann A, Haas T, Bieri O, Heinimann K, et al. Quantification of fat infiltration in oculopharyngeal muscular dystrophy: comparison of three MR imaging methods. *J Magn Reson Imaging* 2011;**33**:203–10.
- [60] Witting N, Mensah A, Kober L, Bundgaard H, Petri H, Duno M, et al. Ocular, bulbar, limb, and cardiopulmonary involvement in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Acta Neurol Scand* 2014;**130**:125–30.
- [61] de Lonlay P, Rötig A, Rustin P, Munnich A. Cytopathies mitochondriales. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Neurologie, 17-162-C-10, 2001 : 10p.
- [62] Bouhour F, Bost M, Vial C. Maladie de Steinert. *Presse Med* 2007;**36**(6Pt2):965–71.
- [63] Durmus H, Laval SH, Deymeer F, Parman Y, Kiyani E, Gokyigit M, et al. Oculopharyngodistal myopathy is a distinct entity: clinical and genetic features of 47 patients. *Neurology* 2011;**76**:227–35.
- [64] Uyama E, Uchino M, Chateau D, Tomé FM. Autosomal recessive oculopharyngodistal myopathy in light of distal myopathy with rimmed vacuoles and oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 1998;**8**:119–25.
- [65] Jaspard HH, Bastiaensen LA, ter Laak HJ, Joosten EM, Horstink MW, Stadhouders AM. Oculopharyngodistal myopathy with early onset and neurogenic features. *Clin Neurol Neurosurg* 1977;**80**:272–82.
- [66] Van der Sluijs BM, ter Laak HJ, Scheffer H, Van der Maarel SM, Van Engelen BG. Autosomal recessive oculopharyngodistal myopathy: a distinct phenotypical, histological, and genetic entity. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;**75**:1499–501.
- [67] Young ID, Harper PS. Hereditary distal spinal muscular atrophy with vocal cord paralysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1980;**43**:413–8.
- [68] Feit H, Silbergleit A, Schneider LB, Gutierrez JA, Fitoussi RP, Reyes C, et al. Vocal cord and pharyngeal weakness with autosomal dominant distal myopathy: clinical description and gene localization to 5q31. *Am J Hum Genet* 1998;**63**:1732–42.
- [69] Gidaro T, Negroni E, Perie S, Mirabella M, Laine J, Lacau St Guily J, et al. Atrophy, fibrosis, and increased PAX7-positive cells in pharyngeal muscles of oculopharyngeal muscular dystrophy patients. *J Neuropathol Exp Neurol* 2013;**72**:234–43.
- [70] Askanas V, Engel WK. New advances in the understanding of sporadic inclusion-body myositis and hereditary inclusion-body myopathies. *Curr Opin Rheumatol* 1995;**7**:486–96.
- [71] Leclerc A, Tomé FM, Fardeau M. Ubiquitin and beta-amyloid-protein in inclusion body myositis (IBM), familial IBM-like disorder and oculopharyngeal muscular dystrophy: an immunocytochemical study. *Neuromuscul Disord* 1993;**3**:283–91.
- [72] Becher MW, Kotzok JA, Davis LE, Bear DG. Intracellular inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy contain poly(A) binding protein 2. *Ann Neurol* 2000;**48**:812–5.
- [73] Banerjee A, Apponi LH, Pavlath GK, Corbett AH. PABPN1: molecular function and muscle disease. *FEBS J* 2013;**280**:4230–50.
- [74] Wahle E. A novel poly(A)-binding protein acts as a specificity factor in the second phase of messenger RNA polyadenylation. *Cell* 1991;**66**:759–68.
- [75] Kuhn U, Wahle E. Structure and function of poly(A) binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 2004;**1678**:67–84.
- [76] Benoit B, Mitou G, Chartier A, Temme C, Zaessinger S, Wahle E, et al. An essential cytoplasmic function for the nuclear poly(A) binding protein, PABP2, in poly(A) tail length control and early development in *Drosophila*. *Dev Cell* 2005;**9**:511–22.
- [77] Apponi LH, Leung SW, Williams KR, Valentini SR, Corbett AH, Pavlath GK. Loss of nuclear poly(A)-binding protein 1 causes defects in myogenesis and mRNA biogenesis. *Hum Mol Genet* 2009;**19**:1058–65.
- [78] de Klerk E, Venema A, Anvar SY, Goeman JJ, Hu O, Trollet C, et al. Poly(A) binding protein nuclear 1 levels affect alternative polyadenylation. *Nucleic Acids Res* 2012;**40**:9089–101.
- [79] Jenal M, Elkon R, Loayza-Puch F, Van Haften G, Kuhn U, Menzies FM, et al. The poly(a)-binding protein nuclear 1 suppresses alternative cleavage and polyadenylation sites. *Cell* 2012;**149**:538–53.
- [80] Beaulieu YB, Kleinman CL, Landry-Voyer AM, Majewski J, Bachand F. Polyadenylation-dependent control of long noncoding RNA expression by the poly(A)-binding protein nuclear 1. *PLoS Genet* 2012;**8**, e1003078.
- [81] Dinger ME, Amaral PP, Mercer TR, Pang KC, Bruce SJ, Gardiner BB, et al. Long noncoding RNAs in mouse embryonic stem cell pluripotency and differentiation. *Genome Res* 2008;**18**:1433–45.
- [82] Li Y, Wang X. Role of long noncoding RNAs in malignant disease. *Mol Med Rep* 2016;**13**:1463–9.
- [83] Taylor JP, Hardy J, Fischbeck KH. Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science* 2002;**296**:1991–5.
- [84] Kim S, Nollen EA, Kitagawa K, Bindokas VP, Morimoto RI. Polyglutamine protein aggregates are dynamic. *Nat Cell Biol* 2002;**4**:826–31.
- [85] Corbeil-Girard LP, Klein AF, Sasseville AM, Lavoie H, Dicaire MJ, Saint-Denis A, et al. PABPN1 overexpression leads to upregulation of genes encoding nuclear proteins that are sequestered in oculopharyngeal muscular dystrophy nuclear inclusions. *Neurobiol Dis* 2005;**18**:551–67.
- [86] Calado A, Tomé FM, Brais B, Rouleau GA, Kuhn U, Wahle E, et al. Nuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy consist of poly(A) binding protein 2 aggregates which sequester poly(A) RNA. *Hum Mol Genet* 2000;**9**:2321–8.
- [87] Davies JE, Wang L, Garcia-Oroz L, Cook LJ, Vacher C, O'Donovan DG, et al. Doxycycline attenuates and delays toxicity of the oculopharyngeal muscular dystrophy mutation in transgenic mice. *Nat Med* 2005;**11**:672–7.
- [88] Klein AF, Ebihara M, Alexander C, Dicaire MJ, Sasseville AM, Langelier Y, et al. PABPN1 polyalanine tract deletion and long expansions modify its aggregation pattern and expression. *Exp Cell Res* 2008;**314**:1652–66.
- [89] Catoire H, Pasco MY, Abu-Baker A, Holbert S, Tourette C, Brais B, et al. Sirtuin inhibition protects from the polyalanine muscular dystrophy protein PABPN1. *Hum Mol Genet* 2008;**17**:2108–17.
- [90] Messaed C, Dion PA, Abu-Baker A, Rochefort D, Laganier J, Brais B, et al. Soluble expanded PABPN1 promotes cell death in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neurobiol Dis* 2007;**26**:546–57.
- [91] Raz V, Routledge S, Venema A, Buijze H, Van der Wal E, Anvar S, et al. Modeling oculopharyngeal muscular dystrophy in myotube cultures reveals reduced accumulation of soluble mutant PABPN1 protein. *Am J Pathol* 2011;**179**:1988–2000.
- [92] Mamchaoui K, Trollet C, Bigot A, Negroni E, Chaouch S, Wolff A, et al. Immortalized pathological human myoblasts: towards a universal tool for the study of neuromuscular disorders. *Skelet Muscle* 2011;**1**:34.
- [93] Anvar SY, t Hoen PA, Venema A, van der Sluijs B, van Engelen B, Snoeck M, et al. Deregulation of the ubiquitin-proteasome system is the predominant molecular pathology in OPMD animal models and patients. *Skelet Muscle* 2011;**1**:15.
- [94] Verheesen P, de Kluijver A, Van Koningsbruggen S, de Brij M, de Haard HJ, Van Ommen GJ, et al. Prevention of oculopharyngeal muscular dystrophy-associated aggregation of nuclear polyA-binding protein with a single-domain intracellular antibody. *Hum Mol Genet* 2006;**15**:105–11.
- [95] Davies JE, Sarkar S, Rubinsztein DC. Trehalose reduces aggregate formation and delays pathology in a transgenic mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 2006;**15**:23–31.
- [96] Davies JE, Rose C, Sarkar S, Rubinsztein DC. Cystamine suppresses polyalanine toxicity in a mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Sci Transl Med* 2010;**2**, 34ra40.
- [97] Bao YP, Cook LJ, O'Donovan D, Uyama E, Rubinsztein DC. Mammalian, yeast, bacterial, and chemical chaperones reduce aggregate formation and death in a cell model of oculopharyngeal muscular dystrophy. *J Biol Chem* 2002;**277**:12263–9.
- [98] Bao YP, Sarkar S, Uyama E, Rubinsztein DC. Congo red, doxycycline, and HSP70 overexpression reduce aggregate formation and cell death in cell models of oculopharyngeal muscular dystrophy. *J Med Genet* 2004;**41**:47–51.
- [99] Abu-Baker A, Laganier S, Fan X, Laganier J, Brais B, Rouleau GA. Cytoplasmic targeting of mutant poly(A)-binding protein nuclear 1 suppresses protein aggregation and toxicity in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Traffic* 2005;**6**:766–79.
- [100] Wang Q, Mosser DD, Bag J. Induction of HSP70 expression and recruitment of HSC70 and HSP70 in the nucleus reduce aggregation of a polyalanine expansion mutant of PABPN1 in HeLa cells. *Hum Mol Genet* 2005;**14**:3673–84.
- [101] Tavanez JP, Calado P, Braga J, Lafarga M, Carmo-Fonseca M. In vivo aggregation properties of the nuclear poly(A)-binding protein PABPN1. *RNA* 2005;**11**:752–62.
- [102] Marie-Josée Sasseville A, Caron AW, Bourget L, Klein AF, Dicaire MJ, Rouleau GA, et al. The dynamism of PABPN1 nuclear inclusions during the cell cycle. *Neurobiol Dis* 2006;**23**:621–9.
- [103] Apponi LH, Leung SW, Williams KR, Valentini SR, Corbett AH, Pavlath GK. Loss of nuclear poly(A)-binding protein 1 causes defects in myogenesis and mRNA biogenesis. *Hum Mol Genet* 2010;**19**:1058–65.
- [104] Raz V, Abraham T, Van Zwet EW, Dirks RW, Tanke HJ, Van der Maarel SM. Reversible aggregation of PABPN1 pre-inclusion structures. *Nucleus* 2011;**2**:208–18.

- [105] Bengoechea R, Tapia O, Casafont I, Berciano J, Lafarga M, Berciano MT. Nuclear speckles are involved in nuclear aggregation of PABPN1 and in the pathophysiology of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neurobiol Dis* 2012;**46**:118–29.
- [106] Bhattacharjee RB, Zannat T, Bag J. Expression of the polyalanine expansion mutant of nuclear poly(A)-binding protein induces apoptosis via the p53 pathway. *Cell Biol Int* 2012;**36**:697–704.
- [107] Chartier A, Benoit B, Simonelig M. A Drosophila model of oculopharyngeal muscular dystrophy reveals intrinsic toxicity of PABPN1. *Embo J* 2006;**25**:2253–62.
- [108] Hino H, Araki K, Uyama E, Takeya M, Araki M, Yoshinobu K, et al. Myopathy phenotype in transgenic mice expressing mutated PABPN1 as a model of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 2004;**13**:181–90.
- [109] Dion P, Shanmugam V, Gaspar C, Messaed C, Meijer I, Toulouse A, et al. Transgenic expression of an expanded (GCG)₁₃ repeat PABPN1 leads to weakness and coordination defects in mice. *Neurobiol Dis* 2005;**18**:528–36.
- [110] Mankodi A, Wheeler TM, Shetty R, Salceies KM, Becher MW, Thornton CA. Progressive myopathy in an inducible mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neurobiol Dis* 2012;**45**:539–46.
- [111] Chartier A, Simonelig M. Animal models in therapeutic drug discovery for oculopharyngeal muscular dystrophy. *Drug Discov Today Technol* 2013;**10**:e103–8.
- [112] Trollet C, Anvar SY, Venema A, Hargreaves IP, Foster K, Vignaud A, et al. Molecular and phenotypic characterization of a mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy reveals severe muscular atrophy restricted to fast glycolytic fibres. *Hum Mol Genet* 2010;**19**:2191–207.
- [113] Chartier A, Klein P, Pierson S, Barbezier N, Gidaro T, Casas F, et al. Mitochondrial dysfunction reveals the role of mRNA poly(A) tail regulation in oculopharyngeal muscular dystrophy pathogenesis. *PLoS Genet* 2015;**11**:e1005092.
- [114] Codere F, Brais B, Rouleau G, Lafontaine E. Oculopharyngeal muscular dystrophy: what's new? *Orbit* 2001;**20**:259–66.
- [115] Coiffier L, Perie S, Laforet P, Eymard B, St Guily JL. Long-term results of cricopharyngeal myotomy in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;**135**:218–22.
- [116] Perie S, Trollet C, Mouly V, Vanneaux V, Mamchaoui K, Bouazza B, et al. Autologous myoblast transplantation for oculopharyngeal muscular dystrophy: a Phase I/IIa clinical study. *Mol Ther* 2014;**22**:219–25.
- [117] Chartier A, Raz V, Sterrenburg E, Verrips CT, Van der Maarel SM, Simonelig M. Prevention of oculopharyngeal muscular dystrophy by muscular expression of Llama single-chain intrabodies in vivo. *Hum Mol Genet* 2009;**18**:1849–59.
- [118] Pasco MY, Catoire H, Parker JA, Brais B, Rouleau GA, Neri C. Crosstalk between canonical Wnt signaling and the sirtuin-FoxO longevity pathway to protect against muscular pathology induced by mutant PABPN1 expression in *C. elegans*. *Neurobiol Dis* 2010;**38**:425–33.
- [119] Pasco MY, Rotili D, Altucci L, Farina F, Rouleau GA, Mai A, et al. Characterization of sirtuin inhibitors in nematodes expressing a muscular dystrophy protein reveals muscle cell and behavioral protection by specific sirtinol analogues. *J Med Chem* 2010;**53**:1407–11.
- [120] Barbezier N, Chartier A, Bidet Y, Buttstedt A, Voisset C, Galons H, et al. Antiprion drugs 6-aminophenanthridine and guanabenz reduce PABPN1 toxicity and aggregation in oculopharyngeal muscular dystrophy. *EMBO Mol Med* 2011;**3**:35–49.
- [121] Davies JE, Rubinsztein DC. Over-expression of BCL2 rescues muscle weakness in a mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 2011;**20**:1154–63.
- [122] Abu-Baker A, Laganiere J, Gaudet R, Rochefort D, Brais B, Neri C, et al. Lithium chloride attenuates cell death in oculopharyngeal muscular dystrophy by perturbing Wnt/beta-catenin pathway. *Cell Death Dis* 2013;**4**:e821.

P. Richard, PharmD, PhD (pascale.richard@aphp.fr).

Unité fonctionnelle de cardiogénétique et myogénétique moléculaire, service de biochimie métabolique, AP–HP, Hôpitaux universitaires de la Pitié-Salpêtrière – Charles-Foix, 6-10, rue de la Peyronie, 75013 Paris, France.

Inserm UMRS 1166, Université Paris-6, ICAN Institute, Hôpital Pitié-Salpêtrière, 91, boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France.

F. Roth, MsC.

Sorbonne Universités, UPMC Université Paris-6, UM76, Inserm U974, Institut de myologie, CNRS FRE3617, 47, boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France.

T. Stojkovic, MD.

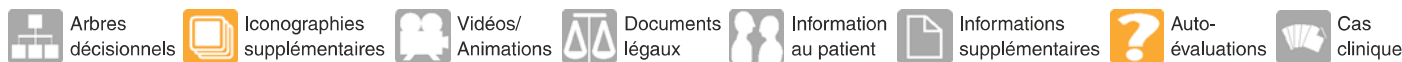
Centre de référence des maladies neuromusculaires Paris Est, Institut de myologie, AP–HP, Hôpitaux universitaires de la Pitié-Salpêtrière – Charles-Foix, 47-83, boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris cedex 13, France.

C. Trollet, PhD.

Sorbonne Universités, UPMC Université Paris-6, UM76, Inserm U974, Institut de myologie, CNRS FRE3617, 47, boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France.

Toute référence à cet article doit porter la mention : Richard P, Roth F, Stojkovic T, Trollet C. Dystrophie musculaire oculopharyngée. *EMC - Neurologie* 2016;0(0):1-12 [Article 17-175-F-10].

Disponibles sur www.em-consulte.com



ARTICLE N° 3

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

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

Nucleic Acid Review 2016

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

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

¹Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Centre de Recherche en Myologie, INSERM UMRS974, CNRS FRE3617, Institut de Myologie, 47 bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France, ²Univ. Lille – URePSSS – Unité de Recherche Pluridisciplinaire Sport Santé Société, équipe APMS, F-59000 Lille, France, ³School of Biological Sciences, Royal Holloway – University of London, Egham, Surrey TW20 0EX, UK, ⁴Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, University Pierre-et-Marie-Curie, Paris VI, Tenon Hospital, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Paris, France, ⁵GenoSplice, ICM, Hôpital de la Pitié Salpêtrière, Paris, France and ⁶King's College London School of Medicine, Gene Expression and Therapy Group, Department of Medical and Molecular Genetics, Guy's Hospital, London, UK

Received November 02, 2015; Revised July 25, 2016; Accepted July 29, 2016

ABSTRACT

A short abnormal polyalanine expansion in the polyadenylate-binding protein nuclear-1 (PABPN1) protein causes oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD). Mutated PABPN1 proteins accumulate as insoluble intranuclear aggregates in muscles of OPMD patients. While the roles of PABPN1 in nuclear polyadenylation and regulation of alternative poly(A) site choice have been established, the molecular mechanisms which trigger pathological defects in OPMD and the role of aggregates remain to be determined. Using exon array, for the first time we have identified several splicing defects in OPMD. In particular, we have demonstrated a defect in the splicing regulation of the muscle-specific Troponin T3 (*TNNT3*) mutually exclusive exons 16 and 17 in OPMD samples compared to controls. This splicing defect is directly linked to the SC35 (*SRSF2*) splicing factor and to the presence of nuclear aggregates. As reported here, PABPN1 aggregates are able to trap *TNNT3* pre-mRNA, driving it outside nuclear speckles, leading to an altered SC35-mediated splicing. This results in a decreased calcium sensitivity of muscle fibers, which could in turn play a role in muscle pathology. We thus report a novel mechanism of

alternative splicing deregulation that may play a role in various other diseases with nuclear inclusions or foci containing an RNA binding protein.

INTRODUCTION

The poly(A) RNA binding protein, polyadenylate-binding protein nuclear 1 (PABPN1), is a ubiquitous protein, that binds virtually all mRNAs and plays key roles in post-transcriptional processing of RNA (1). PABPN1 activates poly(A) polymerase (PAP) and controls poly(A) tail length on RNA transcripts (2–4). In addition, PABPN1 regulates the use of alternative polyadenylation (APA) sites (5,6), which in turn controls mRNA levels and stability. PABPN1 is also involved in the regulation of the processing of long non-coding RNAs (lncRNAs) (7) and nuclear surveillance, leading to hyperadenylation and decay of RNA (8). It has recently been shown that PABPN1 regulates human telomerase 3' end RNA maturation (9). A short (1–8) and meiotically stable GCN trinucleotide repeat expansion in the coding region of the *PABPN1* gene causes oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) (10–12), a late and progressive autosomal dominant inherited neuromuscular disorder. OPMD is characterised by progressive eyelid drooping, swallowing difficulties (as pharyngeal and cricopharyngeal muscles are most affected) and proximal limb weakness (13).

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 1 42 16 57 15; Fax: +33 1 42 16 57 00; Email: capucine.trollet@upmc.fr
Present address: Capucine Trollet, Myology Research Center, UMRS 974 UPMC – INSERM – FRE 3617 CNRS – AIM, 47, bld de l'hôpital – G.H. Pitié-Salpêtrière – Bâtiment Babinski, 75651 Paris cedex 13, France.

OPMD belongs to the group of triplet expansion diseases (14,15); the translation of the *PABPN1* allele containing expanded repeats (expPABPN1) leads to a pathogenic polyalanine tract at the N-terminal of the protein and the formation of PABPN1 intranuclear aggregates in muscle fibers (16). These aggregates in addition to PABPN1 contain several proteins such as ubiquitin, proteasome subunits, heat-shock proteins, splicing factors, poly(A) polymerase (PAP) as well as poly(A) RNA (17–19). However these insoluble aggregates also exclude cleavage and polyadenylation specific factor subunits (CPSF), splicing factors such as SC35 and the cytoplasmic poly(A) binding protein (PABPC) (19). The expanded polyalanine tract in PABPN1 is thought to induce protein misfolding and consequently the formation of aggregates, which are targeted to the ubiquitin-proteasome degradation pathway (20,21). Although the presence of aggregates in skeletal muscles is a pathological hallmark of OPMD, their exact role in the disease remains controversial. Several studies have suggested a pathological function for nuclear aggregates e.g. sequestering essential cellular components including PABPN1 itself (17–18,22). This is supported by the fact that a higher frequency of nuclear aggregates is observed in severe homozygous patients (23) and muscle function is improved when the number of aggregates is reduced (24–26). In contrast, other studies have suggested that the aggregates may just be the result of a cellular defence mechanism (27) and not the direct cause of the disease with the soluble form of the mutated PABPN1 being itself pathogenic (28,29). Apoptosis and deregulation of the ubiquitin-proteasome system have also been proposed as downstream events triggered by the aggregates (20,30). Recently we demonstrated a global deregulation of nuclear-encoded mitochondrial RNA in OPMD patients and animal models, implicating mRNA poly(A) tail regulation via the recruitment of Smaug RNA binding protein as an upstream event (31).

Over the last years, the following observations have suggested that splicing defects may occur in OPMD: (i) the identification of splicing factors in aggregates (17–18,22); (ii) the fact that, using literature-aided analyses, the terms ‘RNA splicing’ and ‘alternative splicing’ were biomedical concepts highly associated with human OPMD-deregulated genes (20); (iii) two recent studies have suggested a role for PABPN1 in splicing regulation (32,33). However, no such mechanism has yet been described. Alternative splicing (AS) produces a highly dynamic proteome, whose diversity is regulated in a developmental and tissue-specific manner (34). More than 90% of human protein-encoding genes create multiple mRNA isoforms by AS. This post-transcriptional mechanism generates diversity and is tightly regulated, with both *cis*- and *trans*-acting elements. Defects in RNA splicing processes, such as mutations in *cis*-acting splicing elements or in *trans*-acting splicing factors, have emerged as a common disease-causing mechanism (35,36). Skeletal muscle is a highly plastic tissue, adapting its structure and metabolism in response to diverse conditions such as contractile activity, mechanical overload and nutrients. Skeletal muscle is one of the tissues with the highest number of alternative splicing events, highlighting a high degree of complexity (37–39). In particular, alterations of alternative

splicing events have been largely described in several muscular dystrophies (40,41).

In this work, we provide the first proof that splicing defects occur in OPMD and describe a novel mechanism involved in at least one of these defects and how this defect is related to muscle function. Interestingly, we demonstrate that in OPMD the mutually exclusive exons of *TNNT3* mRNA are misspliced with an imbalanced ratio of the two resulting isoforms. Using a minigene construct, we show that SC35 regulates the splicing of these mutually exclusive exons. We further demonstrated that PABPN1 aggregates are able to sequester a pre-mRNA. Taking these results together, we propose that this splicing defect results from the delocalization of the mRNA, trapped in pathological aggregates, and subsequently misplaced outside SC35-nuclear speckles.

MATERIALS AND METHODS

Patients

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

RNA isolation and Affymetrix exon array data processing

Total RNA was extracted from snap frozen skeletal muscle biopsies using Trizol (Invitrogen) according to the manufacturer’s instructions. RNA samples were quantified using a ND-1000 NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies) and purity/integrity were assessed using disposable RNA chips (Agilent RNA 6000 Nano LabChip kit) and an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbrunn, Germany). The average RIN value of total RNAs was 7.16 (6.1–7.8). Each RNA ($n = 8$; four controls and four OPMD) was analyzed individually. Affymetrix Human Exon 1.0 ST arrays were hybridized by GenoSplice technology (www.genosplice.com) according to the Ambion WT protocol (Life technologies, France) and Affymetrix (Santa Clara, CA, USA) labelling and hybridization recommendations. Raw data were controlled with the Expression console (Affymetrix). Affymetrix Human Exon 1.0 ST Array dataset analysis and visualization were made using EASANA[®] (GenoSplice technology), which is based on the GenoSplice’s FAST DB[®] annotations (42). Exon Array data were normalized using quantile normalization. Background corrections were made with antigenomic probes and probes were selected as described previously (43,44). Only probes targeting exons annotated from FAST DB[®] transcripts were selected to focus on well-annotated genes whose

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

| Patient | Age | Gender | Genotype |
|---------|-----|--------|---------------|
| OPMD | 54 | M | (GCN)13/Ala13 |
| OPMD | 61 | F | (GCN)14/Ala14 |
| OPMD | 81 | M | (GCN)12/Ala12 |
| OPMD | 83 | M | (GCN)13/Ala13 |
| CTRL | 44 | F | (GCN)10/Ala10 |
| CTRL | 61 | M | (GCN)10/Ala10 |
| CTRL | 88 | M | (GCN)10/Ala10 |
| CTRL | 91 | M | (GCN)10/Ala10 |

mRNA sequences are in public databases (42,45). Bad-quality selected probes (e.g. probes labelled by Affymetrix as 'cross-hybridizing') and probes whose intensity signal was too low compared to antigenomic background probes with the same GC content were removed from the analysis. Only probes where the detection above background was with a P value ≤ 0.05 in at least half of the arrays were considered for statistical analysis (43,44). Only genes expressed in at least one compared condition were analyzed. To be considered expressed, the DABG P -value had to be ≤ 0.05 for at least half of the gene probes. We performed an unpaired Student's t -test to compare gene intensities in the different biological replicates. Genes were considered to be significantly regulated when the fold-change was ≥ 1.5 and uncorrected P -value ≤ 0.05 . Statistical analyses were also performed using the Student's unpaired t -test on the splicing index to analyze the Exon Array data as described previously (43,44). The splicing index corresponds to a comparison of gene-normalized exon intensity values between the two analyzed experimental conditions. Results were considered statistically significant for uncorrected P -values ≤ 0.05 and fold-changes ≥ 2.0 .

To filter and classify exons predicted to be differentially included, manual inspection was performed after uploading the Exon Array data into the EASANA[®] visualization module, which is based on the FAST DB[®] Client Edition annotations. By computational comparison of publicly available mRNA sequences with genomic sequences, alternative exons were annotated in FAST DB[®] as alternative first exons, alternative terminal exons, cassette exons, mutually exclusive exons, alternative 5' donor sites, alternative 3' acceptor sites, intron retention and exonic internal deletion (Supplementary Figure S1 and Table S1).

RT-PCR and Real-time qRT-PCR

RNA (50–250 ng for muscle biopsies, 1–3 μ g for cell pellets) was reverse transcribed using M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The splicing of *TNNT3* mRNA was observed with 1 μ l of cDNA for PCR using Reddy mix polymerase (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions, and primers located within *TNNT3* exon 15, *TNNT3* exon 16 and *TNNT3* exon 17 (sequences information listed in Supplementary Table S2). The reaction mixture was heated to 94°C for 5 min and followed by 35 PCR cycles: 15 s at 94°C, 15 s at 55°C and 15 s at 72°C followed by a last elongation step at 72°C for 7 min. PCR products from alternatively spliced *TNNT3* mRNAs, which are 108 and 131 bp, respec-

tively, were resolved on 5% non-denaturing polyacrylamide ethidium bromide stained gels.

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

The sequences of primers used for RT-PCR and for real-time qRT-PCR are listed in Supplementary Table S2.

Plasmid construction

The human *TNNT3* minigene (3881 bp) was prepared by amplifying the human *TNNT3* genomic region between exon 15 and exon 18 with the Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) following the manufacturer's instruction and using the primers FWD: 5'-AAAACCTTAAGGGACAAGGCCAAGGAGCTCT-3' containing the *Afl*II restriction site (in bold) and REV: 5'-ACCGGAATTCTGAAGGGGGTTCTGCAGCTTT-3' containing the *Eco*RI site (in bold). The PCR product was digested by *Afl*II and *Eco*RI and inserted into the pCDNA3.1+ (Invitrogen) at the corresponding restriction sites.

The murine *Tnnt3* minigene (3476 bp) was prepared using the same protocol by amplifying the murine *Tnnt3* genomic region between exon 15 and 18 using the following primers fwd: 5'-AAAACCTTAAGGGACAAGGCCAAGGAACTCTG-3' and rev: 5' ACCGGAATTCCGGGAGTCTGATAACTTTATTCT3'.

Cell culture and transfection

Human embryonic kidney HEK293T cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% foetal calf serum (Life Technologies) and 50 μ g/ml gentamicin (Life Technologies) in a 5% CO₂ incubator at 37°C. Cells were grown in six-well plates and were transfected at 80% confluence with 5.2 μ g of DNA constructs using PEI in 150 mM NaCl. Forty eight hours after transfection, total RNA was immediately extracted using Trizol (Invitrogen).

Human myoblasts LHCNM2 (46) were grown in KMEM 199 Medium (Life Technologies) and DMEM (Life Technologies) in a 1:4 ratio supplemented with 20% foetal calf serum (Life Technologies), 5 ng/ml human epithelial growth factor (Life Technologies), 0.5 ng/ml bFGF, 0.2 μ M dexamethasone (Sigma-Aldrich), 50 μ g/ml fetuin (Life Technologies) and 5 μ g/ml insulin (Life Technologies) in a 5% CO₂ incubator at 37°C. Differentiation was induced at confluence by replacing the growth medium with DMEM supplemented with 50 μ g/ml of gentamicin. Transfection of human myoblasts were performed with Fugene HD (Promega) following the manufacturer's instructions and 48 h after transfection total RNA was immediately extracted using Trizol (Invitrogen).

Primary H2KB IM2 mouse myoblasts (named 'control' hereafter) were conditionally immortalized with a temperature-sensitive SV40 large T-antigen (tsA58) transgene and derived from the ImmortoMouse. Mutated-PABPN1 (H2KB-D7e named 'Ala17' hereafter) and wild-type-PABPN1 (H2KB-WTa named 'Ala10') stable cell lines were derived from IM2 cells line by transfection with a plasmid expressing expanded-PABPN1 or wild-type-PABPN1 respectively under the control of the human desmin locus control region and promoter to ensure myotube-specific expression of the human PABPN1 transgene (47). Cells were cultivated on matrigel coated support (Corning) in DMEM, supplemented with 20% foetal bovine serum (Invitrogen), 0.5% chicken embryo extract (Seralab), 100 U/ml penicillin-streptomycin (Thermo Scientific), and 20 U/ml interferon- γ (Millipore) at 33°C in a humidified 5% CO₂ air atmosphere. For Ala17 and Ala10 cell lines, 500 μ g/ml of G418 (Life Technologies) was added to the media. Differentiation was induced when cells were fully confluent (90–100%) by changing medium to DMEM, 10% horse serum and 100 U/ml penicillin-streptomycin at 37°C in a humidified 5% CO₂ air atmosphere.

siRNA transfection was performed in HEK293T cells using PEI in 150 mM NaCl with 100 pmol of siRNA with 2 μ g of plasmid in a six-well plate. All siRNAs were synthesized by Eurogentec. The control siRNA was against Renilla luciferase (PGL3) from Eurogentec. RNA and proteins were collected 48 h after transfection. For H2KB cells, siRNA transfection was performed using oligofectamine (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions in a 12-well plate with a final concentration of 60 pmol of siRNA. siRNA treatment in H2KB cells was performed twice at 48 h interval before switching to differentiation medium. RNA and protein extractions were performed 5 days later.

Mice

A17.1 and A10.1 transgenic mice have been previously described (25,48). Male A17.1, A10.1 mice and wild-type FvB (WT) controls were generated by crossing the heterozygous carrier strain A17.1 and A10.1 obtained from Rubinsztein's group (25) with FvB mice. The mice were genotyped by PCR three to four weeks after birth. Wild-type FvB, A10.1 and A17.1 mice were housed in minimal disease facilities (Royal Holloway, University of London) with food and water *ad libitum*.

Isometric tension determination

T/pCa relationships were established as previously described (49).

Skinning protocol. Muscles were chemically skinned by overnight exposure at 4°C to a skinning solution containing 10 mM MOPS, 170 mM potassium propionate, 2.5 mM magnesium acetate, 5 mM K₂ EGTA, 2.5 mM ATP (49). This procedure permeabilizes the sarcolemmal and the transverse tubular membranes and allows the application of activating solutions of various calcium and strontium concentrations (pCa and pSr, with pCa = $-\log[\text{Ca}^{2+}]$ and pSr = $-\log[\text{Sr}^{2+}]$) directly to the contractile proteins. The skinned biopsies were stored at -20°C in a storage solution (glycerol/skinning solution, 50/50, v/v) until analysis.

Solutions. The composition of all solutions was calculated with the Fabiato computer program (50). Different solutions were used in the experiments: a washing solution (10 mM MOPS, 185 mM potassium propionate, 2.5 mM magnesium acetate); a relaxing solution identical to the skinning solution; pCa and pSr activating solutions corresponding to washing solution but with varying concentrations of free Ca²⁺ or Sr²⁺ from CaCO₃ or SrCl₂, respectively, buffered with EGTA and added in proportions to obtain the different pCa values (7.0–4.2) or pSr values (5.0 and 3.4). ATP was added to each solution to a final concentration of 2.5 mM. At the beginning of the experiment, each fiber was bathed for 20 min in 2% Brij58 in relaxing solution, in order to irreversibly eliminate the ability of the sarcoplasmic reticulum of skinned muscles to sequester and release Ca²⁺.

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

At the beginning of each experiment, the fibre was activated with the pSr 5.0 solution, followed by the pSr 3.4 solution, to verify that the tested fibre was slow and not fast. After bathing in the washing solution, the fiber was activated at a level P with various pCa solutions (from 7.0 to 4.8, with a step equal to 0.2 pCa units). Each steady state submaximal P tension was followed immediately by a maximum contraction P_o ensured by pCa 4.2 solution, a calcium concentration that will saturate all troponin C sites. The P tensions were expressed as a percentage of the maximal P_o tension and reported as Tension/pCa (T/pCa) relationships. Finally, the fibre was relaxed in the relaxing solution. If force declined during a sustained contraction, or decreased by more than 20% during the whole experiment, or if T/pCa was not completely achieved, the fibres were rejected from the analysis. Just after force measurements, each fibre was resuspended in 10 μ l of Laemmli buffer, and stored at -20°C until further analysis.

The following parameters were determined from T/pCa curves: the pCa₅₀ value, corresponding to 50% of maximal Ca²⁺ tension responses, which characterize the affinity of

the contractile apparatus for Ca^{2+} ; the threshold for activation by Ca^{2+} (pCa threshold) as an indicator of the calcium sensitivity of the contractile system; and the steepness of the T/pCa reflecting the cooperativity between the different regulatory proteins within the thin filament. The steepness of the T/pCa was determined by the Hill coefficients n_H , calculated according to the following equation: $P/P_0 = ([\text{Ca}^{2+}]/K)^{n_H}/[1 + ([\text{Ca}^{2+}]/K)^{n_H}]$, where P/P_0 is the normalized tension and K is the apparent dissociation constant ($\text{p}K = -\log K = \text{pCa}_{50}$). All parameters were established independently for each fibre. Data are presented as means \pm SEM. Differences between means are considered significant when $P < 0.05$, according to Student's *t*-test.

Immunodetection of PABPN1 inclusions on muscle sections

Immunostaining of PABPN1 nuclear aggregates was performed as previously described (51). Briefly, muscle sections (5 or 10 μm) were fixed in 100% cold acetone and pre-incubated in 1 M Potassium Chloride (KCl) solution for 1 h to remove any soluble proteins, before incubation with rabbit polyclonal anti-PABPN1 (1/100, Epitomics) and anti-dystrophin antibody (1/10, NCL-Dys1, Novocastra). Sections were further incubated with respective fluorescent secondary antibodies (Life Technologies) and stained with Hoechst (Sigma-Aldrich) to visualize nuclei. The percentage of muscle fibre nuclei containing PABPN1 aggregates was determined by counting the number of nuclei containing any PABPN1 staining compared to the total number of myonuclei on the section.

PABPN1/SC35 immunostaining

H2KB cells were cultivated on Ibidi 35 mm Dishes (Biovalley). Immunofluorescence was performed at 5 days of differentiation. Cells were washed once with PBS and fixed for 10 min with 4% paraformaldehyde–PBS. Cells were washed with PBS–glycine 0.1 M for 15 min and incubated in 0.2% Triton X-100 PBS, 3% BSA and 5% goat serum for 30 min. Detection of immunocomplexes was performed using anti-PABPN1 (1/100, Epitomics) and anti-SC35 (1/1000, Sigma) for 1 h. Cells were washed 3 times in 0.1% Triton–PBS and incubated with goat anti-mouse and goat anti-rabbit secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 555 respectively (Life Technologies).

Fluorescence in situ hybridization

RNA fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was performed using probes synthesized by PCR with specific primers (one probe for exon 18 and three probes for intron 15, see details in Supplementary Table S2) using the Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) with a ratio of 1/6 of DIG-dUTP/dTTP (Roche) and murine *Tnnt3* expressing vector as template. PCR products were loaded on agarose gels and purified using the Nucleospin and PCR clean-up kit (Macherey-Nagel).

HEK293T cells were transfected with the murine *Tnnt3* minigene expressing vector or with pCDNA3.1 using PEI (2.5 μg of DNA constructs using PEI in 150 mM NaCl). Forty eight hours after transfection, cells were fixed

for 10 min in 4% PFA and rinsed with PBS. Cells were then incubated with PBS 1% triton X-100 PBS for 30 min and rinsed three times with PBS. The probe was denatured at 95°C for 10 min and put directly on ice. Cells were then incubated with hybridization buffer (SSC 2 \times , 40% formamide, 0.2% BSA, 60 ng of yeast RNA) together with 60 ng of *Tnnt3* probe at 60°C for 2 h. Then cells were washed with 0.1% Tween 20/PBS buffer for 30 min at 65°C and three times with PBS. This was followed by an incubation in 2% SVF PBS for 30 min and with anti-digoxigenin-Rhodamine Fab Fragments (Roche diagnostics) for 1 h in the dark. Cells were washed three times in PBS and stained with Hoescht, (Sigma Aldrich) to visualize nuclei. All experiments were performed in RNase free conditions.

H2KB cells (Ala17 and control) were differentiated during 5 days on Ibidi 35mm Dish (Biovalley) and fixed for 10 min in 4% PFA rinsed with PBS. Cells were incubated with PBS 1% triton X-100 for 30 min and rinsed three times with PBS. Cells were incubated with pre-hybridization buffer (SSC 2 \times , 40% formamide, 0.2% BSA) for 30 min. The probe was denatured at 95°C for 10 min and put immediately on ice. Cells were then incubated with hybridization buffer (SSC 2 \times , 40% formamide, 0.2% BSA, 60 ng of yeast RNA) together with 60 ng of *TNNT3* probe at 60°C for 2 h. The cells were then washed with prehybridization buffer for 30 min at 65°C and three times with PBS 0.1% Tween 20 and three times with PBS.

This was followed by immunofluorescence staining for PABPN1. Briefly, cells were incubated in PBS 2% SVF during 30 min and with PABPN1 primary antibody (Epitomics) and SC35 antibody (Sigma) in the same buffer for 2 h at room temperature. Cell were washed three times with PBS and incubated with the secondary antibodies Alexa Fluor 488 and Alexa fluor 647 goat anti-mouse (Life Technology) and anti-digoxigenin-Rhodamine Fab Fragments (Roche diagnostics) for 1 h in the dark. Cells were stained with Hoescht, (Sigma-Aldrich) to visualize nuclei. All experiments were performed in RNase free conditions.

Western blotting

Proteins were extracted by sonicating cells in RIPA buffer 0.15 M NaCl, 0.1% SDS, 50 mM Tris (pH 8), 2 mM EDTA and 10% Triton-X-100 with protease inhibitor cocktail (Complete, Roche Diagnostics). Similar quantities of proteins were separated on 4–12% Bis–Tris gels (Invitrogen) and transferred onto a nitrocellulose membrane for 1 h at constant 30 V at 4°C. Membranes were blocked by incubation in 5% milk or BSA in 0.1 M TBS, 0.1% Tween-20 for 1 h at room temperature under agitation. Membranes were stained with primary antibodies directed against PABPN1 (1/1000, Epitomics), SC35 (1/1000, Millipore), SRP30a (1/1000, Santa-Cruz), MBNL1 (1/1000, MB1a antibody, gift from Glenn Morris), Flag-HRP (1/1000, Sigma) and GAPDH–HRP (1/1000, Abcam). Membranes were then incubated with appropriate secondary antibodies conjugated to HRP (except for Flag-HRP and GAPDH-HRP) and the G:Box system (Syngene) was used to detect the signals from the membranes.

Image acquisition and analysis

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

Statistical analysis

All data are presented as mean values \pm standard error of the mean (SEM) (cohort size stated per experiment). All statistical analyses were performed using either the Student's *t*-test, or the ANOVA one-way analysis of variance followed by the Bonferroni post-test, using GraphPad Prism (version 4.0b; GraphPad Software, San Diego California, USA). A difference was considered to be significant at $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) or $P < 0.001$ (***).

RESULTS

TNNT3 exon 16 is downregulated in OPMD

To identify potential splicing defects in OPMD, we performed a genome-wide transcriptomic analysis at the exon level on RNA extracted from skeletal muscle biopsies of OPMD patients (Table 1). For this study, we used sternocleidomastoid muscles as a pre-symptomatic muscle, that show both a typical clinical phenotype and a significant amount of nuclear aggregates compared to age-matched control subjects (Figure 1A). Forty six missplicing events were found in 39 distinct genes, including 12 cassette exon defects (Supplementary Table S1 and Figure S1A). Among them the most significantly deregulated mRNA (highest splicing fold change index) encodes a muscle-specific protein, the human Troponin T type 3 (TNNT3) (Table 2). The *TNNT3* transcript contains 18 exons; its pre-mRNA is extensively spliced with two mutually exclusive exons, 16 (α) and 17 (β), included at the 3' end (52–54) (Figure 1B). Exon 16 was found to be downregulated in OPMD samples (Supplementary Figure S1A), leading to an imbalanced ratio of these mutually exclusive exons. This was confirmed by RT-PCR on sternocleidomastoid and quadriceps muscle biopsies from OPMD patients, with a strong decrease in the level of the exon 16 isoform expression (Figure 1C and D). Splicing defects of *RECK* exon 8 (Reversion-Inducing-Cysteine-Rich Protein With Kazal Motifs) and *ZCCHC11* exon 8 (Zinc Finger CCHC Domain-Containing Protein 11 or TUT4)—which were respectively hits numbers 2 and 3 on the exon array analysis (Table 2 and Supplementary Figure S1A)—were also confirmed by qRT-PCR on sternocleidomastoid muscle biopsies (Supplementary Figure S1B). This is the first time that misregulated alternative splicing events have been described in OPMD.

TNNT3 splicing defect is linked to the presence of aggregates

We checked the splicing pattern of *Tnnt3* in a murine cell model of OPMD, namely the H2KB-D7e cells (47). Primary

H2KB-IM2 cells are conditionally immortalized mouse myoblasts derived from the ImmortoMouse (55) and H2KB-D7e are cells stably derived from the H2KB-IM2 cell line by transduction with an expanded Flag-tagged PABPN1 construct under the control of the human desmin locus control region and promoter. This ensures that the human exp-PABPN1 transgene will only be expressed in differentiation conditions (Supplementary Figure S2A). For clarity, the H2KB-IM2 and -D7e will be called hereafter 'control' and 'Ala17' muscle cells respectively. In differentiation conditions, these Ala17 cells contain a large number of nuclear aggregates present in more than 50% of the nuclei ((47) and Figure 2E). In control cells, the *Tnnt3* exon 16 isoform is absent at day 1, but progressively increases during differentiation. Interestingly, in Ala17 cells at both 3 and 5 days of differentiation, we observed the same splicing defect as in human OPMD samples with a strong decrease in the level of the *Tnnt3* exon 16 isoform compared to control cells (Figure 2A and B). Since the expression of the *Tnnt3* exon 16 isoform increases during differentiation we verified that the splicing defect in Ala17 cells was not due to a delay in differentiation. Light microscopy visualization showed comparable fused myoblasts in control and OPMD cell lines at 5 days of differentiation (Supplementary Figure S2B). In addition, myogenin and myosin expression levels were equivalent in both Ala17 and control cells during the time course of differentiation (days 1, 3 and 5). We also checked the alternative splicing of *Bin1* exon 10, which is known to be regulated during muscle differentiation (56) and the splicing pattern was similar in both conditions, further confirming that the differentiation kinetics were similar in control and Ala17 cells (Supplementary Figure S2C). To understand the link between PABPN1 nuclear aggregates and the splicing defect, we reduced PABPN1 expression in differentiated Ala17 cells using RNA interference. The reduction of PABPN1 expression by 50% at mRNA and protein level (Figure 2C-D) drastically reduced the percentage of nuclei containing nuclear aggregates from 60% to 10% (Figure 2E). This led to the rescue of the splicing defect in differentiated siRNA-treated Ala17 cells (Figure 2F). Several hypotheses have been made regarding the role of PABPN1 aggregates in the pathogenesis of the disease, one of them being the sequestration of PABPN1 itself, leading to a loss of function. Transfection of siRNA against PABPN1 in control cells—to mimic a loss of function—did not modify the level of exon 16 isoform (Figure 2F). Neither did the addition of a wild-type functional PABPN1 expressing vector in Ala17 cells (data not shown), suggesting that *TNNT3* splicing defect is not linked to the level of available PABPN1 itself. To further reinforce the crucial role of the aggregate we checked the splicing defect in H2KB-WTa (Ala10 cells), overexpressing wild-type Flag-tagged PABPN1 at the same level as in Ala17 cells and containing aggregates in differentiation ((47) and Supplementary Figure S3A-B); the splicing defect was confirmed in this differentiated cell line as well (Supplementary Figure S3C and D). Together these results strongly suggest a direct link between the presence of nuclear aggregates and the splicing misregulation of *TNNT3*.

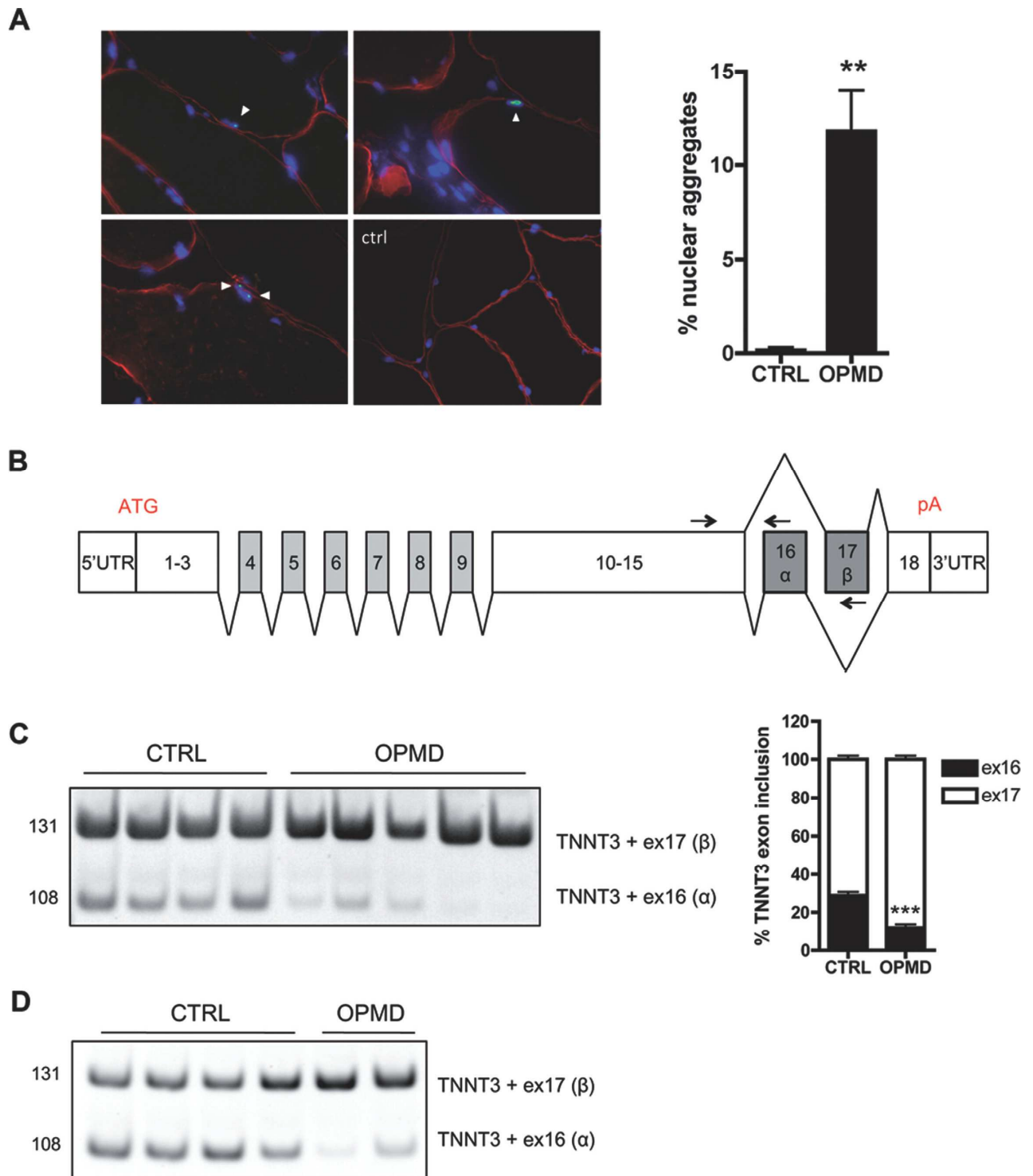


Figure 1. Splicing of *TNNT3* mutually exclusive exons 16 and 17 is deregulated in oculopharyngeal muscular dystrophy. (A) Left: PABPN1 staining following KCl treatment revealed intranuclear aggregates in OPMD muscle biopsies (red: dystrophin, green: PABPN1, blue: dapi). Aggregates are indicated with an arrow. On the bottom right panel, is presented a control biopsy - no aggregates are present. Scale bar = 50 μ m. Right: Quantification of nuclear aggregates showed 6.7–16.7% PABPN1 aggregates (mean 12%) in myonuclei from OPMD patients. ** indicates $P < 0.01$. (B) Schematic representation of the exon structure of *TNNT3* pre-mRNA. pA: polyadenylation site. Exons 16 and 17 are highlighted in grey. The two mutually exclusive exons are both 41 bp long encoding each a short 14 amino acid peptide in the C-terminal of the protein. Arrows on exons 15, 16 and 17 indicate the forward (TNNT3-ex15-FWD) and two reverse (TNNT3-ex16-REV-108 and TNNT3-ex17-REV-131) primers used to amplify and discriminate by PCR the two *TNNT3* transcript isoforms. (C and D) *TNNT3* exon 16 is downregulated in OPMD skeletal muscle biopsies with (C). Left: RT-PCR analysis of endogenous *TNNT3* exon 16 and 17 isoforms from human sternocleidomastoid skeletal muscle biopsies of normal adult individuals (CTRL; $n = 4$) and OPMD patients (OPMD; $n = 5$). Right: quantification of respective exon 16 and 17 inclusions in *TNNT3* mRNA. ***indicates $P < 0.001$ and (D) RT-PCR analysis of endogenous *TNNT3* exon 16 and 17 isoforms from human quadriceps skeletal muscle biopsies of normal adult individuals (CTRL; $n = 4$) and OPMD patients (OPMD; $n = 2$).

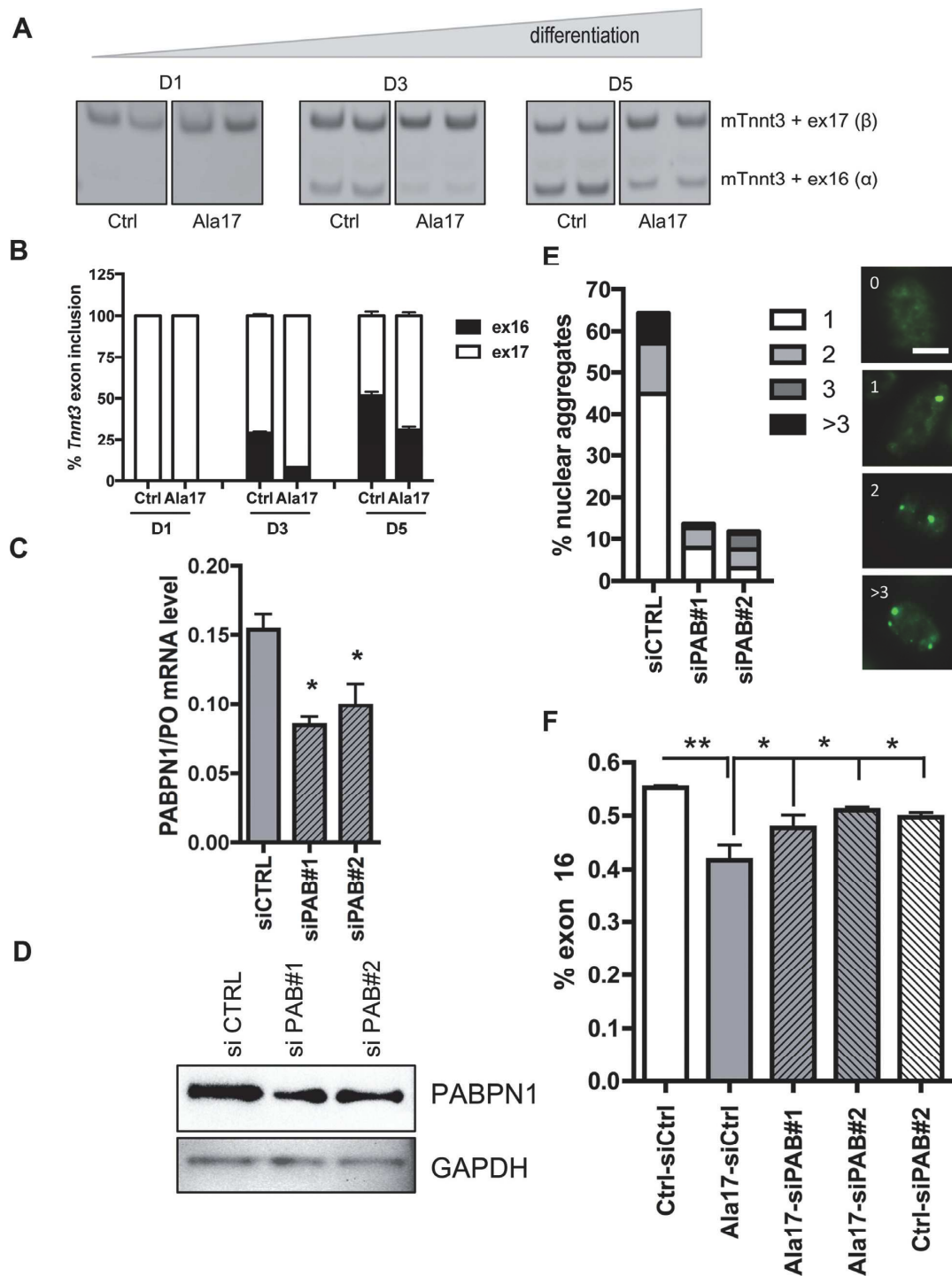


Figure 2. *Tnnt3* splicing defect is rescued by reducing the amount of aggregates in murine myoblasts. (A) *Tnnt3* exon 16 level is downregulated in OPMD murine myoblasts. RT-PCR analysis of endogenous *Tnnt3* exon 16 and 17 isoforms from CTRL and OPMD (Ala17) murine myoblasts after 1, 3 and 5 days of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

Table 2. Splicing defects are present in oculopharyngeal muscular dystrophy including alteration of *TNNT3* alternative splicing of exon 16 and 17. Exon array revealed several splicing defects, including 12 cassette exon events. *TNNT3* was the first hit on the array with the highest splicing fold change index. A manual inspection allowed the filtering and classification of exons predicted to be differentially included.

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

SC35 splicing factor regulates *TNNT3* mutually exclusive exons

To determine which splicing factor is involved in the regulation of *TNNT3* mutually exclusive exons, a minigene containing exons 16 and 17 of human *TNNT3* bordered by exon 15, 18 and their intronic regions (Figure 3A) was cloned from human genomic DNA in a plasmid expression vector. This minigene construct was co-transfected into HEK293T cells—which do not express *TNNT3*—together with various vectors expressing well-characterized splicing regulatory factors. These included members of the hnRNP, SR, MBNL and CELF families and were selected using prediction software (SpliceAid2 and ESEFinder publically available at http://193.206.120.249/splicing_tissue.html and <http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home> respectively) (57,58) (Table 3). Fifteen selected splicing factors were tested by co-transfection with the *TNNT3* minigene expression vector. GFP was used to monitor expression and transfection efficiency (Supplementary Figure S4A), and we further confirmed by western-blotting the level of expression in HEK293T cells for several of them (Figure 3D and Supplementary Figure S4B). Of the 15 splicing factors, only the co-expression of SC35 (also called SRSF2) or hnRNPK together with the *TNNT3* minigene expression vector induced a significant increase in exon 16 inclusion (Figure 3B). Using the same approach, we also confirmed that PABPN1 overexpression itself did not modify the level of exon 16 (Supplementary Figure S4C and D). As the splicing defect is present in both human and murine OPMD samples (Figures 1C and D and 2A), the same approach was applied using a murine *Tnnt3* exons 15–18 minigene expression vector. In this situation, only the co-transfection of the SC35 expression vector significantly modified the inclusion of exon 16 (Figure 3C). Finally in human myoblasts, only the transfection of the SC35 expression vector led to the upregulation of the exon 16 isoform when co-transfected with the human *TNNT3* minigene expression vector (Figure 3E), confirming that SC35 is the most probable splicing factor candidate for the regulation of exon 16 inclusion. SC35 is also a well-known constituent of nuclear speckles (59) involved in pre-mRNA splicing (60). The transfection of cells with SC35 results in an upregulation of the exon 16 isoform, which is downregulated in OPMD patients or

cells. Although the level of SC35 itself is not downregulated in OPMD samples when compared to control samples (Figure 3F), downregulation of the exon 16 isoform can be mimicked by depletion of SC35 expression level using RNA interference in HEK293T cells transfected with the *TNNT3* minigene (Figure 3G-I). In contrast, the downregulation of SRP30a (ASF/SF2, a splicing factor related to SC35 (61)) or MBNL1 (which regulates the splicing of *TNNT3* fetal exon (62,63)) by RNA interference did not recapitulate this splicing defect found in OPMD or in SC35-knockdown cells (Supplementary Figure S4E and F). These results demonstrate that the splicing regulation of *TNNT3* mutually exclusive last exons is strongly dependent on SC35 and suggest that in OPMD *TNNT3* pre-mRNA and SC35 splicing factor are somehow dissociated.

TNNT3 pre-mRNA is trapped in nuclear aggregates

Aggregates are formed by the accumulation of misfolded PABPN1 in muscle nuclei. Interestingly, it is already known that these PABPN1 aggregates are delocalized from SC35-nuclear speckles (19,47,64). By immunostaining we confirmed the delocalization of PABPN1 aggregates and SC35 nuclear splicing domains in differentiated Ala17 OPMD cells as opposed to the co-localization of PABPN1 and SC35 observed in control cells (Figure 4A and Supplementary Figure S5A). A recent study proposed that growing PABPN1 aggregates gradually deplete SC35-nuclear speckles of poly(A) RNA/PABPN1 complexes, thus interfering with the normal trafficking and post-transcriptional processing of poly(A) mRNA in speckles (64). We took advantage of the Ala17 cells where *Tnnt3* splicing defect and nuclear aggregates are both present and we analysed the localization of *Tnnt3* pre-mRNA in these cells, by performing fluorescent in situ hybridization (FISH). Using probes targeting specifically exon 18 (ex18) or intron 15 (int15) of *Tnnt3* pre-mRNA (Supplementary Figure S6), we observed a co-localization of *Tnnt3* pre-mRNA with PABPN1 in nuclear aggregates (Figure 4B and C and Supplementary Figure S5B). Hence, the pre-mRNA of *Tnnt3* is physically delocalized from SC35-nuclear speckles. Therefore, we speculated that the splicing defect is a consequence of the spatial dissociation of SC35 and *Tnnt3* pre-mRNA, the latter being trapped in PABPN1 aggregates.

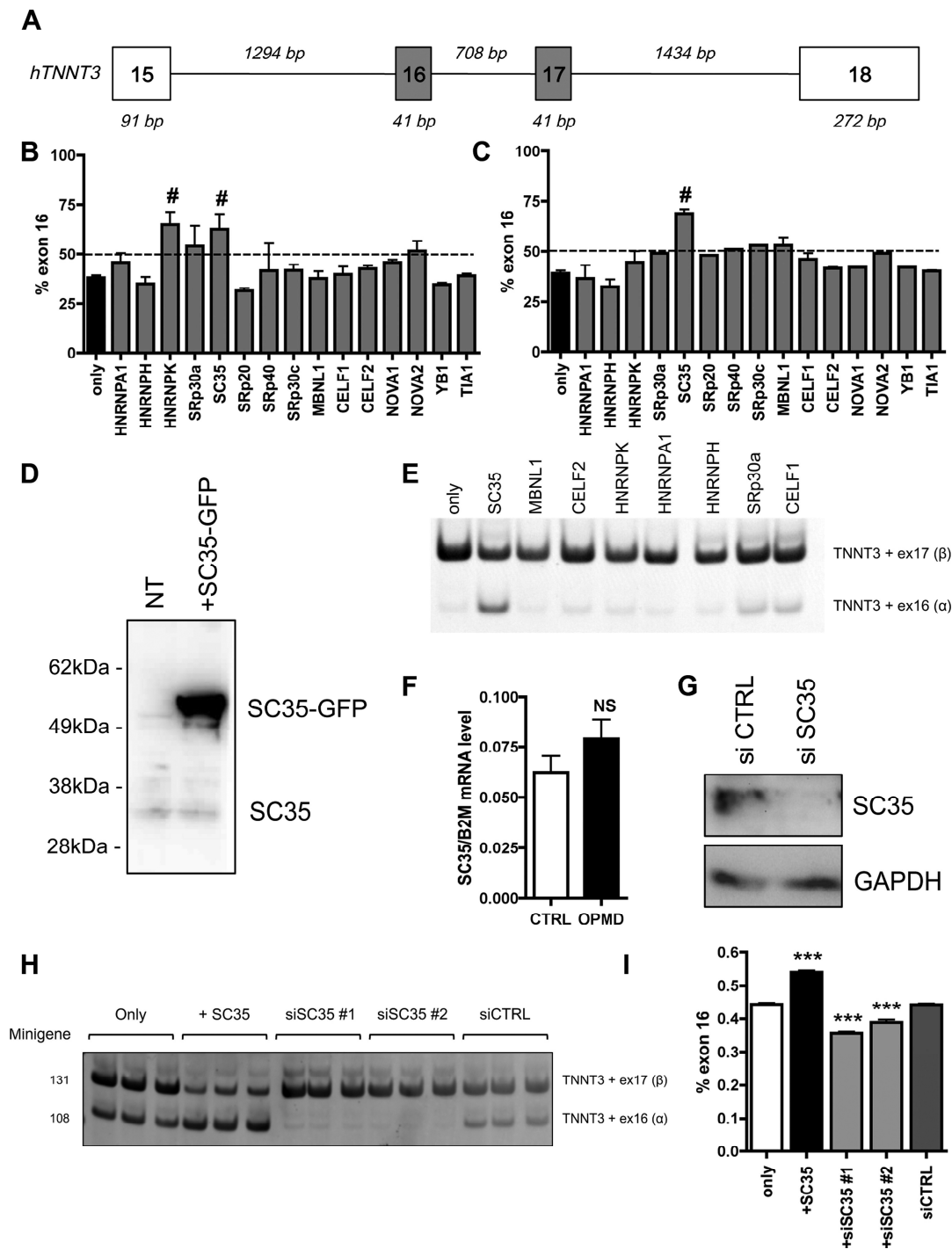


Figure 3. SC35 regulates alternative splicing of *TNNT3* exon 16 and 17. (A) Schematic representation of the human *TNNT3* minigene containing both exons 16 and 17 bordered by exons 15 and 18 including full downstream and upstream intronic sequences (sizes are indicated in italic above). (B) and (C) SC35 overexpression increases inclusion of *TNNT3* exon 16. Quantification of RT-PCR analysis of *TNNT3* exon 16 (% exon 16) inclusion following respectively human (B) and murine (C) exons 15–18 minigene expressing vector cotransfection in HEK293T cells together with 15 different vectors expressing splicing factors. Histograms represent the mean of at least three independent transfections and are depicted as the percentage of mRNA containing *TNNT3* exon 16. Error bars indicate S.D. and # indicates statistical ANOVA difference compared to the minigene only condition. (D) A western-blot showing SC35 overexpression in HEK293T cells transfected with SC35 expressing vector fused with GFP compared to untransfected cells. (E) SC35 overexpression increases inclusion of *TNNT3* exon 16 in human myoblasts. RT-PCR analysis after transfection of the human *TNNT3* minigene into the human myoblast cell line LHCNM2 together with several splicing factors. (F) RT-qPCR on human muscle biopsies demonstrating that the expression level of *SC35* mRNA is similar in control and OPMD samples. (G) Representative Western blot showing SC35 extinction in HEK293T cells transfected with siRNA against SC35 compared to HEK293T cells transfected with siRNA CTRL. (H–I) SC35 extinction mimics the *TNNT3* splicing defect observed in OPMD. RT-PCR analysis of the *TNNT3* minigene cotransfected with a siRNA against SC35 (siSC35#1 and #2), a siRNA against luciferase as a control (siCTRL), or with a plasmid expressing SC35 (+SC35). Quantification of *TNNT3* exon 16 inclusion is presented in (I). *** indicates $P < 0.001$ compared to the siCTRL condition.

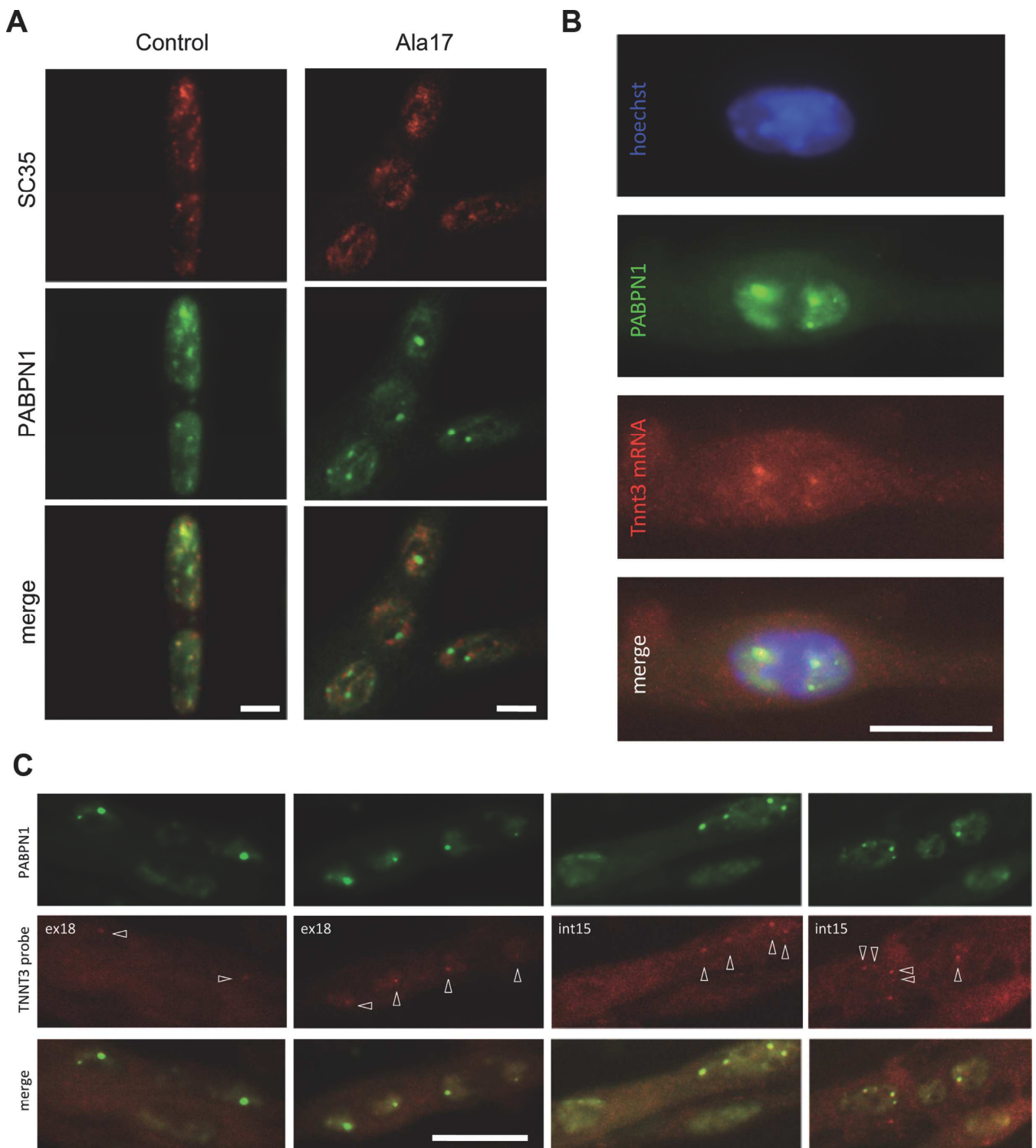


Figure 4. *Tnnt3* pre-mRNA is trapped in PABPN1 aggregates. (A) PABPN1 is localized in SC35-nuclear speckles in control conditions and delocalized from SC35-nuclear speckles with nuclear aggregate formation in OPMD (Ala17). Immunofluorescence of PABPN1 and SC35 in control and OPMD (Ala17) H2KB cell lines. Scale bar = 5 μ m. Single cell magnified of Ctrl and Ala17 cells are presented in Supplementary Figure S5. (B and C) *Tnnt3* pre-mRNA is present in PABPN1 nuclear aggregates. (B) Representative image of RNA fluorescence *in situ* hybridization (FISH) using a Digoxigenin probe targeting exon 18 of *TNNT3* mRNA (red) coupled to immunofluorescence detection of PABPN1 (green) and counterstained with Hoechst (blue) on fixed 5-day differentiated Ala17 cells. Scale bar = 10 μ m. (C) Different representative images of FISH using a probe targeting exon 18 (ex18, left) or intron 15 (int15, right) of *TNNT3* pre-mRNA coupled to immunofluorescence detection of PABPN1 on fixed 5-day differentiated Ala17 cells. Pre-mRNA detection is indicated with white arrows. Scale bar = 20 μ m.

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

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

Calcium sensitivity is decreased in slow fibers of OPMD muscles

TNNT3 pre-mRNA is intensively spliced and finely regulated; it is suggested that the abundance in the ratio of the different isoforms participates to muscle plasticity (54). In order to investigate the physiopathological consequences of this splicing defect, we used a mouse model of OPMD, the A17.1 mouse. This model was generated by the expression of alanine expanded mammalian PABPN1 (PABPN1-17ala) specifically in muscles; it reproduces the disease characteristics, namely progressive muscle weakness and formation of nuclear aggregates containing mutant PABPN1 in muscles (25,48). Interestingly, we found the same splicing defect in the slow soleus muscle of this A17.1 OPMD mouse model (Figure 5A), where nuclear aggregates are also present (Figure 5B), whereas this splicing defect was absent in the soleus of the control A10.1 mouse (overexpressing wild-type PABPN1 (25)), where nuclear aggregates are absent (Supplementary Figure S7). These data strengthen the claim of a direct link between the splicing defect and the presence of nuclear aggregates. TNNT3 is a subunit of the trimeric troponin complex, which regulates skeletal muscle contraction in response to calcium (65). *In vitro* assays with recombinant proteins already demonstrated that a difference in the ratio of isoforms including exon 16 or 17 led to alterations in muscle fibre calcium affinity, a key param-

eter involved in the modulation of force contraction (54,66). Indeed, while numerous reports have demonstrated the predominant role of the calcium sensor Troponin C of the troponin complex in the modulation of calcium sensitivity and affinity, it has been clearly established that TNNT3 is also involved in the modulation of these mechanisms (67). We took advantage of the soleus of the A17.1 mouse, which presents the unbalanced ratio of *Tnnt3* mutually exclusive exons to look at the functional consequences of the TNNT3 splicing defect. We first calculated the pCa/tension relationship in order to analyse whether the activation parameters of muscle fibre tension by calcium could be altered in OPMD muscles. The Tension/pCa relationship performed on isolated skinned fibres from murine soleus muscles revealed a decrease in the calcium affinity of slow OPMD muscle fibres compared to slow control muscle fibres (pCa of 5.85 ± 0.04 and 6.02 ± 0.04 respectively, $P < 0.05$) (Figure 5C). This decrease in calcium affinity can be clearly related to the expression of the exon 17 containing isoform instead of the exon 16 isoform, since previous data has shown that the *Tnnt3* exon 17 containing isoform had a lower calcium affinity than the exon 16 isoform (66). Our data demonstrate that a decrease in calcium handling is a functional consequence of the decrease in exon 16 *Tnnt3* isoform in slow fibres, which are the predominant fibre type in many human skeletal muscles.

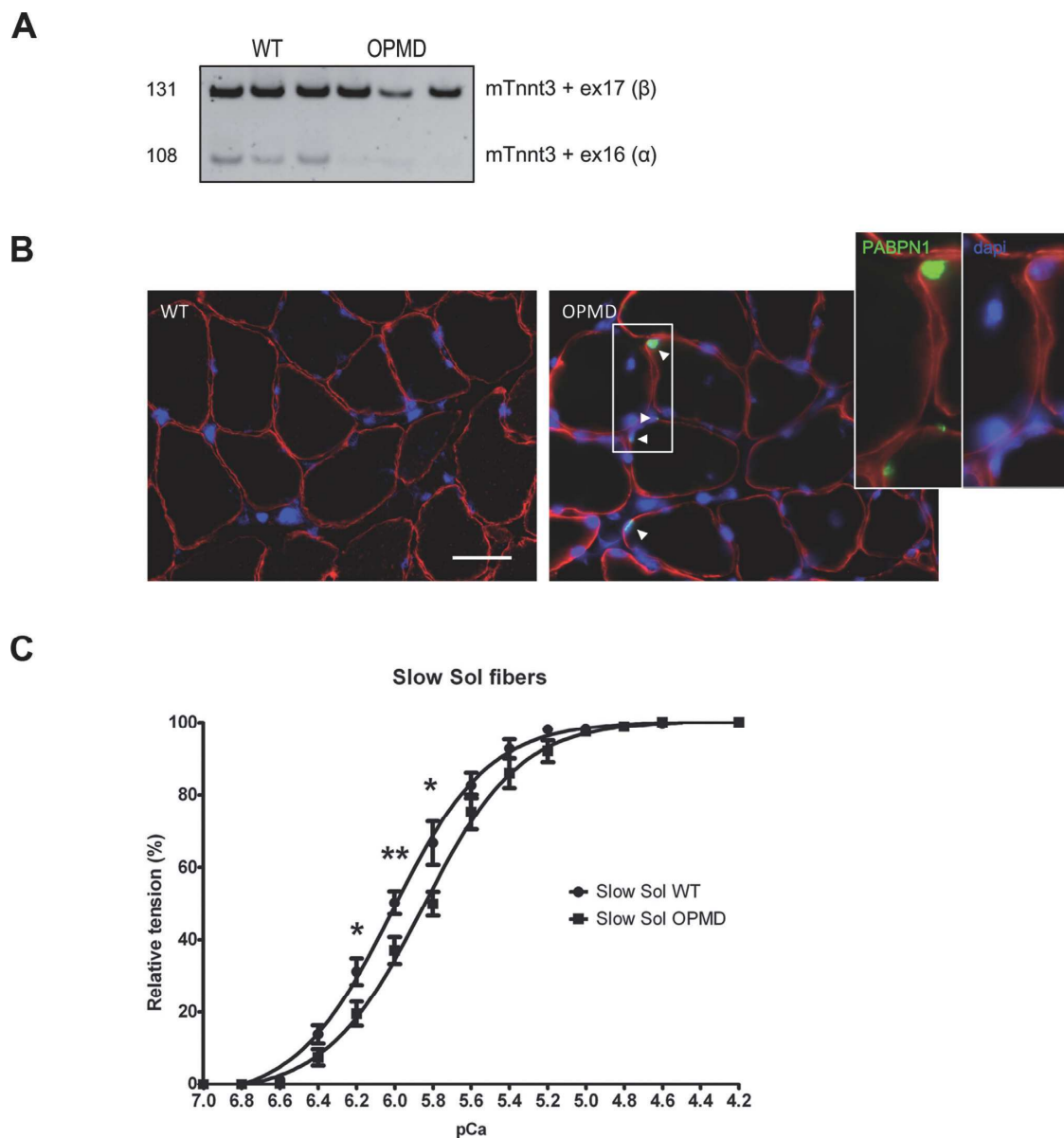


Figure 5. Splicing defect in OPMD mouse induces decreased calcium sensitivity. (A) *Tnnt3* splicing defect is present in OPMD mouse model. RT-PCR analysis of endogenous *Tnnt3* exons 16 and 17 isoforms in soleus (Sol) muscles of wild-type (WT) and A17.1 (OPMD) mice. (B) PABPN1 staining following KCl treatment revealed intranuclear aggregates in the soleus muscle of A17.1 mouse (red: dystrophin, green: PABPN1, blue: dapi), whereas no aggregate are observed in control mice. Aggregates are indicated with an arrow (see also inset boxes). Scale bar = 30 μ m. (C) Deregulation of *Tnnt3* exon 16 and 17 induces decreased calcium sensitivity in mice slow fibers, as measured by pCa/Tension relationship. * indicates $P < 0.05$, ** indicates $P < 0.01$.

DISCUSSION

Like many triplet expansion disorders, OPMD is characterized by the presence of insoluble nuclear aggregates in muscle fibres. However the exact role and contribution of these PABPN1 aggregates to the clinical phenotype in OPMD is still debated (1). In this study, we clearly illustrate that PABPN1 nuclear aggregates have at least one toxic function as they lead to a specific splicing defect: PABPN1 aggregates are able to trap the muscle-specific *TNNT3* pre-mRNA, driving it outside of the nuclear speckles, leading to altered SC35-mediated splicing. This trapping leads to a defect in the splicing regulation of the *TNNT3* mutu-

ally exclusive exons 16 and 17 in OPMD samples compared to controls. This is the first demonstration of splicing defects in OPMD. Poly(A) RNA were previously observed in PABPN1 nuclear aggregates using oligo-dT probes (18–19,64); here we additionally demonstrate that PABPN1 nuclear aggregates are able to sequester a pre-mRNA leading to its missplicing. Whether this muscle-specific RNA plays a role as a potential scaffold for aggregate formation in a similar way to architectural RNAs (arcRNA) for nuclear domains such as paraspeckles or stress bodies (68) remains to be further investigated. Nuclear speckles are essential nuclear compartments involved in post-transcriptional processing of mRNA. These nuclear struc-

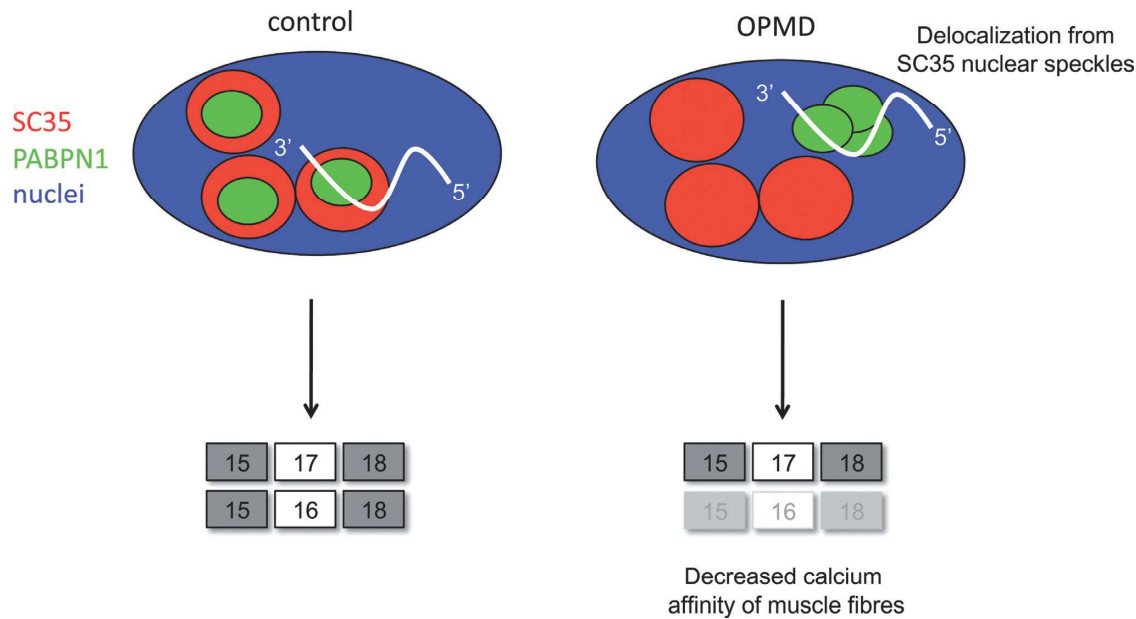


Figure 6. Molecular mechanism of splicing deregulation in OPMD. Molecular model of *TNNT3* mRNA splicing defect in OPMD: in healthy condition, mutually exclusives exons of *TNNT3* pre-mRNA are regulated by SC35 splicing factor favouring exon 16 inclusion. In OPMD condition, *TNNT3* pre-mRNA is delocalized from SC35 nuclear speckles by PABPN1 nuclear aggregates trapping resulting in a missplicing of exon 16 and a decreased calcium affinity of muscle fibres.

tures are enriched in poly(A) RNA, in many pre-mRNA splicing factors including snRNP (small nuclear ribonucleoprotein particles) and in SR splicing factors such as SC35 (69). PABPN1 is found in the nucleoplasm excluding the nucleolus and is concentrated mainly in nuclear speckles where it participates in mRNA metabolism. This localization of PABPN1 in nuclear speckles requires the binding to poly(A) RNA (19,29,70–71). Previous studies have shown that PABPN1 nuclear aggregates originate at the edge of the speckles and gradually delocalize outside of these compartments, together with a gradual depletion of poly(A) RNA from speckles (19,64). It has been suggested that Pab2 (fission yeast ortholog of mammalian PABPN1) associates with pre-mRNA co-transcriptionally prior to 3' end processing/polyadenylation (72). In addition, pre-mRNA introns located at the 3' end of multiple intron transcripts are more frequently spliced post-transcriptionally, presumably because transcription termination and cleavage at the polyadenylation site occurs before the splicing machinery manages to catalyse their removal (73). It is well established that the different steps of pre-mRNA processing (5' cap, splicing, 3' end processing) are connected and influence each other (74,75). The splicing defect that we identified is at the 3' end of the *TNNT3* pre-mRNA and we therefore propose that during the processing of *TNNT3* pre-mRNA, the binding of PABPN1 to its 3' end for further cleavage and polyadenylation induces, in the case of OPMD, a gradual delocalization of the complex pre-mRNA/PABPN1 from SC35-nuclear speckles. This delocalization induces a missplicing of the last exons of *TNNT3* with the production of a modified protein that has a negative effect on muscle contraction. Indeed, the imbalanced ratio of *TNNT3* exons 16 and 17 induced a decrease in calcium sensitivity with phys-

iopathological consequences at the level of the muscle fibre (see Figure 6 for a molecular model).

In this study, we have exploited different OPMD cell and animal models to decipher the exact mechanism, which controls the splicing defect observed in *TNNT3*. These models, based on expanded PABPN1 overexpression, reproduce pathological characteristics found in OPMD patients, including the presence of nuclear aggregates. The overexpression is not ideal, since this is absent in OPMD patients (76). In the present study, we therefore performed several experiments to clearly dissociate aggregation from overexpression in these models. Using both RNAi and transfection systems to modify the level of PABPN1, we confirmed that the splicing defect reproduced in OPMD models is solely due to the presence of aggregates and not to the level of PABPN1 itself. Indeed, neither the reduction of PABPN1 levels in control IM2 cells, nor the transfection in Ala17 cells with an exogenous PABPN1 expression vector to potentially compensate for a loss of function, nor the silencing or overexpression of PABPN1 in HEK293T cells transfected with the *TNNT3* minigene, were able to modify the splicing pattern of *TNNT3*. In addition, since PABPN1 itself is an aggregate-prone protein, it is well known that the artificial overexpression of wild-type PABPN1 protein is able to induce in cells the formation of nuclear aggregates (77,78). For example, it has previously been demonstrated that the H2KB-WTa cells (named Ala10 cells here), overexpress wild-type PABPN1 and do contain around 20% nuclear aggregates (47). That the same phenotypes can be induced following expression of normal or mutant protein in *Drosophila* models of other disorders has also been reported previously (e.g. Parkinson's disease (79)). We used this cell model to further verify our mechanism and as expected, since these cells do contain aggregates, we confirmed

the splicing defect in these cells. Interestingly in the soleus of A10.1 mice we were unable to detect aggregates and logically the splicing defect was absent. Altogether these data again emphasize the pivotal role of nuclear aggregates in the mechanism.

Similar findings regarding alanine repeats and subnuclear protein localization have been recently observed with the RNA-binding motif protein 4 (RBM4) (80). Alternative splicing defects have previously been observed in other trinucleotide repeat disorders including myotonic dystrophy (41). However, this is the first time that a splicing defect, with a misregulation of mutually exclusive last exons of the muscle specific *TNNT3* mRNA, has been identified in OPMD. In the spliceopathies described so far, alternative splicing misregulation is in most cases due to an abnormal activity of an RNA splicing factor, for example, functional loss of MBNL proteins due to their sequestration by nuclear mutant RNA in myotonic dystrophy (81). This abnormal activity often results from splicing factors being misplaced from their natural location within the cell, highlighting the importance of the spatial distribution of the intracellular mRNA and splicing factors. We describe here a different mechanism directly linked to the presence of nuclear aggregates: the splicing defect is due to the spatial separation of the deregulated RNA from its splicing factor. Although the generic nature of this alternative mechanism remains to be demonstrated, it may play a role in various other diseases with nuclear inclusions or foci containing an RNA binding protein, as shown here for OPMD.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to D. Auboeuf, D. Weil and N. Charlet-Berguerand for their gifts of splicing factor expressing vectors. We thank I. Behm for the ASF/SF2 antibody and N. Vignier for qPCR primers. We thank Glenn Morris at the Centre for Inherited Neuromuscular Disease for supplying antibody Mb1a to detect MBNL1. We thank J. Marie for fruitful discussion and careful reading of the manuscript. We thank N. Beltchenko for the construction of the murine *Tnnt3* minigene and Elisa Negroni for image processing. The authors acknowledge the OPMD patients for their collaboration.

FUNDING

Centre National pour la Recherche Scientifique, the Association Française contre les Myopathies [Research Programs 15123 and 17110]; University Paris VI Pierre et Marie Curie; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Fondation de l'Avenir [project ET1-622]; P.K. has a salary from the Ministère de l'Éducation Nationale de la Recherche et de la Technologie. Funding for open access charge: AFM eOPMD grant Research Program 17110. *Conflict of interest statement.* None declared.

REFERENCES

- Banerjee, A., Apponi, L.H., Pavlath, G.K. and Corbett, A.H. (2013) PABPN1: molecular function and muscle disease. *FEBS J.*, **280**, 4230–4250.
- Eckmann, C.R., Rammelt, C. and Wahle, E. (2011) Control of poly(A) tail length. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **2**, 348–361.
- Apponi, L.H., Leung, S.W., Williams, K.R., Valentini, S.R., Corbett, A.H. and Pavlath, G.K. (2009) Loss of nuclear poly(A)-binding protein 1 causes defects in myogenesis and mRNA biogenesis. *Hum. Mol. Genet.*, **19**, 1058–1065.
- Benoit, B., Mitou, G., Chartier, A., Temme, C., Zaessinger, S., Wahle, E., Busseau, I. and Simonelig, M. (2005) An essential cytoplasmic function for the nuclear poly(A) binding protein, PABP2, in poly(A) tail length control and early development in *Drosophila*. *Dev. Cell*, **9**, 511–522.
- de Klerk, E., Venema, A., Anvar, S.Y., Goeman, J.J., Hu, O., Trollet, C., Dickson, G., den Dunnen, J.T., van der Maarel, S.M., Raz, V. *et al.* (2012) Poly(A) binding protein nuclear 1 levels affect alternative polyadenylation. *Nucleic Acids Res.*, **40**, 9089–9101.
- Jenal, M., Elkon, R., Loayza-Puch, F., van Haften, G., Kuhn, U., Menzies, F.M., Vrieling, J.A., Bos, A.J., Drost, J., Rooijers, K. *et al.* (2012) The poly(a)-binding protein nuclear 1 suppresses alternative cleavage and polyadenylation sites. *Cell*, **149**, 538–553.
- Beaulieu, Y.B., Kleinman, C.L., Landry-Voyer, A.M., Majewski, J. and Bachand, F. (2012) Polyadenylation-dependent control of long noncoding RNA expression by the poly(A)-binding protein nuclear 1. *PLoS Genet.*, **8**, e1003078.
- Bresson, S.M. and Conrad, N.K. (2013) The human nuclear poly(a)-binding protein promotes RNA hyperadenylation and decay. *PLoS Genet.*, **9**, e1003893.
- Nguyen, D., Grenier St-Sauveur, V., Bergeron, D., Dupuis-Sandoval, F., Scott, M.S. and Bachand, F. (2015) A Polyadenylation-Dependent 3' End Maturation Pathway Is Required for the Synthesis of the Human Telomerase RNA. *Cell Rep.*, **13**, 2244–2257.
- Brais, B., Bouchard, J.P., Xie, Y.G., Rocheford, D.L., Chretien, N., Tome, F.M., Lafreniere, R.G., Rommens, J.M., Uyama, E., Nohira, O. *et al.* (1998) Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nat. Genet.*, **18**, 164–167.
- Richard, P., Trollet, C., Gidaro, T., Demay, L., Brochier, G., Malfatti, E., Tome, F.M.S., Fardeau, M., Laforet, P., Romero, N. *et al.* (2015) PABPN1 (GCN)11 as a Dominant Allele in Oculopharyngeal Muscular Dystrophy –Consequences in Clinical Diagnosis and Genetic Counselling. *J. Neuromuscul. Dis.*, **2**, 175–180.
- Jouan, L., Rocheford, D., Szuto, A., Carney, E., David, K., Dion, P.A. and Rouleau, G.A. (2014) An 18 Alanine Repeat in a Severe Form of Oculopharyngeal Muscular Dystrophy. *Can J Neurol Sci.*, **41**, 508–511.
- Trollet, C., Gidaro, T., Klein, P., Perie, S., Butler-Browne, G. and Lacau St Guily, J. (1993) Oculopharyngeal muscular dystrophy. *GeneReview*. University of Washington, Seattle.
- Lopez Castel, A., Cleary, J.D. and Pearson, C.E. (2010) Repeat instability as the basis for human diseases and as a potential target for therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 165–170.
- Galka-Marciniak, P., Urbanek, M.O. and Krzyzosiak, W.J. (2012) Triplet repeats in transcripts: structural insights into RNA toxicity. *Biol. Chem.*, **393**, 1299–1315.
- Tome, F.M. and Fardeau, M. (1980) Nuclear inclusions in oculopharyngeal dystrophy. *Acta Neuropathol.*, **49**, 85–87.
- Corbeil-Girard, L.P., Klein, A.F., Sasseville, A.M., Lavoie, H., Dicaire, M.J., Saint-Denis, A., Page, M., Duranceau, A., Codere, F., Bouchard, J.P. *et al.* (2005) PABPN1 overexpression leads to upregulation of genes encoding nuclear proteins that are sequestered in oculopharyngeal muscular dystrophy nuclear inclusions. *Neurobiol. Dis.*, **18**, 551–567.
- Calado, A., Tome, F.M., Brais, B., Rouleau, G.A., Kuhn, U., Wahle, E. and Carmo-Fonseca, M. (2000) Nuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy consist of poly(A) binding protein 2 aggregates which sequester poly(A) RNA. *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 2321–2328.
- Tavanez, J.P., Calado, P., Braga, J., Lafarga, M. and Carmo-Fonseca, M. (2005) In vivo aggregation properties of the nuclear poly(A)-binding protein PABPN1. *RNA*, **11**, 752–762.

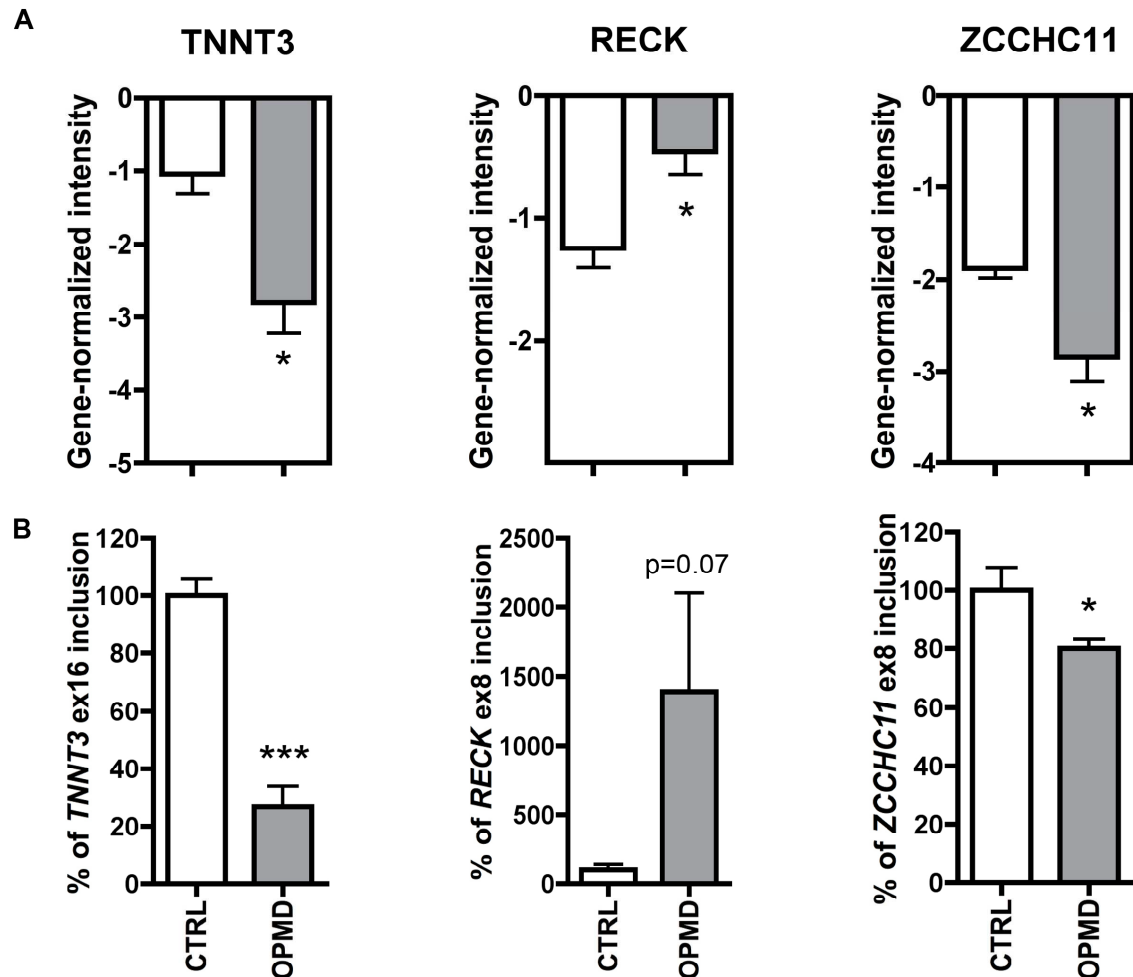
20. Anvar,S.Y., 't Hoen,P.A., Venema,A., van der Sluijs,B., van Engelen,B., Snoeck,M., Vissing,J., Trollet,C., Dickson,G., Chartier,A. *et al.* (2011) Deregulation of the ubiquitin-proteasome system is the predominant molecular pathology in OPMD animal models and patients. *Skelet Muscle*, **1**, 15.
21. Raz,V., Buijze,H., Raz,Y., Verwey,N., Anvar,S.Y., Aartsma-Rus,A. and van der Maarel,S.M. (2014) A novel feed-forward loop between ARIH2 E3-ligase and PABPN1 regulates aging-associated muscle degeneration. *Am. J. Pathol.*, **184**, 1119–1131.
22. Fan,X., Messaed,C., Dion,P., Laganieri,J., Brais,B., Karpati,G. and Rouleau,G.A. (2003) HnRNP A1 and A/B interaction with PABPN1 in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Can. J. Neurol. Sci.*, **30**, 244–251.
23. Blumen,S.C., Brais,B., Korczyn,A.D., Medinsky,S., Chapman,J., Asherov,A., Nisipeanu,P., Codere,F., Bouchard,J.P., Fardeau,M. *et al.* (1999) Homozygotes for oculopharyngeal muscular dystrophy have a severe form of the disease. *Ann. Neurol.*, **46**, 115–118.
24. Davies,J.E., Sarkar,S. and Rubinsztein,D.C. (2006) Trehalose reduces aggregate formation and delays pathology in a transgenic mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **15**, 23–31.
25. Davies,J.E., Wang,L., Garcia-Oroz,L., Cook,L.J., Vacher,C., O'Donovan,D.G. and Rubinsztein,D.C. (2005) Doxycycline attenuates and delays toxicity of the oculopharyngeal muscular dystrophy mutation in transgenic mice. *Nat. Med.*, **11**, 672–677.
26. Chartier,A., Raz,V., Sterrenburg,E., Verrips,C.T., van der Maarel,S.M. and Simonelig,M. (2009) Prevention of oculopharyngeal muscular dystrophy by muscular expression of Llama single-chain intrabodies in vivo. *Hum. Mol. Genet.*, **18**, 1849–1859.
27. Casafont,I., Berciano,M.T. and Lafarga,M. (2010) Bortezomib induces the formation of nuclear poly(A) RNA granules enriched in Sam68 and PABPN1 in sensory ganglia neurons. *Neurotox Res.*, **17**, 167–178.
28. Catoire,H., Pasco,M.Y., Abu-Baker,A., Holbert,S., Tourette,C., Brais,B., Rouleau,G.A., Parker,J.A. and Neri,C. (2008) Sirtuin inhibition protects from the polyalanine muscular dystrophy protein PABPN1. *Hum. Mol. Genet.*, **17**, 2108–2117.
29. Messaed,C., Dion,P.A., Abu-Baker,A., Rochefort,D., Laganieri,J., Brais,B. and Rouleau,G.A. (2007) Soluble expanded PABPN1 promotes cell death in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neurobiol. Dis.*, **26**, 546–557.
30. Davies,J.E. and Rubinsztein,D.C. (2011) Over-expression of BCL2 rescues muscle weakness in a mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **20**, 1154–1163.
31. Chartier,A., Klein,P., Pierson,S., Barbezier,N., Gidaro,T., Casas,F., Carberry,S., Dowling,P., Maynadier,L., Bellec,M. *et al.* (2015) Mitochondrial dysfunction reveals the role of mRNA poly(A) tail regulation in oculopharyngeal muscular dystrophy pathogenesis. *PLoS Genet.*, **11**, e1005092.
32. Bergeron,D., Pal,G., Beaulieu,Y.B., Chabot,B. and Bachand,F. (2015) Regulated Intron Retention and Nuclear Pre-mRNA Decay Contribute to PABPN1 Autoregulation. *Mol. Cell Biol.*, **35**, 2503–2517.
33. Muniz,L., Davidson,L. and West,S. (2015) Poly(A) polymerase and the nuclear poly(A) binding protein, PABPN1, coordinate the splicing and degradation of a subset of human Pre-mRNAs. *Mol. Cell Biol.*, **35**, 2218–2230.
34. Nilsen,T.W. and Graveley,B.R. (2010) Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature*, **463**, 457–463.
35. Wang,J., Zhang,J., Li,K., Zhao,W. and Cui,Q. (2012) SpliceDisease database: linking RNA splicing and disease. *Nucleic Acids Res.*, **40**, D1055–1059.
36. Wang,G.S. and Cooper,T.A. (2007) Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nat. Rev. Genet.*, **8**, 749–761.
37. Pan,Q., Shai,O., Lee,L.J., Frey,B.J. and Blencowe,B.J. (2008) Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat. Genet.*, **40**, 1413–1415.
38. Castle,J.C., Zhang,C., Shah,J.K., Kulkarni,A.V., Kalsotra,A., Cooper,T.A. and Johnson,J.M. (2008) Expression of 24,426 human alternative splicing events and predicted cis regulation in 48 tissues and cell lines. *Nat. Genet.*, **40**, 1416–1425.
39. Wang,E.T., Sandberg,R., Luo,S., Khrebtkova,I., Zhang,L., Mayr,C., Kingsmore,S.F., Schroth,G.P. and Burge,C.B. (2008) Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*, **456**, 470–476.
40. Pistoni,M., Ghigna,C. and Gabellini,D. (2010) Alternative splicing and muscular dystrophy. *RNA Biol.*, **7**, 441–452.
41. Nakamori,M., Sobczak,K., Puwanant,A., Welle,S., Eichinger,K., Pandya,S., Dekdebrun,J., Heatwole,C.R., McDermott,M.P., Chen,T. *et al.* (2013) Splicing biomarkers of disease severity in myotonic dystrophy. *Ann. Neurol.*, **74**, 862–872.
42. de la Grange,P., Dutertre,M., Martin,N. and Auboeuf,D. (2005) FAST DB: a website resource for the study of the expression regulation of human gene products. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 4276–4284.
43. Wang,E., Aslanzadeh,V., Papa,F., Zhu,H., de la Grange,P. and Cambi,F. (2012) Global profiling of alternative splicing events and gene expression regulated by hnRNPH/F. *PLoS One*, **7**, e51266.
44. Gandoura,S., Weiss,E., Rautou,P.E., Fasseu,M., Gustot,T., Lemoine,F., Hurtado-Nedelec,M., Hego,C., Vadrot,N., Elkrief,L. *et al.* (2013) Gene- and exon-expression profiling reveals an extensive LPS-induced response in immune cells in patients with cirrhosis. *J. Hepatol.*, **58**, 936–948.
45. de la Grange,P., Dutertre,M., Correa,M. and Auboeuf,D. (2007) A new advance in alternative splicing databases: from catalogue to detailed analysis of regulation of expression and function of human alternative splicing variants. *BMC Bioinformatics*, **8**, 180.
46. Mamchaoui,K., Trollet,C., Bigot,A., Negroni,E., Chaouch,S., Wolff,A., Kandalla,P.K., Marie,S., Di Santo,J., St Guily,J.L. *et al.* (2011) Immortalized pathological human myoblasts: towards a universal tool for the study of neuromuscular disorders. *Skelet Muscle*, **1**, 34.
47. Raz,V., Routledge,S., Venema,A., Buijze,H., van der Wal,E., Anvar,S., Straasheijm,K.R., Klooster,R., Antoniou,M. and van der Maarel,S.M. (2011) Modeling oculopharyngeal muscular dystrophy in myotube cultures reveals reduced accumulation of soluble mutant PABPN1 protein. *Am. J. Pathol.*, **179**, 1988–2000.
48. Trollet,C., Anvar,S.Y., Venema,A., Hargreaves,I.P., Foster,K., Vignaud,A., Ferry,A., Negroni,E., Hourde,C., Baraibar,M.A. *et al.* (2010) Molecular and phenotypic characterization of a mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy reveals severe muscular atrophy restricted to fast glycolytic fibres. *Hum. Mol. Genet.*, **19**, 2191–2207.
49. Mounier,Y., Holy,X. and Stevens,L. (1989) Compared properties of the contractile system of skinned slow and fast rat muscle fibres. *Pflugers Arch.*, **415**, 136–141.
50. Fabiato,A. (1988) Computer programs for calculating total from specified free or free from specified total ionic concentrations in aqueous solutions containing multiple metals and ligands. *Methods Enzymol.*, **157**, 378–417.
51. Gidaro,T., Negroni,E., Perie,S., Mirabella,M., Laine,J., Lacau St Guily,J., Butler-Browne,G., Mouly,V. and Trollet,C. (2013) Atrophy, fibrosis, and increased PAX7-positive cells in pharyngeal muscles of oculopharyngeal muscular dystrophy patients. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **72**, 234–243.
52. Breitbart,R.E. and Nadal-Ginard,B. (1987) Developmentally induced, muscle-specific trans factors control the differential splicing of alternative and constitutive troponin T exons. *Cell*, **49**, 793–803.
53. Breitbart,R.E., Nguyen,H.T., Medford,R.M., Destree,A.T., Mahdavi,V. and Nadal-Ginard,B. (1985) Intricate combinatorial patterns of exon splicing generate multiple regulated troponin T isoforms from a single gene. *Cell*, **41**, 67–82.
54. Schilder,R.J., Kimball,S.R. and Jefferson,L.S. (2013) Cell-autonomous regulation of fast troponin T pre-mRNA alternative splicing in response to mechanical stretch. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **303**, C298–C307.
55. Jat,P.S., Noble,M.D., Ataliotis,P., Tanaka,Y., Yannoutsos,N., Larsen,L. and Kioussis,D. (1991) Direct derivation of conditionally immortal cell lines from an H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 5096–5100.
56. Wechsler-Reya,R.J., Elliott,K.J. and Prendergast,G.C. (1998) A role for the putative tumor suppressor Bin1 in muscle cell differentiation. *Mol. Cell Biol.*, **18**, 566–575.

57. Piva, F., Giulietti, M., Burini, A.B. and Principato, G. (2012) SpliceAid 2: a database of human splicing factors expression data and RNA target motifs. *Hum. Mutat.*, **33**, 81–85.
58. Cartegni, L., Wang, J., Zhu, Z., Zhang, M.Q. and Krainer, A.R. (2003) ESEfinder: a web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 3568–3571.
59. Spector, D.L., Fu, X.D. and Maniatis, T. (1991) Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus. *EMBO J.*, **10**, 3467–3481.
60. Fu, X.D. (1993) Specific commitment of different pre-mRNAs to splicing by single SR proteins. *Nature*, **365**, 82–85.
61. Wang, J. and Manley, J.L. (1995) Overexpression of the SR proteins ASF/SF2 and SC35 influences alternative splicing in vivo in diverse ways. *RNA*, **1**, 335–346.
62. Kanadia, R.N., Johnstone, K.A., Mankodi, A., Lungu, C., Thornton, C.A., Esson, D., Timmers, A.M., Hauswirth, W.W. and Swanson, M.S. (2003) A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science*, **302**, 1978–1980.
63. Kanadia, R.N., Shin, J., Yuan, Y., Beattie, S.G., Wheeler, T.M., Thornton, C.A. and Swanson, M.S. (2006) Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscleblind overexpression in a mouse poly(CUG) model for myotonic dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 11748–11753.
64. Bengoechea, R., Tapia, O., Casafont, I., Berciano, J., Lafarga, M. and Berciano, M.T. (2012) Nuclear speckles are involved in nuclear aggregation of PABPN1 and in the pathophysiology of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neurobiol. Dis.*, **46**, 118–129.
65. Perry, S.V. (1998) Troponin T: genetics, properties and function. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **19**, 575–602.
66. Chaudhuri, T., Mukherjee, M., Sachdev, S., Randall, J.D. and Sarkar, S. (2005) Role of the fetal and alpha/beta exons in the function of fast skeletal troponin T isoforms: correlation with altered Ca²⁺ regulation associated with development. *J. Mol. Biol.*, **352**, 58–71.
67. Gordon, A.M., Homsher, E. and Regnier, M. (2000) Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev.*, **80**, 853–924.
68. Chujo, T., Yamazaki, T. and Hirose, T. (2016) Architectural RNAs (arcRNAs): a class of long noncoding RNAs that function as the scaffold of nuclear bodies. *Biochim. Biophys. Acta*, **1859**, 139–146.
69. Lamond, A.I. and Spector, D.L. (2003) Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**, 605–612.
70. Calado, A. and Carmo-Fonseca, M. (2000) Localization of poly(A)-binding protein 2 (PABP2) in nuclear speckles is independent of import into the nucleus and requires binding to poly(A) RNA. *J. Cell Sci.*, **113**, 2309–2318.
71. Calado, A., Kutay, U., Kuhn, U., Wahle, E. and Carmo-Fonseca, M. (2000) Deciphering the cellular pathway for transport of poly(A)-binding protein II. *RNA*, **6**, 245–256.
72. Lemieux, C. and Bachand, F. (2009) Cotranscriptional recruitment of the nuclear poly(A)-binding protein Pab2 to nascent transcripts and association with translating mRNPs. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 3418–3430.
73. Girard, C., Will, C.L., Peng, J., Makarov, E.M., Kastner, B., Lemm, I., Urlaub, H., Hartmuth, K. and Luhrmann, R. (2012) Post-transcriptional spliceosomes are retained in nuclear speckles until splicing completion. *Nat Commun.*, **3**, 994.
74. Proudfoot, N.J. (2011) Ending the message: poly(A) signals then and now. *Genes Dev.*, **25**, 1770–1782.
75. Proudfoot, N.J., Furger, A. and Dye, M.J. (2002) Integrating mRNA processing with transcription. *Cell*, **108**, 501–512.
76. Anvar, S.Y., Raz, Y., Verway, N., van der Sluijs, B., Venema, A., Goeman, J.J., Vissing, J., van der Maarel, S.M., t Hoen, P.A., van Engelen, B.G. et al. (2013) A decline in PABPN1 induces progressive muscle weakness in oculopharyngeal muscle dystrophy and in muscle aging. *Aging (Albany NY)*, **5**, 412–426.
77. Abu-Baker, A., Messaed, C., Laganier, J., Gaspar, C., Brais, B. and Rouleau, G.A. (2003) Involvement of the ubiquitin-proteasome pathway and molecular chaperones in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **12**, 2609–2623.
78. Bao, Y.P., Cook, L.J., O'Donovan, D., Uyama, E. and Rubinsztein, D.C. (2002) Mammalian, yeast, bacterial, and chemical chaperones reduce aggregate formation and death in a cell model of oculopharyngeal muscular dystrophy. *J. Biol. Chem.*, **277**, 12263–12269.
79. Feany, M.B. and Bender, W.W. (2000) A Drosophila model of Parkinson's disease. *Nature*, **404**, 394–398.
80. Chang, S.H., Chang, W.L., Lu, C.C. and Tarn, W.Y. (2014) Alanine repeats influence protein localization in splicing speckles and paraspeckles. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 13788–13798.
81. Miller, J.W., Urbinati, C.R., Teng-Ummuay, P., Stenberg, M.G., Byrne, B.J., Thornton, C.A. and Swanson, M.S. (2000) Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy. *EMBO J.*, **19**, 4439–4448.

SUPPLEMENTARY DATA

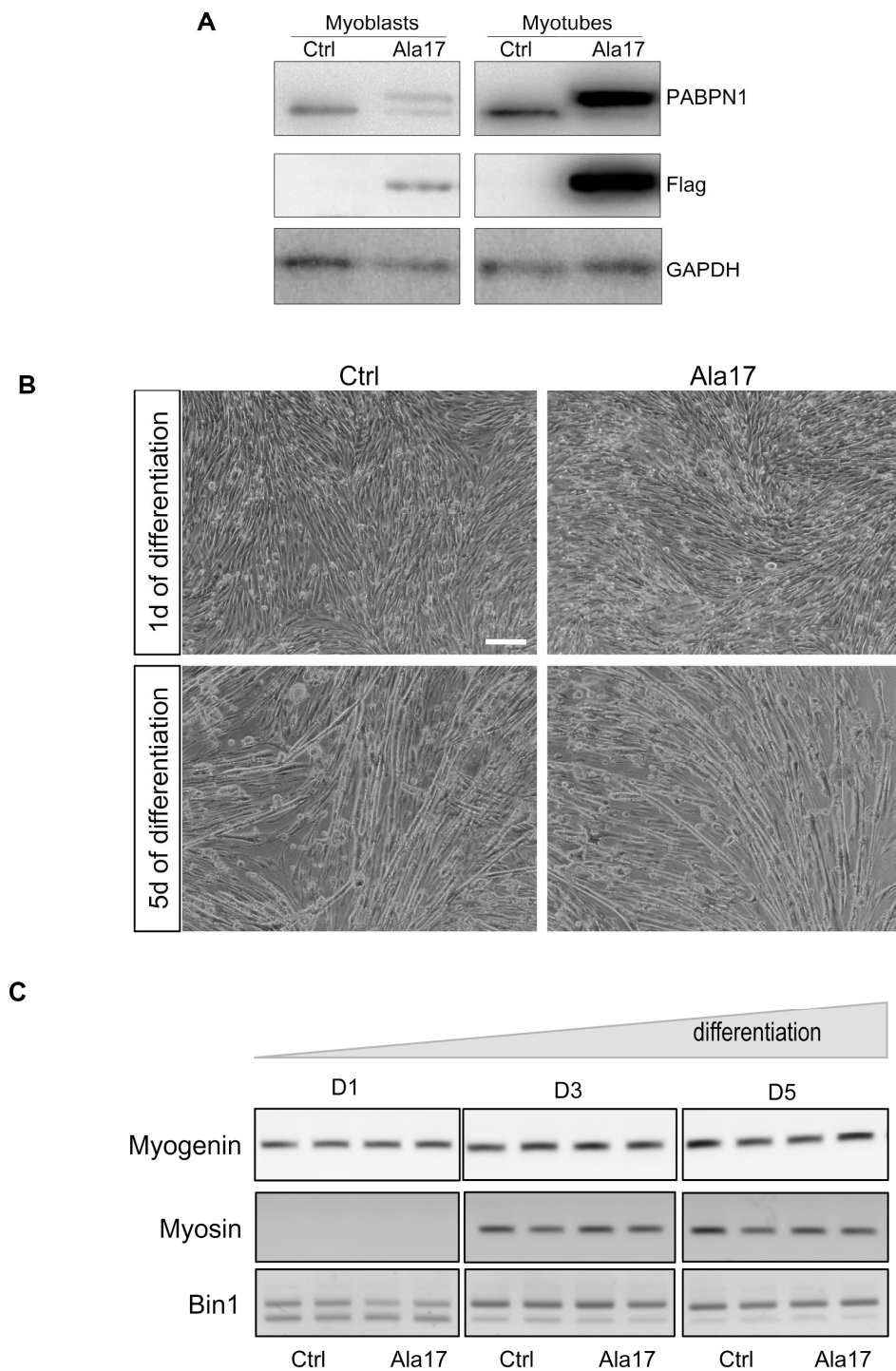
Supplementary Table 1. List of the 46 Differentially Regulated Exons (from 39 Distinct Genes) using EASANA and GenoSplice's FAST DB annotations.

Supplementary Table 2. List of primers used in this study



Supplementary figure 1

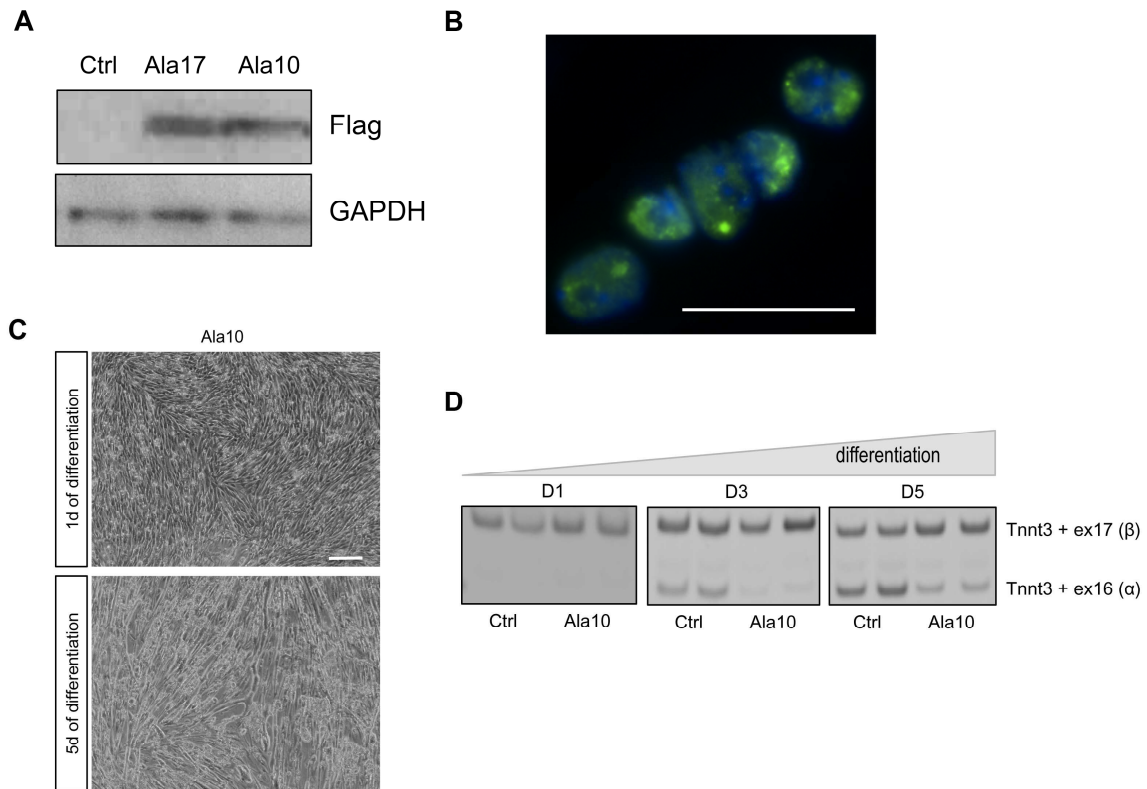
Supplementary figure 1. Cassette exon splicing defect in OPMD. (A) Gene-normalized intensity of *TNNT3* exon 16, *RECK* exon 8 and *ZCCHC11* exon 8 on the exon array. **(B)** RT-qPCR confirmation of *TNNT3*, *RECK* and *ZCCHC11* deregulation in human sternocleidomastoid muscle biopsies of control adult individuals (CTRL; n=3-4) and OPMD patients (OPMD; n=5-7). * indicates $P < 0.05$ and *** indicates $P < 0.001$



Supplementary figure 2

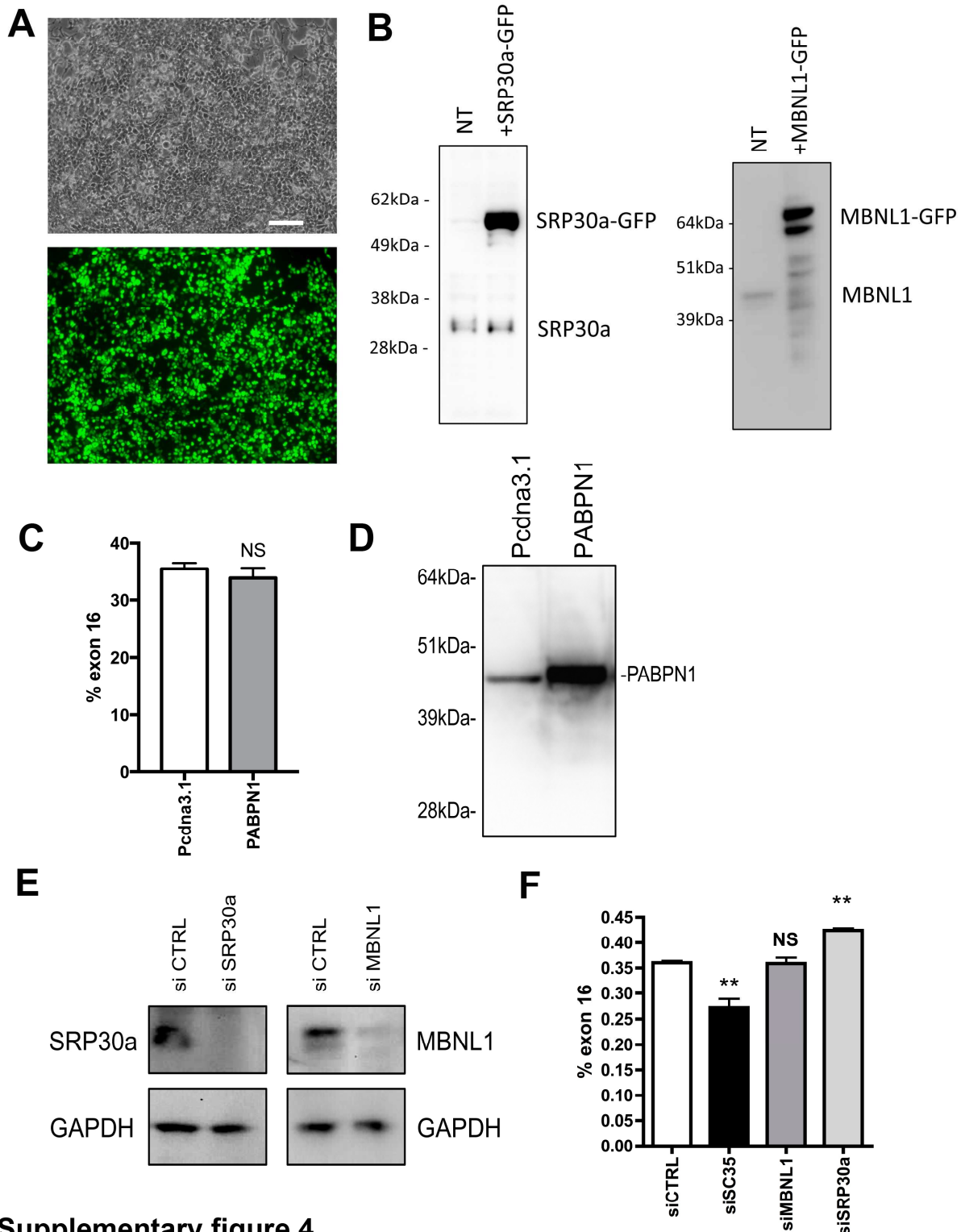
Supplementary figure 2. Muscle differentiation is not altered in murine cell model of OPMD. (A) Exogenous expPABPN1-Flag is overexpressed in differentiation condition in Ala17 cells. Western blot against PABPN1, Flag and GAPDH in Ctrl and Ala17 cells either in proliferation (myoblasts) or at 5 days of differentiation (myotubes). Exogenous PABPN1-Flag is overexpressed in differentiated Ala17 cells. **(B-C)** Muscle differentiation is similar in Ctrl and OPMD cell lines. – **(B)** Light fluorescence visualisation of Ctrl and Ala17 cells at 1 and 5 days of differentiation Scale bar = 50 μ m- **(C)** RT-PCR

analysis at 1, 3 and 5 days of differentiation (D1, D3, D5) showing that the level of two differentiation markers myogenin and myosin mRNA levels are not modified in Ala17 cells compared to control (Ctrl) cells. The splicing inclusion of *Bin1* exon 10 (physiologically enhanced during myoblast differentiation) is comparable in Ala17 and in Ctrl cell lines.



Supplementary figure 3

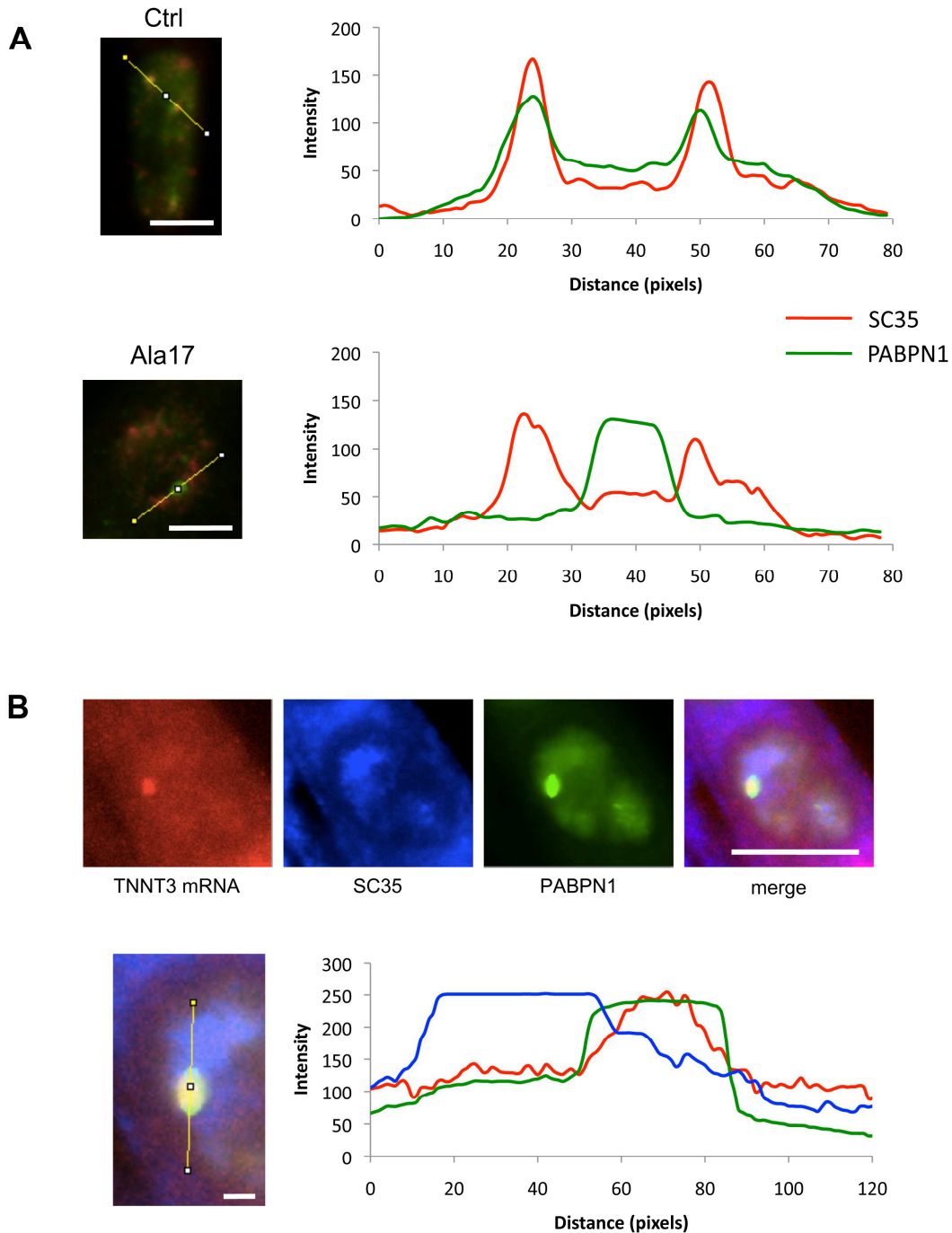
Supplementary figure 3. The same *Tnnt3* splicing defect is observed in Ala10 cells containing wild-type PABPN1 aggregates. (A) Exogenous wild-type Flag-tagged PABPN1 is overexpressed in differentiation condition in Ala10 cells. Western blot against Flag and GAPDH in Ctrl, Ala10 and Ala17 cells at 5 days of differentiation (myotubes) showing a similar overexpression level for expPABPN1 in Ala17 cells compared to wtPABPN1 in Ala10 cells **(B)** Immunofluorescence of PABPN1 (green) and counterstained with Hoechst (blue) on fixed 5-day differentiated Ala10 cells. Overexpression of PABPN1 leads to the presence of nuclear aggregates in these cells. Scale bar = 25 μm **(C)** Light fluorescence visualisation of Ala10 cells at 1 and 5 days of differentiation, comparable to the differentiation of Ctrl and Ala17 cells (in Supplementary figure 2). Scale bar = 50 μm **(D)** RT-PCR analysis of endogenous *Tnnt3* exon 16 and 17 isoforms from Ctrl and Ala10 cells myoblasts after 1, 3 and 5 days of differentiation - *Tnnt3* exon 16 level is downregulated in Ala10 murine myoblasts at 3 and 5 days of differentiation.



Supplementary figure 4

Supplementary figure 4. Only SC35 splicing factor regulates mutually exclusive exons of *TNNT3* (A) Transfection efficiency is monitored by GFP expression visualization using fluorescent microscope. Example of visualization of HEK293T cells transfected with a splicing factor expressing vector together with GFP reporter gene. Scale bar = 50 μ m. (B) Western blot showing the overexpression of SRP30a and MBNL1 splicing factors tagged together with GFP in transfected HEK293T cell compared to untransfected. (C) Quantification of RT-PCR analysis of *TNNT3* exon 16

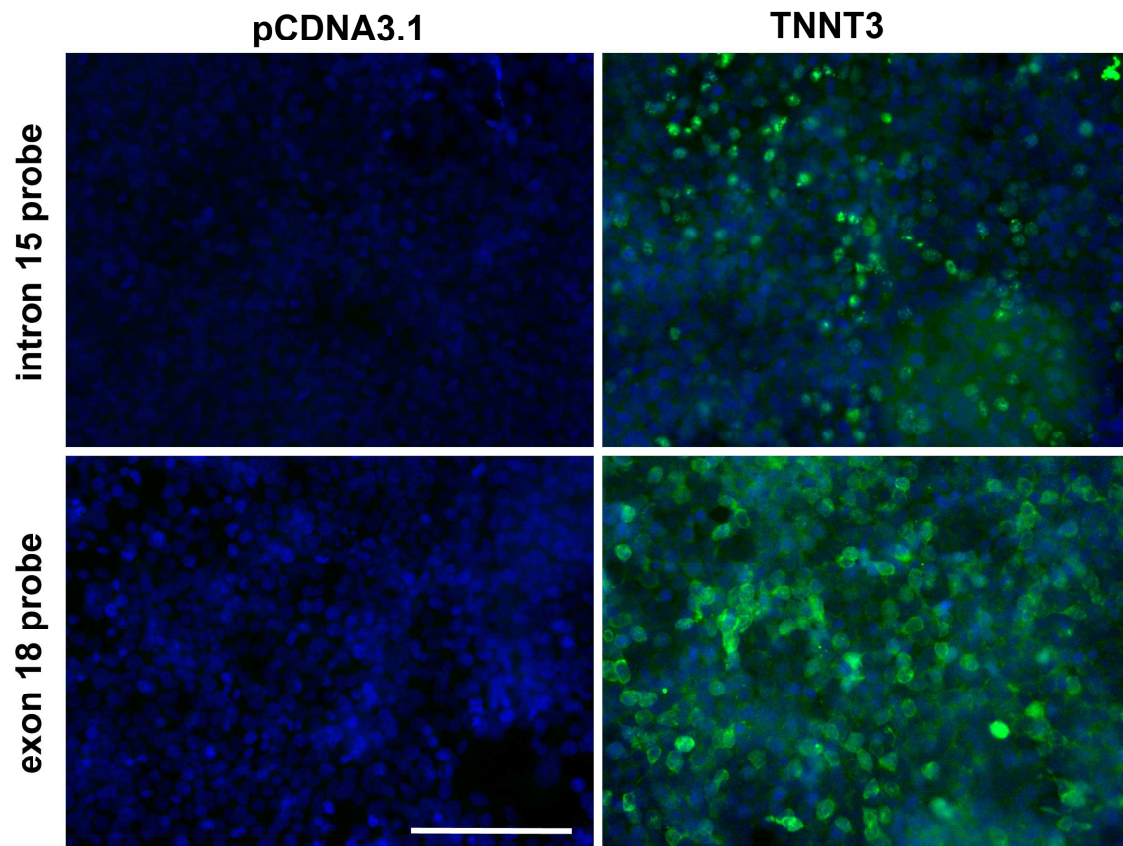
(% exon 16) inclusion in HEK293T cotransfected with PABPN1 expressing vector or pCDNA3.1 as a control. **(D)** Western blot against PABPN1 and GAPDH showing the overexpression of PABPN1 in transfected HEK293T cell compared to pCDNA3.1 transfected cells **(E)** Western blot against SRP30a, MBNL1 and GFP showing SRP30a and MBNL1 protein extinction in HEK293T cells transfected with corresponding siRNA compared to siCTRL. **(F)** Quantification of RT-PCR analysis of *TNNT3* exon 16 (% exon 16) inclusion in HEK293T cotransfected with an siRNA against MBNL1, SRP30a or a control siRNA (siCTRL). ** indicates $P < 0.01$ and NS non significant.



Supplementary figure 5

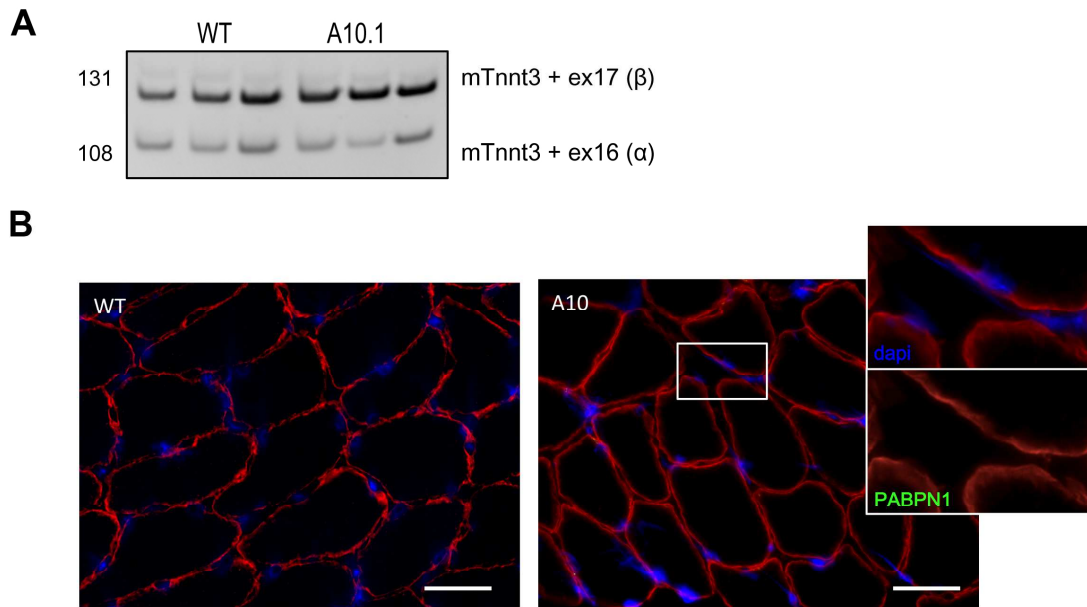
Supplementary figure 5. Delocalisation of PABPN1 aggregates from SC35 speckles. (A) Colocalization and delocalization of PABPN1 and SC35 in Ctrl and Ala17 cells respectively. The graphs on the right correspond to quantitative measurement with ImageJ of fluorescence intensity along the line indicated in the images on the left with red (SC35) and green (PABPN1). Scale bar = 5 μ m **(B)** TNNT3 mRNA is present in nuclear aggregates excluded from SC35. Top: FISH *Tnnt3* mRNA detection and SC35/PABPN1 co-staining on Ala17 cells. Scale bar = 10 μ m. Bottom: Corresponding

quantitative measurement of fluorescence intensity (blue: SC35; green: PABPN1; red: *Tnnt3* mRNA).
Scale bar = 1 μm



Supplementary figure 6

Supplementary figure 6. Specificity of the probes used. HEK293T cells were either transfected with an empty pCDNA3.1 plasmid or with the *TNNT3* minigene and a FISH was performed with probes targeting intron 15 and exon 18. The positive signal (green) is only observed in the *TNNT3* minigene transfection condition. Scale bar = 50 μm



Supplementary figure 7

Supplementary figure 7. The splicing defect is absent in the A10.1 mouse. (A) RT-PCR analysis of endogenous *Tnnt3* exon 16 and 17 isoforms from soleus muscles of wild-type (WT) and A10.1 mice. (B) PABPN1 staining following KCl treatment revealed the absence of intranuclear aggregates (see also inset boxes) in the soleus muscle of A10.1 mice as observed in control mice (WT) (red: dystrophin, green: PABPN1, blue: dapi). Scale bar = 30 μ m.

ARTICLE N°5

**Inhibition of myostatin improves muscle atrophy in
oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD)**

Pradeep Harish^{*}, Alberto Malerba^{*}, Ngoc Lu-Nguyen, Leysa Forrest, Ornella Cappellari,
Fanny Roth, Capucine Trollet, Linda Popplewell[#], George Dickson[#]

Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle, 2019

Inhibition of myostatin improves muscle atrophy in oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD)

Pradeep Harish^{1†}, Alberto Malerba^{1†}, Ngoc Lu-Nguyen¹, Leysa Forrest¹, Ornella Cappellari², Fanny Roth³, Capucine Trollet³, Linda Popplewell^{1†} & George Dickson^{1*†}

¹Centres of Gene and Cell Therapy and Biomedical Sciences, School of Biological Sciences, Royal Holloway-University of London, Surrey, UK, ²Comparative Biomedical Sciences, Royal Veterinary College, London, UK, ³Association Institut de Myologie, Centre de Recherche en Myologie UMRS974, Sorbonne Université, INSERM, Paris, France

Abstract

Background Oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) is a late-onset muscle disease affecting one per 80 000 of the general population characterized by profound dysphagia and ptosis, and limb weakness at later stages. Affected muscles are characterized by increased fibrosis and atrophy. Myostatin is a negative regulator of muscle mass, and inhibition of myostatin has been demonstrated to ameliorate symptoms in dystrophic muscles.

Methods In this study, we performed a systemic delivery of a monoclonal antibody to immunologically block myostatin in the A17 mouse model of OPMD. The mice were administered a weekly dose of 10 mg/kg RK35 intraperitoneally for 10 weeks, following which histological analyses were performed on the samples.

Results This treatment significantly ($P < 0.01$) improved body mass (11%) and muscle mass (for the tibialis anterior and extensor digitorum longus by 19% and 41%) in the A17 mice treated with RK35 when compared to saline controls. Similarly, a significantly ($P < 0.01$) increased muscle strength (18% increase in maximal tetanic force) and myofibre diameter (17% and 44% for the tibialis anterior and extensor digitorum longus), and reduced expression of markers of muscle fibrosis (40% reduction in area of expression), was also observed. No change in the density of intranuclear inclusions (a hallmark of disease progression of OPMD) was however observed.

Conclusions Our study supports the clinical translation of such antibody-mediated inhibition of myostatin as a treatment of OPMD. This strategy has implications to be used as adjuvant therapies with gene therapy based approaches, or to stabilize the muscle prior to myoblast transplantation.

Keywords Anti-myostatin antibody; RK35; OPMD; Muscle atrophy

Received: 6 September 2018; Accepted: 21 March 2019

*Correspondence to: Prof George Dickson, Centres of Gene and Cell Therapy and Biomedical Sciences, School of Biological Sciences, Royal Holloway-University of London, Egham, Surrey, TW20 0EX, UK. Email: g.dickson@rhul.ac.uk

†Authors marked with equally contributed to the manuscript as first authors.

‡Authors marked with equally contributed to the manuscript as last authors.

Introduction

Oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) is a rare late-onset muscular dystrophy characterized by progressive weakening of the extraocular and pharyngeal muscles, manifesting as ptosis and dysphagia, and at later stages of the disease as a weakening of proximal limb musculature.¹ The disease is caused by mutations in the *poly(A)-binding protein nuclear 1 (PABPN1)* gene that introduces an abnormal

expansion of polyalanine-encoding (GCN)_n trinucleotide repeats in the coding region of exon 1. PABPN1 plays crucial roles in regulating the poly(A) tail length on mRNAs,^{2,3} controlling the use of alternative polyadenylation sites,^{4,5} influencing pre-mRNA splicing,^{6,7} and also processing of long non-coding RNA (lncRNAs)⁸ and small nucleolar RNA (snoRNA).⁹ It also has an important role in poly(A)-mediated RNA decay or export from the nucleus² and in RNA hyperadenylation.¹⁰

Repeat alanine expansions with 11–18 repeats lead to a mutant expanded PABPN1 protein (expPABPN1), which causes misfolding, and subsequent accumulation of intranuclear aggregates in muscles.¹¹ The aggregates sequester wild-type PABPN1 among other essential components of the cell, thereby dysregulating essential functions of the cell.^{12–20} Interestingly, it has been shown that PABPN1 expression in muscles declines with age in healthy individuals, with OPMD patients presenting molecular signatures of premature ageing.^{12,21} Global approaches have generated a body of evidence—including mitochondrial defects, altered RNA metabolism, specific oxidative fibre atrophy, and increased proteasome activity—suggesting a premature ageing in OPMD muscles. This has also been implicated in the comparison of the molecular signature of OPMD patients and models of muscle ageing.¹² Altogether these data strongly suggest common features between OPMD and ageing. No cure currently exists for the disease; to correct ptosis and dysphagia, patients undergo surgical procedures that partially alleviate the symptoms. Recent clinical efforts have however shown promise with myoblast transplantation²² and small molecule drug therapies.^{23,24}

Myostatin acts as a negative regulator of muscle mass, and naturally occurring myostatin null mutants (such as the Piedmontese cattle, Texel sheep, and the bully whippet dogs) display a remarkable hypermuscular phenotype.²⁵ Myostatin signalling primarily occurs via the interaction of the activin receptor II B and bone morphogenetic protein pathways, with other pathways such as the IGF-1, p21/Cdk, and Wnt signalling are known to interact with myostatin signalling.^{25–27} Inhibition of myostatin has been reported to increase muscle mass and myofibre size (by cytoplasmic growth²⁷). A large number of strategies (involving propeptide, gene therapy, gene editing, ligand traps, and monoclonal antibodies) have been investigated to attenuate myostatin activity in both preclinical and clinical settings,^{28–34} especially in cases of cachexia, sarcopenia, muscular atrophy, and other muscular dystrophies such as Duchenne muscular dystrophy (DMD).^{35–40} An anti-myostatin strategy, while not targeting the underlying genetic cause of the disease, may lead to an improvement in the quality of life of patients by delaying the onset of locomotion and atrophy related disability. Though early clinical trials in DMD, or Becker's muscular dystrophy with the first generation anti-myostatin antibody MYO-029 displayed limited therapeutic potential,²⁹ other therapeutic candidates have been since developed. The anti-myostatin antibody RK35 developed by Pfizer presents a next generation hybridoma and has been previously tested in models of amyotrophic lateral sclerosis, nemaline myopathy, and DMD, where it demonstrated efficacy in improving muscle mass and function.^{32,41–43} The humanized equivalent of RK35 (Domagrozumab) is currently in clinical testing in DMD patients following a Phase 1 study in healthy volunteers.³² To our knowledge, this is the first report to examine the effect of inhibiting myostatin in a model of OPMD.

The A17 transgenic mouse over-expresses bovine expPABPN1 specifically in skeletal muscle,⁴⁴ and it is the most commonly used murine model of OPMD. This mouse exhibits loss of body mass, muscle atrophy, decreased muscle strength, transcriptomic dysregulation, and accumulation of insoluble aggregates in myonuclei.^{13,17} Here, we show that treatment of OPMD mice with the murine anti-myostatin monoclonal antibody RK35, while not affecting accumulation of intranuclear aggregates, prevents loss of body mass, muscle atrophy, and muscle strength and reduces deposition of fibrotic collagen proteins, which are relevant endpoints for a therapy targeting OPMD. Overall, our data support the clinical translation of myostatin inhibition to ameliorate symptoms of OPMD.

Material and methods

Animal handling

A17 and FvB mice were bred in-house, and all mice were housed individually with food and water *ad libitum* in a minimal disease facility at Royal Holloway, University of London. Individual mice were identified by ear-notching at about 4 weeks of age, and each mouse was monitored as per the recommendations of Animals (Scientific Procedures) Act (1986). Due to the heterozygous nature of the disease model, the OPMD mice were analysed to confirm the genotype by PCR, with primers directed against the bovine *PABPN1* insert (5'-GAACCAACAGACCAGGCATC-3' and 5'-GTGATGGTGATGATGACCGG-3'). The PCR cycle implemented initial denaturation at 95°C for 2 min, followed by 40 cycles of 95°C denaturation, 60°C for annealing, and 72°C for extension with each step lasting for 30 s. The final extension was conducted at 72°C for 10 min.¹⁷

Male 12-week-old mice were weighed prior to each injection. Initial body weights were used to evenly distribute animals among cohorts to ensure equivalent average body weights prior to the commencement of experimental protocols. In this experiment, we administered the anti-myostatin blocking antibody RK35 [Pfizer, USA; diluted in sterile saline (Sigma Aldrich, UK) for a final volume of 200 µL] which was injected at 10 mg/kg weekly i.p. for 10 weeks into 9 A17 mice (disease model for OPMD) and 8 FvB (littermate strain control) mice. A further 10 A17 mice and 9 FvB mice were administered the vehicle (sterile saline) as a control in the experiment.

Forelimb grip strength analysis

To assess the forelimb grip strength of the animals, mice were allowed to rest on an angled mesh assembly, facing away from the meter (Linton Instrumentation, Norfolk, UK) and with its hind limbs not in contact with the mesh. A pulling

force was exerted on the tail of the mouse parallel to the angle of the mesh, causing the animal to resist with both forelimbs. The force was recorded as the maximal force over a period of 30-s, with five observations recorded per day. To prevent habituation of the mice, the test was performed over 3 days in 30-s intervals of data collection and rest, over five observations per day resulting in 15 observations per mouse. Procedures were performed in accordance with Treat-NMD protocols.

In situ muscle electrophysiology

At the end of the experiment, muscle function was assessed using the right tibialis anterior (TA) muscle. A17 and FvB mice were deeply anaesthetized by using a mix of Hypnorm/Hypnovel solution (i.p.) and were carefully monitored throughout the experiment to ensure that there was no reflex response to toe pinch. The distal tendon of the TA muscle was dissected from surrounding tissue and tied with 4.0 braided surgical silk (Interfocus, Cambridge, UK). The sciatic nerve was exposed and superfluous branches axotomized, leaving the TA motor innervation via the common peroneal nerve intact. The foot was secured to a platform and the ankle and knee immobilized using stainless steel pins. The TA tendon was attached to the lever arm of a 305B dual-mode servomotor transducer (Aurora Scientific, Ontario, Canada) via a custom-made steel s-hook. TA muscle contractions were elicited by stimulating the distal part of common peroneal nerve via bipolar platinum electrodes, using supramaximal square-wave pulses of 0.02 ms (701A stimulator; Aurora Scientific). Data acquisition and control of the servomotors were conducted using a Lab-View-based DMC programme (Dynamic muscle control and Data Acquisition; Aurora Scientific). Optimal muscle length (L_0) was determined by incrementally stretching the muscle using micromanipulators until the maximum isometric twitch force was achieved. Maximum isometric tetanic force (P_0) was determined from the plateau of the force–frequency relationship following a series of stimulations at 10, 30, 40, 50, 80, 100, 120, and 150 Hz. The specific force (N/cm^2) was calculated by dividing P_0 by TA muscle cross-sectional area. Overall cross-sectional area was estimated using previously established protocols.¹³

Sample collection and processing

Mice were euthanized 1 week after the last injection of RK35, and TA, extensor digitorum longus (EDL), and soleus muscles were harvested, weighed and mounted in O.C.T. compound (Thermo Fisher Scientific, Leicestershire, UK), frozen in 2-methylbutane (isopentane) chilled with liquid nitrogen, and stored at -80°C .

Histological and immunohistochemical analysis

Transverse sections of the tissue were sectioned at 10 to 12 different intervals at a thickness of 10 μm , along the length of the muscle, allowing the maximal cross-sectional area to be determined, and the sections mounted on coated slides (VWR International, Leicestershire, UK), and stored at -80°C . Transverse sections of the TA and EDL were air-dried, fixed, and stained with anti-PABPN1 (rabbit monoclonal, diluted 1:100, Abcam ab75855, overnight at 4°C), anti-laminin (rat monoclonal, diluted 1:800, Sigma-Aldrich L0663, 1 h at room temperature), and anti-collagen VI (rabbit polyclonal, Abcam ab6588, 1:200, 1 h room temperature) antibodies or with picosirius red using previously established protocols.¹³ Slides were stained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) to visualize nuclei, and coverslips were mounted using mounting medium (Vector Labs, California, USA). Whole muscle images (for laminin based fibre morphometry) or random fields (for PABPN1 and collagen immunostaining) were captured using a microscope (Zeiss, Cambridge, UK). For analysis of fibre morphometry, the median diameter from 1000 or 400 randomly selected fibres were determined respectively for TA and EDL muscles for each individual animal analysed. For analysis of succinate dehydrogenase (SDH) activity, tissue sections were incubated in the dark for an hour, in a solution of 0.1 M Na_2HPO_4 , 0.1 M NaH_2PO_4 , 0.1 M sodium succinate, and 2.4 mM nitro-blue tetrazolium (Sigma Aldrich, UK), and random fields were analysed for the percentage of SDH positive fibres.

Quantitative PCR analysis

Total RNA was extracted from frozen skeletal muscles biopsies using Trizol (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. RNA samples were quantified using a ND-1000 NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies). RNA (50–250 ng) was reverse transcribed using M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. cDNA was used for quantitative PCR reaction using SYBR green mix buffer (LightCycler® 480 Sybr green I Master) in a total of 9 μL reaction volume. PCR reaction was carried out as follows: 8 min at 95°C followed by 50 cycles: 15 s at 95°C , 15 s at 60°C , and 15 s at 72°C . Specificity of the PCR products was checked by melting curve analysis using the following programme: 65°C increasing by $0.11^\circ\text{C}/\text{s}$ to 97°C . The expression level of each mRNA was normalized to that of murine RPLP0 mRNA (large ribosomal protein, subunit P0) expression. Expression levels were calculated according to the DDCT method. Primers were designed to target *Myh2* (5'-ACTTTGGCACTACGGGAAAC-3' and 5'-CAGCAGCATTTTCGATCAGCTC-3'), *Myh4* (5'-CTTTGC TTACGTCAGTCAAGGT-3' and 5'-AGCGCCTGTGAGCTTGAAAA-3'), and *Rplp0* as a housekeeping control (5'-GAGGACCTCAC TGAGATTCGG-3' and 5'-TTCTGAGCTGGCACAGTGAC-3').

Statistical analyses

After checking for the conditions of normality and homoscedasticity, a one way analysis of variance (ANOVA) was performed to compare multiple groups. Multiple comparison were performed with the Benjamini, Hochberg, and Yekutieli correction for the false discovery rate (FDR) to correct for multiple testing used. All descriptive statistical techniques were performed using GraphPad Prism v7.00 (GraphPad Software, California, USA).

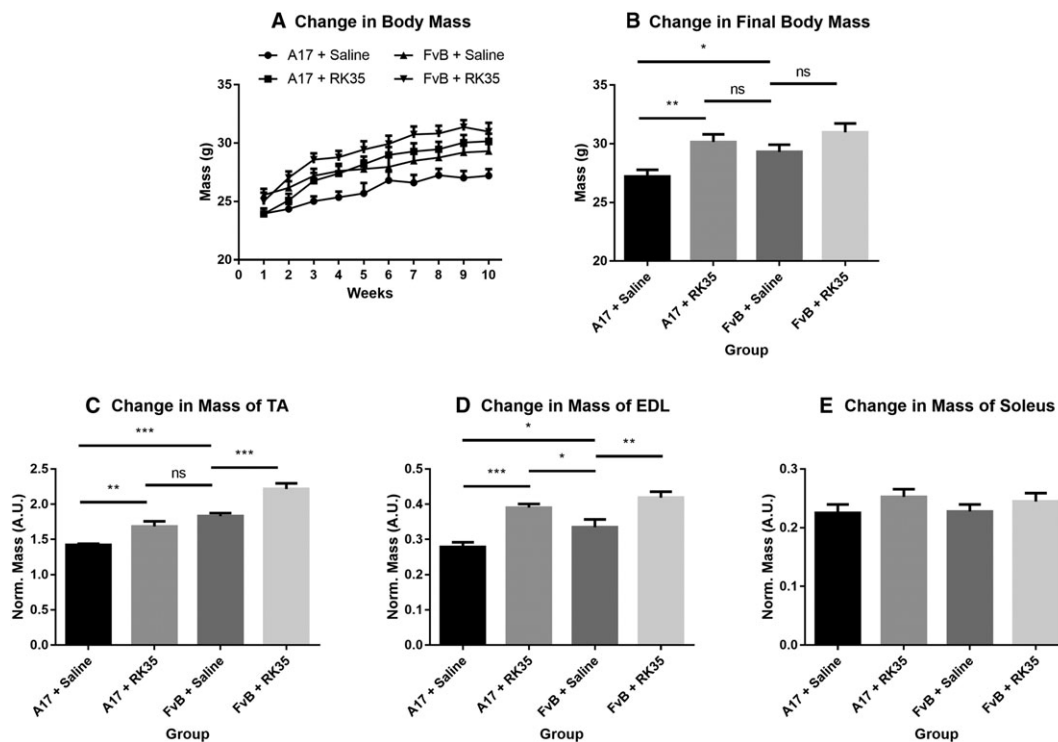
Results

Anti-myostatin antibody RK35 treatment significantly reduces loss of body mass and muscle atrophy in A17 mice

Twelve-week-old A17 (OPMD mice) and FvB (WT; wild-type strain control) mice were treated by weekly intraperitoneal (i.p.) injection of RK35 antibody (10 mg/kg in saline) or saline

over a 10-week period. Body mass, which has been correlated to muscle strength and is considered a rapid and longitudinal method to follow disease progression,⁴⁵ was measured weekly. The treatment was well tolerated, and all mice grew during the 10-week time treatment (Figure 1A). At the end of the experiment, saline-treated OPMD mice had significantly lower body mass than saline-treated WT mice (8% reduction; $P < 0.05$). Administration of RK35 antibody resulted in an increase of 11% ($P < 0.01$) in the final body mass of OPMD mice when compared to saline-treated OPMD mice, normalizing it to that of saline-treated WT control mice (Figure 1B). In this A17 OPMD model, myopathy induces muscle atrophy.^{17,44} As different mammalian muscle fibre types possess varying sensitivities to this pathophysiological atrophy, three distinct muscles (TA, EDL, and soleus which are composed of mixed fibre type, a majority of type IIb fibres, and a majority of type I fibres, respectively⁴⁶) were examined. The muscle mass of both TA and EDL increased after treatment by about 19% ($P < 0.01$) and 41% ($P < 0.01$), respectively (Figure 1C–D), in A17 mice treated with RK35 compared with mice treated with saline. The

Figure 1 Treatment with RK35 antibody significantly increases body mass in A17 mice: Mice ($n = 8–10$) were weighed and administered a weekly regimen of either saline or the RK35 antibody (10 mg/kg i.p.) for 10 weeks from the 12th week of age. (A) The average body mass per group plotted against weeks shows that body mass increases in all groups of mice. (B) The average body mass at the final week shows that A17 mice treated with RK35 antibody are heavier than A17 mice treated with saline. TA (C), EDL (D), and soleus (E) were sampled, and mean mass of all muscles were normalized to the initial body mass. Muscle masses of the TA and EDL were increased in both the treated oculopharyngeal muscular dystrophy and control mice, with no change observed in the soleus. Data presented as mean \pm standard error of the mean, with P -values obtained by analysis of variance after a false discovery rate correction ($*P < 0.05$ and $**P < 0.01$). EDL, extensor digitorum longus; TA, tibialis anterior.

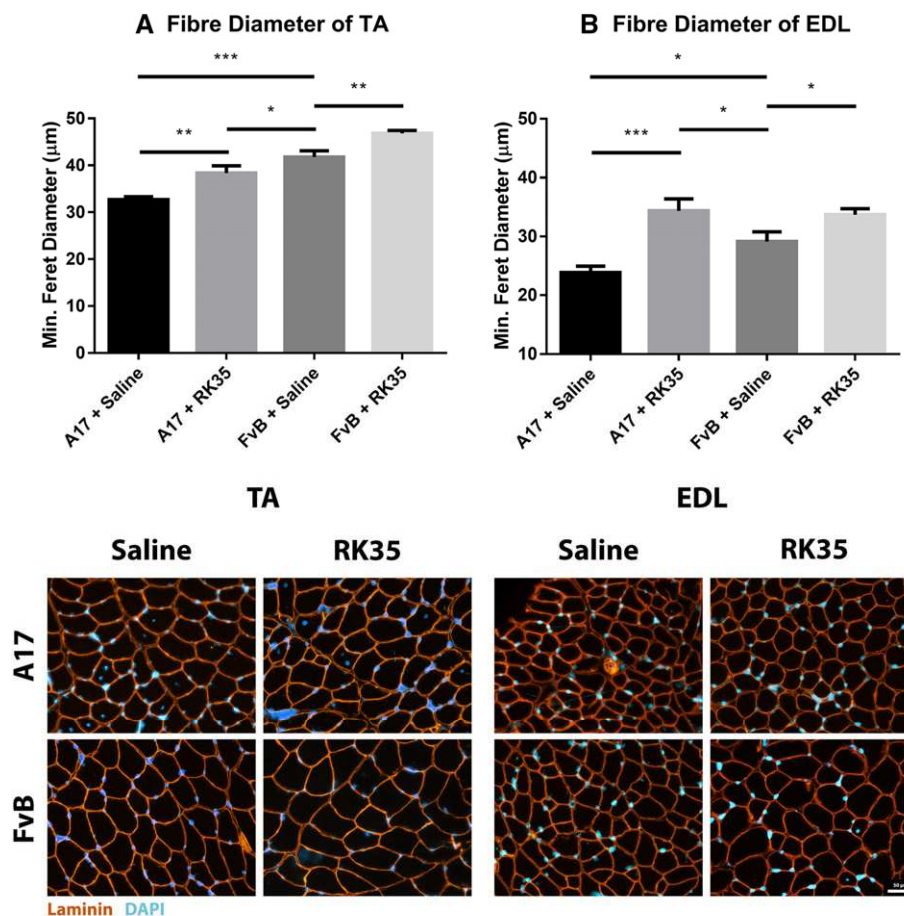


muscle mass of TA and EDL of RK35 treated A17 mice was either not significantly different to those of wild-type FvB controls (TA muscles, $P > 0.05$) or significantly heavier (EDL muscles, 14% heavier, $P < 0.05$) (Figure 1C–D). Similar changes were observed for TA and EDL muscles of treated FvB mice; TA and EDL muscles of RK35 treated wild-type FvB mice were 18% ($P < 0.01$) and 20% ($P < 0.01$) heavier than muscles of saline-treated FvB mice, respectively (Figure 1C–D). Muscle mass of soleus was not affected by the treatment with RK35 in either A17 or FvB mice (Figure 1E). This was not unexpected because myostatin null mutants display minimal change in the contractile properties of the soleus.⁴⁷ *These data demonstrate that a systemic treatment with clinically relevant doses of RK35 antibody significantly increases the body and the muscle masses of the TA and EDL in OPMD mice.*

RK35 treatment improves the histopathology of oculopharyngeal muscular dystrophy

To further characterize the increase in muscle mass observed in treated mice, average myofibre size was measured in TA and EDL muscles. Whole muscle cross sections were stained with anti-laminin antibodies, blinded, and analysed for myofibre size assessing the minimum Feret's diameter. The average myofibre cross-sectional area of TA and EDL muscles of A17 mice were 28% ($P < 0.001$) and 22% ($P < 0.001$) smaller compared to FvB mice (Figure 2). Administration of the RK35 antibody in A17 mice resulted in a significant increase in the average diameter of TA (17%, $P < 0.01$) and EDL myofibres (44%, $P < 0.001$) respectively, when compared to saline-treated A17 mice (Figure 2A–D).

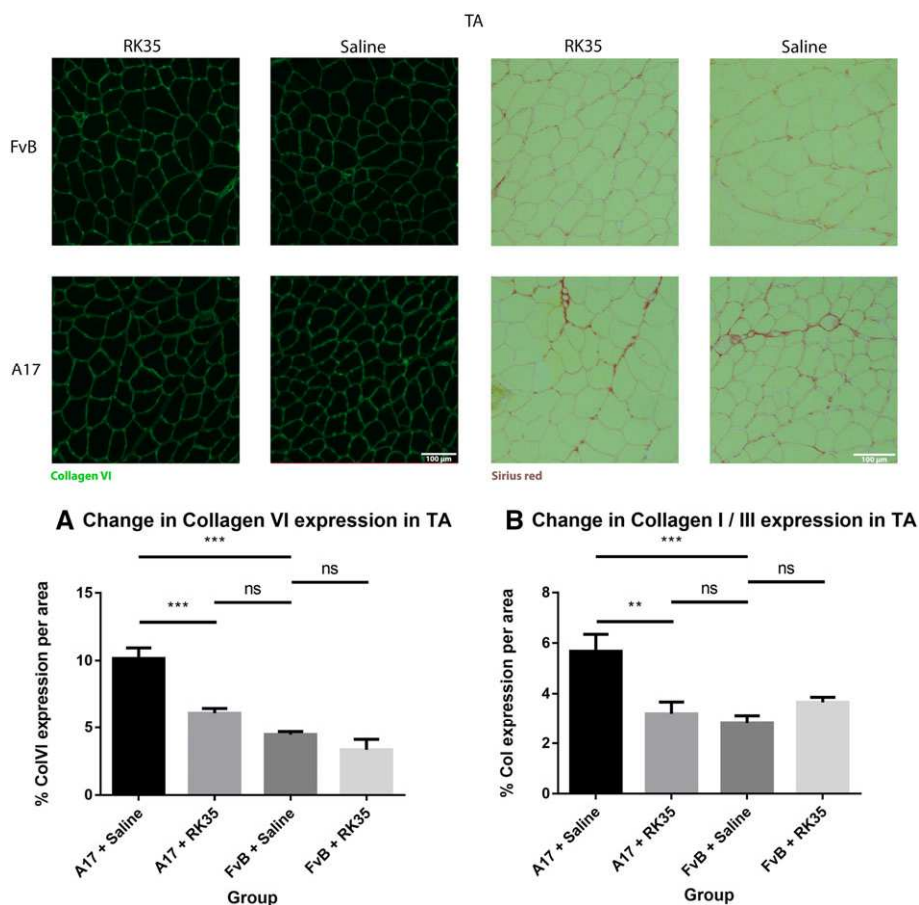
Figure 2 Treatment with RK35 antibody increases myofibre diameter in oculopharyngeal muscular dystrophy mice: Mice were administered with a weekly regimen of either saline or the RK35 antibody (10 mg/kg IP) for 10 weeks from 12-week of age. Muscle samples from five randomly selected mice per group were sectioned and immunostained for laminin. (A) 1000 fibres were randomly selected for the TA, whereas (B) 400 fibres were randomly selected for the EDL, and the median minimum Feret diameter was analysed. The mice treated with the antibody consistently displayed an increased myofiber diameter, with the muscle mass of the disease model either normalized to or exceeding the FvB controls. The average median minimum feret diameter per group was plotted, with bars representing standard error of the mean, with P -values obtained by analysis of variance after a false discovery rate correction ($*P < 0.05$ and $**P < 0.01$). EDL, extensor digitorum longus; TA, tibialis anterior.



Muscle fibrosis is a distinct histopathological feature of affected OPMD muscles in humans. To study the effect of a RK35-mediated myostatin inhibition on collagen protein deposition and fibrosis in the A17 mouse, TA muscle sections from RK35 or saline-treated mice were stained with either picosirius red (to detect collagen proteins I and III) or with an antibody against collagen VI. TA muscles of saline-treated A17 have 56% ($P < 0.001$) increased area of collagen VI deposition and 51% ($P < 0.01$) increased deposition of collagens I and III compared to muscles of age-matched saline-treated FvB mice (Figure 3A,B). Inhibition of myostatin in A17 mice reduced deposition of collagen VI in the TA muscle by 40% ($P < 0.001$), and of collagens I and III by 44% ($P < 0.01$) when compared to saline-treated A17 mice normalizing the area covered by collagen proteins to the level observed in wild type mice (Figure 3A–B). One of the characteristic histopathological hallmarks of OPMD is the aggregation of expPABPN1 in muscle tissues.^{1,48}

To evaluate if inhibition of myostatin in A17 mice resulted in any change in the aggregate content, TA muscle sections from mice treated with RK35 were stained with antibody to PABPN1 and percentage of myonuclei with insoluble aggregates calculated. As expected, the percentage of myonuclei containing aggregates in wild-type FvB mice was negligible ($<1\%$ of observed nuclei) and significantly higher in the saline-treated A17 mice ($36\% \pm 0.79\%$, $P < 0.001$; Figure S1A–F). Administration of RK35 antibody did not change the percentage of myonuclei containing aggregates in treated A17 (Figure S1A–F). We additionally analysed the effect of inhibition of myostatin by the antibody RK35 on myofibre metabolism and fibre type, using two methodologies: measuring change in expression levels of SDH and expression of two transcripts related to myofibre type: *Myh2* and *Myh4* (coding for myosin type IIa and type IIb respectively; cDNA generated from a muscle extract of TA). We report no significant differences observed

Figure 3 Treatment with RK35 antibody reduces collagen deposition in muscles of oculopharyngeal muscular dystrophy mice: Mice were administered with a weekly regimen of either saline or the RK35 antibody (10 mg/kg i.p.) for 10 weeks from 12-week of age. Five randomly selected whole TA muscle sections from all groups were stained for (A) collagen VI and (B) picosirius red, and five random fields were imaged and analysed for the percentage area of collagen staining. The mice treated with the antibody consistently displayed a reduced collagen deposition, with the area of collagen in the disease model normalized to wild-type levels. The average area per group is plotted, bars representing standard error of the mean, with P -values obtained by analysis of variance after a false discovery rate correction ($*P < 0.05$ and $**P < 0.01$). TA, tibialis anterior.



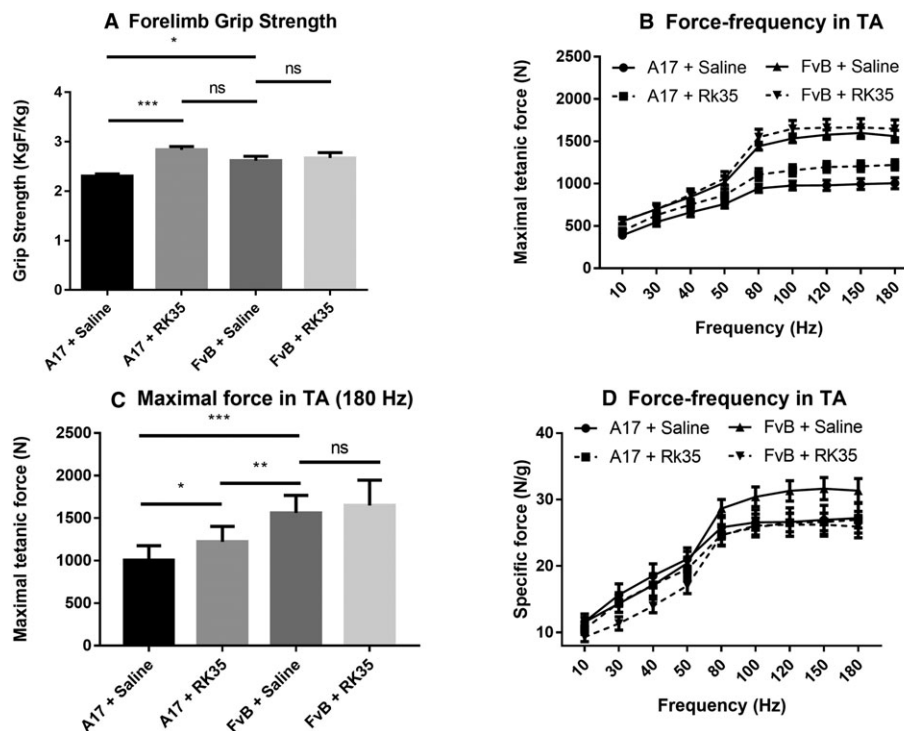
between the groups studied (Figure S2A–D). These data show that the anti-myostatin treatment significantly reduces myofibre atrophy and muscle fibrosis by altering biological pathways that do not affect the formation of aggregates in muscles or fibre type of A17 mice.

RK35 mediated increase in muscle mass is accompanied by an increase in muscle strength

Forelimb grip strength was measured in A17 and FvB mice treated with the RK35 antibody or saline. The forelimb strength of the A17 mice was 13% lower ($P < 0.05$) than that of FvB control mice which likely reflects the atrophic and fibrotic condition of OPMD affected muscles (Figure 4A). The administration of RK35 in A17 mice significantly increased the forelimb strength by 23% ($P < 0.001$) when compared to the saline-treated A17 mice. This increase in grip strength resulted in mice being equally strong as saline-treated FvB control mice (Figure 4A). On the contrary, the

treatment with RK35 antibody did not modify the forelimb strength of treated FvB mice (Figure 4A). Because this in-life measure is not a pure readout of muscle strength, as it is dependent upon neurological, anatomical, and behavioural factors, the direct effect of myostatin inhibition on skeletal muscle force production was assessed by measuring maximal tetanic force generated in response to a series of increasing stimulation frequencies by *in situ* muscle electrophysiology. The maximal tetanic force generated by TA muscles of A17 mice was 55% ($P < 0.001$) lower than that of FvB controls (Figure 4B,C). Administration of RK35 antibody to A17 mice significantly increased the maximum tetanic force of TA muscles compared to saline-treated A17 mice by 18% ($P < 0.05$) while no change in maximum tetanic force was observed between TA of RK35 treated and saline-treated FvB mice. Normalizing the maximum tetanic force with the calculated muscle cross-sectional area yields specific maximal force, a measurement that expresses the force of the muscle per unit of area. No difference was observed in specific maximal force for TA muscles between any of the groups

Figure 4 Treatment with RK35 increases muscle strength in oculopharyngeal muscular dystrophy mice: Mice ($n = 8–10$) were administered with a weekly regimen of either saline or the RK35 antibody (10 mg/kg IP) for 10 weeks from 12-week of age. (A) Forelimb grip strength was analysed and the average of 15 measurements per mouse, per group is plotted, bars representing standard error of the mean, with P -values obtained by analysis of variance after a false discovery rate correction. (B–D) The left TA from all groups were mounted on a mechanotransducer and the sciatic nerve was excited (B) average max. force generated at increasing frequencies is plotted. (C) The average max. force generated at 180 Hz is plotted, with bars representing standard error of the mean. The gross muscle strength of the disease model mice treated with the antibody displayed an increased grip strength, although a similar effect was not observed in the control mice. (D) Maximal force values were normalized with the muscle cross-sectional area to obtain specific force of TA at 180 Hz, and no significant differences observed between the groups. Data presented as mean \pm standard error of the mean, with P -values obtained by analysis of variance after a false discovery rate correction ($*P < 0.05$ and $**P < 0.01$). TA, tibialis anterior.



analysed (data not shown). Finally, as the treatment with RK35 affected the body weight and the muscle mass of A17 mice, we evaluated the locomotor behaviour to exclude any detrimental effect of such treatment. No change in voluntary locomotion between the saline-treated and RK35 treated mice was detected, nor a change was observed between the A17 and FvB mice (data not shown). *Overall, these data show that in RK35 treated A17 mice the muscle force increases with the hypertrophic effect and this is reflected in an improved limb strength.*

Discussion

Myostatin is a negative regulator of muscle mass. The efficacy of myostatin blockade by the monoclonal antibody RK35 has been examined in the murine models of amyotrophic lateral sclerosis, DMD, and nemaline myopathy,^{41–43} and this antibody is currently in phase II clinical trial for DMD (NCT02907619 and NCT02310763). In this study, we tested the effect of myostatin inhibition to ameliorate atrophic symptoms in the A17 OPMD mouse model system using this antibody. The A17 mice co-express a pathological expPABPN1 transgene in skeletal muscles to mimic the disease at a tissue level. Early studies in the A17 model have reported the onset of loss of muscle force by 18 weeks of age. To evaluate the efficacy of myostatin inhibition before the pathological onset of disease in terms of delaying disease progression, we treated the A17 disease model with the anti-myostatin antibody RK35 for 10 weeks, from the 12th week of age. As previously shown,¹⁷ our study confirmed that A17 mouse model at 22 weeks of age (i.e. at the end of the treatment) has lower body and muscle mass as compared to the FvB age-matched controls. The lower muscle mass was accompanied by an atrophy of the muscles, and an increased level of observed fibrosis markers resulting in a lower functional quality of muscles as compared to the saline-treated wild-type FvB mice. The treatment with RK35 antibody resulted in the reversal of loss of body mass in the OPMD model. The increase in body mass was most evident during the first 5 weeks of the 10-week treatment regimen, after which the difference was maintained. Using the same antibody, a similar effect in DMD and nemaline myopathy models was observed by St. Andre *et al.*⁴³ and Tinklenberg *et al.*,⁴¹ respectively. The increased response to the antibody (in terms of change in muscle mass) we observed in the EDL compared to the TA and soleus muscles is likely due to the myofibrillar metabolic profile of glycolytic fast-twitch fibres that cause an increased production of myostatin transcripts and an increased density of the activin receptor II B receptors to be present in the EDL.⁴⁷ This observation is particularly interesting as OPMD disease progression is reported to be more specific in fast-twitch muscle fibres, such as those

found in the EDL.¹⁷ The increase in muscle size observed in muscles of the A17 mice treated with RK35 is promising, as it indicates that inhibition of myostatin may be a valid strategy to counteract the loss of muscle mass in OPMD human patients. Skeletal muscles form the most abundant tissue in the body and maintain the energy balance of the organism by regulating glucose availability in the blood serum. Indeed, muscles absorb glucose which are then stored or oxidized subsequent to a contraction induced/(postprandial secreted) insulin induced signals. We speculate that this increase in muscle mass may assist to further attenuate any secondary effects in systemic metabolism that may arise from muscular atrophy, by perhaps increasing insulin sensitivity of the organism.

Muscle fibrosis forms an essential step in both myogenesis and in muscle regeneration where it helps reforming the contractile unit from myofibre stumps after damage.^{49,50} However, in OPMD, the fibrotic deposition is mainly pathological and it is associated with a defective muscle functionality perhaps contributing to dysphagia and ptosis in OPMD subjects. The reduction in the area of fibrotic collagen deposition in the TA is promising and indicates a prevention of loss of structural integrity of skeletal muscles. This might be related to the effect of myostatin inhibition in inducing apoptosis of fibroblasts.⁵¹ Again, the effect of RK35 on fibrosis may be crucially important to preserve and possibly restore the functionality of affected muscles of human OPMD subjects.

The increase in muscle mass and the reduction in pathological fibrosis is correlated to an increase in grip strength and maximal tetanic force, corresponding to an improvement in gross muscle function in the treated A17 mice. No such effect was evident in the treated wild-type FvB mice despite of an increase in muscle mass. This indicates that the antibody treatment may be more effective in atrophic muscles than in healthy muscles most likely because healthy muscles may have already attained the maximal possible biological myofibre diameter.

Among the other therapeutic strategies under clinical and preclinical development for muscular dystrophies, the anti-myostatin antibody strategy has some advantages. Firstly, the systemic and non-invasive method of drug administration can ameliorate symptoms in all affected muscles as opposed to specific muscles that are targeted by other locally administered agents (i.e. gene therapy vectors and myoblast transplantation). Furthermore, monoclonal antibodies are less costly to produce, easier to attain regulatory approval, and translate into clinical trials than other gene and cell therapy approaches.⁵² This strategy has the potential to be used as an adjuvant therapy⁵³ of pharmacological treatments currently in preclinical and clinical development (i.e. trehalose) or gene therapy¹³ that target aggregate formation without addressing the issue of pre-existing muscle atrophy or fibrosis. An interesting observation relating to the disease condition

itself revolves around the fact that an improvement in muscle force and rescue of muscle atrophy was evident without affecting the number of intranuclear aggregates. While the exact mechanisms associated with disease progression with respect to aggregate formation remains to be elucidated, our results may suggest that the presence of aggregates does not preclude an increase in muscle hypertrophy. Notably, this demonstrates that a treatment strategy that does not target the affect the aggregate formation in muscle might be clinically viable in OPMD. Future experiments can be conducted in order to elucidate the effect of an anti-myostatin treatment regimen on the signalling pathways of the disease model. In conclusion, we report that a systemic administration of an anti-myostatin monoclonal antibody delays disease progression in the OPMD mouse model and, as such, is a promising therapeutic strategy to be explored.

Acknowledgements

The authors wish to thank Jane Owens, Michael St-Andre, Carl Morris, and other colleagues at Pfizer for providing the antibody RK35 and for support designing the study. The authors also wish to acknowledge Martine Oloko for technical assistance during the course of the study. P.H. also wishes to thank S. Harish and H. Parameshwaran for their support. The authors certify that they comply with the ethical guidelines for authorship and publishing of the *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*.⁵⁴ All data supporting this study is provided either in the Results section of the manuscript or as supplementary information accompanying this paper. P.H., A.M., C.T., L.P., and G.D. designed the study. P.H., A.M., L.F., N.L., O.C., and F.R. collected, analysed and interpreted data. P.H. and A.M. participated in manuscript preparation. All authors provided manuscript review and revisions.

Online supplementary material

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

References

1. Harish P, Malerba A, Dickson G, Bachtarzi H. progress on gene therapy, cell therapy, and pharmacological strategies toward the treatment of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Hum Gene Ther* 2015;**26**: 286–292.
2. Apponi LH, Leung SW, Williams KR, Valentini SR, Corbett AH, Pavlath GK. Loss of nuclear poly(A)-binding protein 1 causes defects in myogenesis and mRNA biogenesis. *Hum Mol Genet* 2010;**19**: 1058–1065.
3. Benoit B, Mitou G, Chartier A, Temme C, Zaessinger S, Wahle E, et al. An essential cytoplasmic function for the nuclear poly(A)-binding protein, PABP2, in poly(A) tail length control and early development in *Drosophila*. *Dev Cell* 2005;**9**:511–522.
4. Jenal M, Elkon R, Loayza-Puch F, Van Haaften G, Kühn U, Menzies FM, et al. The poly(A)-binding protein nuclear 1 suppresses alternative cleavage and polyadenylation sites. *Cell* 2012;**149**: 538–553.
5. de Klerk E, Venema A, Anvar SY, Goeman JJ, Hu O, Trollet C, et al. Poly(A) binding protein nuclear 1 levels affect alternative polyadenylation. *Nucleic Acids Res* 2012;**40**:9089–9101.
6. Bergeron D, Pal G, Beaulieu YB, Chabot B, Bachand F. Regulated intron retention and nuclear pre-mRNA decay contribute to PABPN1 autoregulation. *Mol Cell Biol* 2015;**35**:2503–2517.
7. Muniz L, Davidson L, West S. Poly(A) Polymerase and the nuclear poly(A) binding

Figure S1. Treatment with RK35 does not affect the amount of intranuclear aggregates: Mice were subject to a weekly regimen of either saline or the anti-myostatin RK35 antibody i.p. for 10 weeks from the 12th week of age till the 22nd week of age. Five muscle samples from all groups were stained for bovine PABPN1 after a 1M KCl treatment, and 5 random fields were imaged and analysed for the percentage number of positive PABPN1 stains to all myonuclei. The administration of the treatment regimen did not change the number of intranuclear aggregates observed. The average density is plotted, bars representing SEM, with p-values obtained by ANOVA after a FDR correction (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Figure S2. Treatment with RK35 does not affect myofibre type or myofibre oxidative capacity in the OPMD model mice: Mice were subject to a weekly regimen of either saline or the anti-myostatin RK35 antibody i.p. for 10 weeks from the 12th week of age till the 22nd week of age. Five muscle samples from the A17 mice treated with saline or RK35 were stained for SDH activity. Random fields from different regions of the TA; namely the (a) superficial TA (region around the periphery of the muscle wherein a higher density of fast-twitch fibres are found) and (b) deep TA (the central portion of the muscle having a higher density of slow fibres) were analysed separately. The administration of the treatment regimen did not change the number of SDH positive fibres observed. The percentage SDH positive fibres is plotted, bars representing SEM, with p-values obtained by a t-test (no significant differences observed between groups). Additionally, a qPCR was performed in order to investigate the transcript levels of the myosin heavy chains (c) IIa (encoded by *myh2*) and (d) IIb (encoded by *myh4*), with values normalised to the levels of RPLP0. The normalised mean abundance of transcripts are plotted, bars representing SEM, with p-values obtained by ANOVA after a FDR correction (no significant changes observed between groups).

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

- protein, PABPN1, coordinate the splicing and degradation of a subset of human pre-mRNAs. *Mol Cell Biol* 2015;**35**:2218–2230.
8. Beaulieu YB, Kleinman CL, Landry-Voyer AM, Majewski J, Bachand F. Polyadenylation-dependent control of long noncoding RNA expression by the poly(A)-binding protein nuclear 1. *PLoS Genet* 2012;**8**:e1003078.
 9. Lemay J-F, Lemieux C, St-André O, Bachand F. Crossing the borders: poly(A)-binding proteins working on both sides of the fence. *RNA Biol* 2010;**7**:291–295.
 10. Bresson SM, Conrad NK. The human nuclear poly(A)-binding protein promotes RNA hyperadenylation and decay. *PLoS Genet* 2013;**9**:e1003893.
 11. Calado A, Tome FM, Brais B, Rouleau GA, Kuhn U, Wahle E, et al. Nuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy consist of poly(A) binding protein 2 aggregates which sequester poly(A) RNA. *Hum Mol Genet* 2000;**9**:2321–2328.
 12. Anvar SY, Raz Y, Verwey N, Van der Sluijs B, Venema A, Goeman JJ, et al. A decline in PABPN1 induces progressive muscle weakness in oculopharyngeal muscle dystrophy and in muscle aging. *Aging (Albany NY)* 2013;**5**:412–426.
 13. Malerba A, Klein P, Bachtarzi H, Jarmin SA, Cordova G, Ferry A, et al. PABPN1 gene therapy for oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nat Commun* 2017;**8**:14848.
 14. Vest KE, Phillips BL, Banerjee A, Apponi LH, Dammer EB, Xu W, et al. Novel mouse models of oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) reveal early onset mitochondrial defects and suggest loss of PABPN1 may contribute to pathology. *Hum Mol Genet* 2017;**26**:3235–3252.
 15. Apponi LH, Corbett AH, Pavlath GK. Control of mRNA stability contributes to low levels of nuclear poly(A) binding protein 1 (PABPN1) in skeletal muscle. *Skelet Muscle* 2013;**3**:23.
 16. Banerjee A, Vest KE, Pavlath GK, Corbett AH. Nuclear poly(A) binding protein 1 (PABPN1) and Matrin3 interact in muscle cells and regulate RNA processing. *Nucleic Acids Res* 2017;**45**:10706–10725.
 17. Trollet C, Anvar SY, Venema A, Hargreaves IP, Foster K, Vignaud A, et al. Molecular and phenotypic characterization of a mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy reveals severe muscular atrophy restricted to fast glycolytic fibres. *Hum Mol Genet* 2010;**19**:2191–2207.
 18. Anvar S, 't Hoen PA, Venema A, van der Sluijs B, van Engelen B, Snoeck M, et al. Deregulation of the ubiquitin-proteasome system is the predominant molecular pathology in OPMD animal models and patients. *Skelet Muscle* 2011;**1**:15.
 19. Davies JE, Rubinsztein DC. Over-expression of BCL2 rescues muscle weakness in a mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 2011;**20**:1154–1163.
 20. Davies JE, Sarkar S, Rubinsztein DC. Wild-type PABPN1 is anti-apoptotic and reduces toxicity of the oculopharyngeal muscular dystrophy mutation. *Hum Mol Genet* 2008;**17**:1097–1108.
 21. Raz Y, Raz V. Oculopharyngeal muscular dystrophy as a paradigm for muscle aging. *Front Aging Neurosci* 2014;**6**:317.
 22. Perie S, Trollet C, Mouly V, Vanneaux V, Mamchaoui K, Bouazza B, et al. Autologous myoblast transplantation for oculopharyngeal muscular dystrophy: a phase I/IIa clinical study. *Mol Ther* 2014;**22**:219–225.
 23. Argov Z, Gilko-Kabir I, Brais B, Caraco Y, Megiddo D. Intravenous trehalose improves dysphagia and muscle function in oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD): preliminary results of 24 weeks open label phase 2 trial (S28. 004). *Neurology* 2016;**86**:S28–S004.
 24. Argov Z, Vornovitsky H, Blumen S, Caraco Y. First human use of high dose IV trehalose: safety, tolerability and pharmacokinetic results from the oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) therapy trial (P7. 068). *Neurology* 2015;**84**:P7–P068.
 25. Lee S-J. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;**20**:61–86.
 26. Rodgers BD, Garikipati DK. Clinical, agricultural, and evolutionary biology of myostatin: a comparative review. *Endocr Rev* 2008;**29**:513–534.
 27. Sartori R, Schirwis E, Blaauw B, Bortolanza S, Zhao J, Enzo E, et al. BMP signaling controls muscle mass. *Nat Genet* 2013;**45**:1309–1318.
 28. Wagner KR, McPherron AC, Winik N, Lee SJ. Loss of myostatin attenuates severity of muscular dystrophy in mdx mice. *Ann Neurol* 2002;**52**:832–836.
 29. Wagner KR, Fleckenstein JL, Amato AA, Barohn RJ, Bushby K, Escolar DM, et al. A phase I/II trial of MYO-029 in adult subjects with muscular dystrophy. *Ann Neurol* 2008;**63**:561–571.
 30. Mendell JR, Sahenk Z, Malik V, Gomez AM, Flanigan KM, Lowes LP, et al. A phase 1/2a follistatin gene therapy trial for Becker muscular dystrophy. *Mol Ther* 2015;**23**:192–201.
 31. Mendell JR, Sahenk Z, Al-Zaidy S, Rodino-Klapac LR, Lowes LP, Alfano LN, et al. Follistatin gene therapy for sporadic inclusion body myositis improves functional outcomes. *Mol Ther* 2017;**25**:870–879.
 32. Bhattacharya I, Pawlak S, Marraffino S, Christensen J, Sherlock SP, Alvey C, et al. Safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of domagrozumab (PF-06252616), an antimyostatin monoclonal antibody, in healthy subjects. *Clin Pharmacol drug Dev* 2017;**7**:484–497.
 33. Campbell C, McMillan HJ, Mah JK, Tarnopolsky M, Selby K, McClure T, et al. Myostatin inhibitor ACE-031 treatment of ambulatory boys with Duchenne muscular dystrophy: results of a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Muscle Nerve* 2017;**55**:458–464.
 34. Bogdanovich S, Perkins KJ, Krag TOB, Whittemore L-A, Khurana TS. Myostatin propeptide-mediated amelioration of dystrophic pathophysiology. *FASEB J* 2005;**19**:543–549.
 35. Siriett V, Salerno MS, Berry C, Nicholas G, Bower R, Kambadur R, et al. Antagonism of myostatin enhances muscle regeneration during sarcopenia. *Mol Ther* 2007;**15**:1463–1470.
 36. Gilson H, Schakman O, Combaret L, Lause P, Grobet L, Attaix D, et al. Myostatin gene deletion prevents glucocorticoid-induced muscle atrophy. *Endocrinology* 2007;**148**:452–460.
 37. Zhang L, Rajan V, Lin E, Hu Z, Han HQ, Zhou X, et al. Pharmacological inhibition of myostatin suppresses systemic inflammation and muscle atrophy in mice with chronic kidney disease. *FASEB J* 2011;**25**:1653–1663.
 38. Bogdanovich S, Krag TOB, Barton ER, Morris LD, Whittemore L-A, Ahima RS, et al. Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature* 2002;**420**:418–421.
 39. Whittemore L-A, Song K, Li X, Aghajanian J, Davies M, Girgenrath S, et al. Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;**300**:965–971.
 40. Klimek MEB, Aydogdu T, Link MJ, Pons M, Koniaris LG, Zimmers TA. Acute inhibition of myostatin-family proteins preserves skeletal muscle in mouse models of cancer cachexia. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;**391**:1548–1554.
 41. Tinklenberg JA, Siebers EM, Beatka MJ, Meng H, Yang L, Zhang Z, et al. Myostatin inhibition using mRK35 produces skeletal muscle growth and tubular aggregate formation in wild type and TgACTA1D286G nemaline myopathy mice. *Hum Mol Genet* 2017;**27**:638–648.
 42. Holzbaur ELF, Howland DS, Weber N, Wallace K, She Y, Kwak S, et al. Myostatin inhibition slows muscle atrophy in rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 2006;**23**:697–707.
 43. St. Andre M, Johnson M, Bansal PN, Wellen J, Robertson A, Opsahl A, et al. A mouse anti-myostatin antibody increases muscle mass and improves muscle strength and contractility in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy and its humanized equivalent, domagrozumab (PF-06252616), increases muscle volume in cynomolgus monk. *Skelet Muscle* 2017;**7**:25.
 44. Davies JE, Wang L, Garcia-Oroz L, Cook LJ, Vacher C, O'Donovan DG, et al. Doxycycline attenuates and delays toxicity of the oculopharyngeal muscular dystrophy mutation in transgenic mice. *Nat Med* 2005;**11**:672–677.
 45. Hasan NAKAK, Kamal HM, Hussein ZA. Relation between body mass index percentile and muscle strength and endurance. *Egypt J Med Hum Genet* 2016;**17**:367–372.
 46. Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev* 2011;**91**:1447–1531.
 47. Mendias CL. Contractile properties of EDL and soleus muscles of myostatin-deficient mice. *J Appl Physiol* 2006;**101**:898–905.

48. Tomé FM, Fardeau M. Nuclear inclusions in oculopharyngeal dystrophy. *Acta Neuropathol* 1980;**49**:85–87.
49. Li ZB, Kollias HD, Wagner KR. Myostatin directly regulates skeletal muscle fibrosis. *J Biol Chem* 2008;**283**:19371–19378.
50. March J, Golshirazi G, Cernisova V, Carr H, Leong Y, Lu-Nguyen N, et al. Targeting TGF β signaling to address fibrosis using antisense oligonucleotides. *Biomedicines* 2018;**6**:74.
51. Li ZB, Zhang J, Wagner KR. Inhibition of myostatin reverses muscle fibrosis through apoptosis. *J Cell Sci* 2012;**125**:3957–3965.
52. da Silva FA, Corte-Real S, Goncalves J. Recombinant antibodies as therapeutic agents. *BioDrugs* 2008;**22**:301–314.
53. Cordova G, Negroni E, Cabello-Verrugio C, Mouly V, Trollet C. Combined therapies for Duchenne muscular dystrophy to optimize treatment efficacy. *Front Genet* 2018;**9**:114.
54. von Haehling S, Morley JE, Coats AJS, Anker SD. Ethical guidelines for publishing in the Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle: update 2017. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2017;**8**:1081–1083.

Bibliographie

Abdelmohsen, K., Panda, A.C., Munk, R., Grammatikakis, I., Dudekula, D.B., De, S., Kim, J., Noh, J.H., Kim, K.M., Martindale, J.L., et al. (2017). Identification of HuR target circular RNAs uncovers suppression of PABPN1 translation by CircPABPN1. *RNA Biol* 14, 361–369.

Abdulkarim, B., Hernangomez, M., Igoillo-Esteve, M., Cunha, D.A., Marselli, L., Marchetti, P., Ladriere, L., and Cnop, M. (2017). Guanabenz Sensitizes Pancreatic β Cells to Lipotoxic Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis. *Endocrinology* 158, 1659–1670.

Abu-Baker, A., Messaed, C., Laganriere, J., Gaspar, C., Brais, B., and Rouleau, G.A. (2003). Involvement of the ubiquitin-proteasome pathway and molecular chaperones in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 12, 2609–2623.

Abu-Baker, A., Laganriere, S., Fan, X., Laganriere, J., Brais, B., and Rouleau, G.A. (2005). Cytoplasmic Targeting of Mutant Poly(A)-Binding Protein Nuclear 1 Suppresses Protein Aggregation and Toxicity in Oculopharyngeal Muscular Dystrophy: Protein Subcellular Localization in OPMD Pathogenesis. *Traffic* 6, 766–779.

Abu-Baker, A., Laganriere, J., Gaudet, R., Rochefort, D., Brais, B., Neri, C., Dion, P.A., and Rouleau, G.A. (2013). Lithium chloride attenuates cell death in oculopharyngeal muscular dystrophy by perturbing Wnt/ β -catenin pathway. *Cell Death Dis* 4, e821.

Abu-Baker, A., Kharma, N., Neri, C., Rasheed, S., Dion, P.A., Varin, L., and Rouleau, G.A. (2016). Current targeted therapeutic strategies for oculopharyngeal muscular dystrophy: from pharmacological to RNA replacement and gene editing therapies. *International Journal of Clinical Neurosciences and Mental Health* S06.

Adegbuyiro, A., Sedighi, F., Pilkington, A.W., Groover, S., and Legleiter, J. (2017). Proteins Containing Expanded Polyglutamine Tracts and Neurodegenerative Disease. *Biochemistry* 56, 1199–1217.

Afonina, E., Neumann, M., and Pavlakis, G.N. (1997). Preferential binding of poly(A)-binding protein 1 to an inhibitory RNA element in the human immunodeficiency virus type 1 gag mRNA. *J. Biol. Chem.* 272, 2307–2311.

Albrecht, A.N., Kornak, U., Böddrich, A., Süring, K., Robinson, P.N., Stiege, A.C., Lurz, R., Stricker, S., Wanker, E.E., and Mundlos, S. (2004). A molecular pathogenesis for transcription factor associated poly-alanine tract expansions. *Hum. Mol. Genet.* 13, 2351–2359.

Alper, G., and Narayanan, V. (2003). Friedreich's ataxia. *Pediatr. Neurol.* 28, 335–341.

Ameur, A., Zaghlool, A., Halvardson, J., Wetterbom, A., Gyllensten, U., Cavelier, L., and Feuk, L. (2011). Total RNA sequencing reveals nascent transcription and widespread co-transcriptional splicing in the human brain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 1435–1440.

Amiel, J., Trochet, D., Clément-Ziza, M., Munnich, A., and Lyonnet, S. (2004). Polyalanine expansions in human. *Hum Mol Genet* 13, R235–R243.

Andreassi, C., and Riccio, A. (2009). To localize or not to localize: mRNA fate is in 3'UTR ends. *Trends Cell Biol.* 19, 465–474.

Anvar, S.Y., AC't Hoen, P., Venema, A., Van Der Sluijs, B., Van Engelen, B., Snoeck, M., Vissing, J., Trollet, C., Dickson, G., Chartier, A., et al. (2011). Deregulation of the ubiquitin-proteasome system is the predominant molecular pathology in OPMD animal models and

patients. *Skeletal Muscle* 1, 1.

Anvar, S.Y., Raz, Y., Verwey, N., van der Sluijs, B., Venema, A., Goeman, J.J., Vissing, J., van der Maarel, S.M., AC't Hoen, P., van Engelen, B.G., et al. (2013). A decline in PABPN1 induces progressive muscle weakness in oculopharyngeal muscle dystrophy and in muscle aging. *Aging (Albany NY)* 5, 412.

Apponi, L.H., Leung, S.W., Williams, K.R., Valentini, S.R., Corbett, A.H., and Pavlath, G.K. (2010). Loss of nuclear poly(A)-binding protein 1 causes defects in myogenesis and mRNA biogenesis. *Hum. Mol. Genet.* 19, 1058–1065.

Apponi, L.H., Corbett, A.H., and Pavlath, G.K. (2013a). Control of mRNA stability contributes to low levels of nuclear poly(A) binding protein 1 (PABPN1) in skeletal muscle. *Skeletal Muscle* 3, 23.

Apponi, L.H., Corbett, A.H., and Pavlath, G.K. (2013b). Control of mRNA stability contributes to low levels of nuclear poly(A) binding protein 1 (PABPN1) in skeletal muscle. *Skeletal Muscle* 3, 23.

Argov, Z., Gliko-Kabir, I., Brais, B., Caraco, Y., and Megidido, D. (2016). Intravenous Trehalose Improves Dysphagia and Muscle Function in Oculopharyngeal Muscular Dystrophy (OPMD): Preliminary Results of 24 Weeks Open Label Phase 2 Trial (I4.007). *Neurology* 86, I4.007.

Aslam, M., and Vaezi, M.F. (2013). Dysphagia in the Elderly. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 9, 784–795.

Ayuso, E., Mingozzi, F., and Bosch, F. (2010). Production, purification and characterization of adeno-associated vectors. *Curr Gene Ther* 10, 423–436.

Ayyadevara, S., Balasubramaniam, M., Suri, P., Mackintosh, S.G., Tackett, A.J., Sullivan, D.H., Shmookler Reis, R.J., and Dennis, R.A. (2016). Proteins that accumulate with age in human skeletal-muscle aggregates contribute to declines in muscle mass and function in *Caenorhabditis elegans*. *Aging (Albany NY)* 8, 3486–3496.

Bach, S., Talarek, N., Andrieu, T., Vierfond, J.-M., Mettey, Y., Galons, H., Dormont, D., Meijer, L., Cullin, C., and Blondel, M. (2003). Isolation of drugs active against mammalian prions using a yeast-based screening assay. *Nat. Biotechnol.* 21, 1075–1081.

Bachetti, T., Bocca, P., Borghini, S., Matera, I., Prigione, I., Ravazzolo, R., and Ceccherini, I. (2007). Geldanamycin promotes nuclear localisation and clearance of PHOX2B misfolded proteins containing polyalanine expansions. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 327–339.

Baghdadi, M.B., Castel, D., Machado, L., Fukada, S.-I., Birk, D.E., Relaix, F., Tajbakhsh, S., and Mourikis, P. (2018). Reciprocal signalling by Notch-Collagen V-CALCR retains muscle stem cells in their niche. *Nature* 557, 714–718.

Baldwin, R.L. (1986). Temperature dependence of the hydrophobic interaction in protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 8069–8072.

Banerjee, D., and Sanyal, S. (2014). Protein Folding Activity of the Ribosome (PFAR) — A Target for Antiprion Compounds. *Viruses* 6, 3907–3924.

Banerjee, A., Apponi, L.H., Pavlath, G.K., and Corbett, A.H. (2013). PABPN1: molecular function and muscle disease. *FEBS J.* 280, 4230–4250.

Banerjee, A., Vest, K.E., Pavlath, G.K., and Corbett, A.H. (2017). Nuclear poly(A) binding protein 1 (PABPN1) and Matrin3 interact in muscle cells and regulate RNA processing. *Nucleic Acids Res.*

- Bao, Y.P., Cook, L.J., O'Donovan, D., Uyama, E., and Rubinsztein, D.C. (2002). Mammalian, yeast, bacterial, and chemical chaperones reduce aggregate formation and death in a cell model of oculopharyngeal muscular dystrophy. *J. Biol. Chem.* *277*, 12263–12269.
- Bao, Y.P., Sarkar, S., Uyama, E., and Rubinsztein, D.C. (2004). Congo red, doxycycline, and HSP70 overexpression reduce aggregate formation and cell death in cell models of oculopharyngeal muscular dystrophy. *J. Med. Genet.* *41*, 47–51.
- Barbezier, N., Chartier, A., Bidet, Y., Buttstedt, A., Voisset, C., Galons, H., Blondel, M., Schwarz, E., and Simonelig, M. (2011). Antiprion drugs 6-aminophenanthridine and guanabenz reduce PABPN1 toxicity and aggregation in oculopharyngeal muscular dystrophy. *EMBO Mol Med* *3*, 35–49.
- Barrett, S.P., and Salzman, J. (2016). Circular RNAs: analysis, expression and potential functions. *Development* *143*, 1838–1847.
- Bear, D.G., Fomproix, N., Soop, T., Björkroth, B., Masich, S., and Daneholt, B. (2003). Nuclear poly(A)-binding protein PABPN1 is associated with RNA polymerase II during transcription and accompanies the released transcript to the nuclear pore. *Exp. Cell Res.* *286*, 332–344.
- Beaulieu, Y.B., Kleinman, C.L., Landry-Voyer, A.-M., Majewski, J., and Bachand, F. (2012). Polyadenylation-Dependent Control of Long Noncoding RNA Expression by the Poly(A)-Binding Protein Nuclear 1. *PLoS Genet* *8*.
- Becher, M.W., Kotzuc, J.A., Davis, L.E., and Bear, D.G. (2000). Intranuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy contain poly(A) binding protein 2. *Ann. Neurol.* *48*, 812–815.
- Becher, M.W., Morrison, L., Davis, L.E., Maki, W.C., King, M.K., Bicknell, J.M., Reinert, B.L., Bartolo, C., and Bear, D.G. (2001). Oculopharyngeal muscular dystrophy in Hispanic New Mexicans. *JAMA* *286*, 2437–2440.
- Bendotti, C., Marino, M., Cheroni, C., Fontana, E., Crippa, V., Poletti, A., and De Biasi, S. (2012). Dysfunction of constitutive and inducible ubiquitin-proteasome system in amyotrophic lateral sclerosis: Implication for protein aggregation and immune response. *Progress in Neurobiology* *97*, 101–126.
- Bengoechea, R., Tapia, O., Casafont, I., Berciano, J., Lafarga, M., and Berciano, M.T. (2012). Nuclear speckles are involved in nuclear aggregation of PABPN1 and in the pathophysiology of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neurobiology of Disease* *46*, 118–129.
- Benoit, B., Mitou, G., Chartier, A., Temme, C., Zaessinger, S., Wahle, E., Busseau, I., and Simonelig, M. (2005). An essential cytoplasmic function for the nuclear poly(A) binding protein, PABP2, in poly(A) tail length control and early development in *Drosophila*. *Dev. Cell* *9*, 511–522.
- Bergeron, D., Pal, G., Beaulieu, Y.B., Chabot, B., and Bachand, F. (2015). Regulated Intron Retention and Nuclear Pre-mRNA Decay Contribute to *PABPN1* Autoregulation. *Molecular and Cellular Biology* *35*, 2503–2517.
- Bernstein, P., Peltz, S.W., and Ross, J. (1989). The poly(A)-poly(A)-binding protein complex is a major determinant of mRNA stability in vitro. *Mol. Cell. Biol.* *9*, 659–670.
- Bhattacharjee, R.B., and Bag, J. (2012). Depletion of nuclear poly(A) binding protein PABPN1 produces a compensatory response by cytoplasmic PABP4 and PABP5 in cultured human cells. *PLoS ONE* *7*, e53036.

- Bhattacharjee, R.B., Zannat, T., and Bag, J. (2012). Expression of the polyalanine expansion mutant of nuclear poly(A)-binding protein induces apoptosis via the p53 pathway. *Cell Biol. Int.* *36*, 697–704.
- Bi, P., Ramirez-Martinez, A., Li, H., Cannavino, J., McAnally, J.R., Shelton, J.M., Sánchez-Ortiz, E., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2017). Control of muscle formation by the fusogenic micropeptide myomixer. *Science* *356*, 323–327.
- Bienroth, S., Keller, W., and Wahle, E. (1993). Assembly of a processive messenger RNA polyadenylation complex. *EMBO J.* *12*, 585–594.
- Bigot, A., Duddy, W.J., Ouandaogo, Z.G., Negroni, E., Mariot, V., Ghimbovschi, S., Harmon, B., Wielgosik, A., Loiseau, C., Devaney, J., et al. (2015). Age-Associated Methylation Suppresses SPRY1, Leading to a Failure of Re-quiescence and Loss of the Reserve Stem Cell Pool in Elderly Muscle. *Cell Rep* *13*, 1172–1182.
- Billingsley, G.D., Cox, D.W., Duncan, A.M., Goodfellow, P.J., and Grzeschik, K.H. (1994). Regional localization of loci on chromosome 14 using somatic cell hybrids. *Cytogenet. Cell Genet.* *66*, 33–38.
- Bjornson, C.R.R., CHEUNG, T.H., LIU, L., TRIPATHI, P.V., STEEPER, K.M., and RANDO, T.A. (2012). Notch Signaling Is Necessary to Maintain Quiescence in Adult Muscle Stem Cells. *Stem Cells* *30*, 232–242.
- Blanc, R.S., and Richard, S. (2017). Regenerating muscle with arginine methylation. *Transcription* *8*, 175–178.
- Blanco, L.P., Evans, M.L., Smith, D.R., Badtke, M.P., and Chapman, M.R. (2012). Diversity, biogenesis and function of microbial amyloids. *Trends Microbiol.* *20*, 66–73.
- Blumen, S.C., Nisipeanu, P., Sadeh, M., Asherov, A., Tomé, F.M., and Korczyn, A.D. (1993). Clinical features of oculopharyngeal muscular dystrophy among Bukhara Jews. *Neuromuscul. Disord.* *3*, 575–577.
- Blumen, S.C., Sadeh, M., Korczyn, A.D., Rouche, A., Nisipeanu, P., Asherov, A., and Tomé, F.M. (1996). Intranuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy among Bukhara Jews. *Neurology* *46*, 1324–1328.
- Blumen, S.C., Brais, B., Korczyn, A.D., Medinsky, S., Chapman, J., Asherov, A., Nisipeanu, P., Codère, F., Bouchard, J.P., Fardeau, M., et al. (1999). Homozygotes for oculopharyngeal muscular dystrophy have a severe form of the disease. *Ann. Neurol.* *46*, 115–118.
- Blumen, S.C., Korczyn, A.D., Lavoie, H., Medynski, S., Chapman, J., Asherov, A., Nisipeanu, P., Inzelberg, R., Carasso, R.L., Bouchard, J.P., et al. (2000). Oculopharyngeal MD among Bukhara Jews is due to a founder (GCG)₉ mutation in the PABP2 gene. *Neurology* *55*, 1267–1270.
- Blumen, S.C., Bouchard, J.-P., Brais, B., Carasso, R.L., Paleacu, D., Drory, V.E., Chantal, S., Blumen, N., and Braverman, I. (2009). Cognitive impairment and reduced life span of oculopharyngeal muscular dystrophy homozygotes. *Neurology* *73*, 596–601.
- Bond, C.S., and Fox, A.H. (2009). Paraspeckles: nuclear bodies built on long noncoding RNA. *The Journal of Cell Biology* *186*, 637–644.
- Bonington, A., Mahon, M., and Whitmore, I. (1988). A histological and histochemical study of the cricopharyngeus muscle in man. *J Anat* *156*, 27–37.
- Borrell-Pagès, M., Canals, J.M., Cordelières, F.P., Parker, J.A., Pineda, J.R., Grange, G., Bryson, E.A., Guillemier, M., Hirsch, E., Hantraye, P., et al. (2006). Cystamine and cysteamine increase brain levels of BDNF in Huntington disease via HSN1b and

- transglutaminase. *J. Clin. Invest.* *116*, 1410–1424.
- Bouchard, J.-P. (1997). André Barbeau and the oculopharyngeal muscular dystrophy in French Canada and North America. *Neuromuscular Disorders* *7*, *Supplement 1*, S5–S11.
- Bouchard, J.-P., Gagné, F., Tomé, F.M.S., and Brunet, D. (1989). Nuclear Inclusions in Oculopharyngeal Muscular Dystrophy in Quebec. *Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien Des Sciences Neurologiques* *16*, 446–450.
- Bouchard, J.P., Brais, B., Brunet, D., Gould, P.V., and Rouleau, G.A. (1997). Recent studies on oculopharyngeal muscular dystrophy in Québec. *Neuromuscul. Disord.* *7 Suppl 1*, S22-29.
- Bourdeau Julien, I., Sephton, C.F., and Dutchak, P.A. (2018). Metabolic Networks Influencing Skeletal Muscle Fiber Composition. *Front. Cell Dev. Biol.* *6*.
- Brais, B. (1998). Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy.
- Brais, B. (2003). Oculopharyngeal muscular dystrophy: a late-onset polyalanine disease. *Cytogenetic and Genome Research* *100*, 252–260.
- Brais, B., Xie, Y.-G., Sanson, M., Morgan, K., Weissenbach, J., Korczyn, A.D., Blumen, S.C., Fardeau, M., Tomé, F.M., Bouchard, J.-P., et al. (1995a). The oculopharyngeal muscular dystrophy locus maps to the region of the cardiac α and β myosin heavy chain genes on chromosome 14q11.2- q13. *Human Molecular Genetics* *4*, 429–434.
- Brais, B., Bouchard, J., Xie, Y., Tome, F., Fardeau, M., and Rouleau, G. (1995b). A More Severe Form of Oculopharyngeal Muscular-Dystrophy (opmd) Is Documented in a Genetically Proven Homozygous Patient. *Neurology* *45*, A243–A243.
- Brais, B., Bouchard, J.P., Gosselin, F., Xie, Y.G., Fardeau, M., Tomé, F.M., and Rouleau, G.A. (1997). Using the full power of linkage analysis in 11 French Canadian families to fine map the oculopharyngeal muscular dystrophy gene. *Neuromuscul. Disord.* *7 Suppl 1*, S70-74.
- Brais, B., Rouleau, G.A., Bouchard, J.P., Fardeau, M., and Tomé, F.M. (1999). Oculopharyngeal muscular dystrophy. *Semin Neurol* *19*, 59–66.
- Bresson, S.M., and Conrad, N.K. (2013). The Human Nuclear Poly(A)-Binding Protein Promotes RNA Hyperadenylation and Decay. *PLoS Genet* *9*.
- Bresson, S.M., Hunter, O.V., Hunter, A.C., and Conrad, N.K. (2015). Canonical Poly(A) Polymerase Activity Promotes the Decay of a Wide Variety of Mammalian Nuclear RNAs. *PLoS Genet.* *11*, e1005610.
- Brunet, G., Tomé, F.M., Eymard, B., Robert, J.M., and Fardeau, M. (1997). Genealogical study of oculopharyngeal muscular dystrophy in France. *Neuromuscul. Disord.* *7 Suppl 1*, S34-37.
- Bukau, B., Weissman, J., and Horwich, A. (2006). Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* *125*, 443–451.
- Calado, A., Kutay, U., Kühn, U., Wahle, E., and Carmo-Fonseca, M. (2000a). Deciphering the cellular pathway for transport of poly(A)-binding protein II. *RNA* *6*, 245–256.
- Calado, A., Tomé, F.M., Brais, B., Rouleau, G.A., Kühn, U., Wahle, E., and Carmo-Fonseca, M. (2000b). Nuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy consist of poly(A) binding protein 2 aggregates which sequester poly(A) RNA. *Hum. Mol. Genet.* *9*, 2321–2328.
- Cappelletti, C., Galbardi, B., Bruttini, M., Salerno, F., Canioni, E., Pasanisi, M.B., Rodolico, C., Brizzi, T., Mora, M., Renieri, A., et al. (2019). Aging-associated genes and let-7

microRNAs: a contribution to myogenic program dysregulation in oculopharyngeal muscular dystrophy. *FASEB J.* fj201801577RR.

Carlson, J.R. (1988). A new means of inducibly inactivating a cellular protein. *Mol. Cell. Biol.* *8*, 2638–2646.

Carmichael, J., Chatellier, J., Woolfson, A., Milstein, C., Fersht, A.R., and Rubinsztein, D.C. (2000). Bacterial and yeast chaperones reduce both aggregate formation and cell death in mammalian cell models of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 9701–9705.

Carrillo Oesterreich, F., Preibisch, S., and Neugebauer, K.M. (2010). Global analysis of nascent RNA reveals transcriptional pausing in terminal exons. *Mol. Cell* *40*, 571–581.

Catoire, H., Pasco, M.Y., Abu-Baker, A., Holbert, S., Tourette, C., Brais, B., Rouleau, G.A., Parker, J.A., and Néri, C. (2008). Sirtuin inhibition protects from the polyalanine muscular dystrophy protein PABPN1. *Hum. Mol. Genet.* *17*, 2108–2117.

Chai, Y., Koppenhafer, S.L., Shoesmith, S.J., Perez, M.K., and Paulson, H.L. (1999a). Evidence for Proteasome Involvement in Polyglutamine Disease: Localization to Nuclear Inclusions in SCA3/MJD and Suppression of Polyglutamine Aggregation in vitro. *Hum Mol Genet* *8*, 673–682.

Chai, Y., Koppenhafer, S.L., Bonini, N.M., and Paulson, H.L. (1999b). Analysis of the role of heat shock protein (Hsp) molecular chaperones in polyglutamine disease. *J. Neurosci.* *19*, 10338–10347.

Chartier, A., Benoit, B., and Simonelig, M. (2006). A *Drosophila* model of oculopharyngeal muscular dystrophy reveals intrinsic toxicity of PABPN1. *The EMBO Journal* *25*, 2253–2262.

Chartier, A., Raz, V., Sterrenburg, E., Verrips, C.T., van der Maarel, S.M., and Simonelig, M. (2009). Prevention of oculopharyngeal muscular dystrophy by muscular expression of Llama single-chain intrabodies in vivo. *Hum. Mol. Genet.* *18*, 1849–1859.

Chartier, A., Klein, P., Pierson, S., Barbezier, N., Gidaro, T., Casas, F., Carberry, S., Dowling, P., Maynadier, L., Bellec, M., et al. (2015). Mitochondrial Dysfunction Reveals the Role of mRNA Poly(A) Tail Regulation in Oculopharyngeal Muscular Dystrophy Pathogenesis. *PLoS Genet* *11*.

Chattopadhyay, S., Das, B., Bera, A.K., Dasgupta, D., and Dasgupta, C. (1994). Refolding of denatured lactate dehydrogenase by *Escherichia coli* ribosomes. *Biochem. J.* *300* (Pt 3), 717–721.

Chen, L.-L., and Carmichael, G.G. (2009). Altered nuclear retention of mRNAs containing inverted repeats in human embryonic stem cells: functional role of a nuclear noncoding RNA. *Mol. Cell* *35*, 467–478.

Chen, Q., and Haddad, G.G. (2004). Role of trehalose phosphate synthase and trehalose during hypoxia: from flies to mammals. *J. Exp. Biol.* *207*, 3125–3129.

Chen, L.-L., DeCervo, J.N., and Carmichael, G.G. (2008). Alu element-mediated gene silencing. *EMBO J.* *27*, 1694–1705.

Chien, Y.-Y. (2012). Oculopharyngeal muscular dystrophy --an under-diagnosed disease in China? Report a China-born Chinese with PABPN1 mutation and epidemiology review of the literature. *J. Formos. Med. Assoc.* *111*, 397–402.

Chiti, F., and Dobson, C.M. (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* *75*, 333–366.

- Choi, S., Jeong, H.-J., Kim, H., Choi, D., Cho, S.-C., Seong, J.K., Koo, S.-H., and Kang, J.-S. (2019). Skeletal muscle-specific Prmt1 deletion causes muscle atrophy via deregulation of the PRMT6-FOXO3 axis. *Autophagy* 1–13.
- Chou, C.-C., Alexeeva, O.M., Yamada, S., Pribadi, A., Zhang, Y., Mo, B., Williams, K.R., Zarnescu, D.C., and Rossoll, W. (2015). PABPN1 suppresses TDP-43 toxicity in ALS disease models. *Hum Mol Genet* 24, 5154–5173.
- Chujo, T., and Hirose, T. (2017). Nuclear Bodies Built on Architectural Long Noncoding RNAs: Unifying Principles of Their Construction and Function. *Mol Cells* 40, 889–896.
- Clemson, C.M., Hutchinson, J.N., Sara, S.A., Ensminger, A.W., Fox, A.H., Chess, A., and Lawrence, J.B. (2009). An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles. *Mol. Cell* 33, 717–726.
- Codère, F., Brais, B., Rouleau, G., and Lafontaine, E. (2001). Oculopharyngeal muscular dystrophy: What's new? *Orbit* 20, 259–266.
- Coiffier, L., Périé, S., Laforêt, P., Eymard, B., and St Guily, J.L. (2006). Long-term results of cricopharyngeal myotomy in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Otolaryngol Head Neck Surg* 135, 218–222.
- Coquet, M., Vallat, J.M., Vital, C., Fournier, M., Barat, M., Orgogozo, J.M., Julien, J., and Loiseau, P. (1983). Nuclear inclusions in oculopharyngeal dystrophy. An ultrastructural study of six cases. *J. Neurol. Sci.* 60, 151–156.
- Coquet, M., Vital, C., and Julien, J. (1990). Presence of inclusion body myositis-like filaments in oculopharyngeal muscular dystrophy. Ultrastructural study of 10 cases. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 16, 393–400.
- Corbeil-Girard, L.-P., Klein, A.F., Sasseville, A.M.-J., Lavoie, H., Dicaire, M.-J., Saint-Denis, A., Pagé, M., Duranceau, A., Codère, F., Bouchard, J.-P., et al. (2005). PABPN1 overexpression leads to upregulation of genes encoding nuclear proteins that are sequestered in oculopharyngeal muscular dystrophy nuclear inclusions. *Neurobiol. Dis.* 18, 551–567.
- Courchaine, E., and Neugebauer, K.M. (2015). Paraspeckles: Paragons of functional aggregation. *The Journal of Cell Biology* 210, 527–528.
- Craig, A.W., Haghghat, A., Yu, A.T., and Sonenberg, N. (1998). Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation. *Nature* 392, 520–523.
- Crespillo-Casado, A., Chambers, J.E., Fischer, P.M., Marciniak, S.J., and Ron, D. (2017). PPP1R15A-mediated dephosphorylation of eIF2 α is unaffected by Sephin1 or Guanabenz. *Elife* 6.
- Crespillo-Casado, A., Claes, Z., Choy, M.S., Peti, W., Bollen, M., and Ron, D. (2018). A Sephin1-insensitive tripartite holophosphatase dephosphorylates translation initiation factor 2 α . *J. Biol. Chem.* 293, 7766–7776.
- Cruz-Aguilar, M., Guerrero-de Ferran, C., Tovilla-Canales, J.L., Nava-Castañeda, A., and Zenteno, J.C. (2017). Characterization of PABPN1 expansion mutations in a large cohort of Mexican patients with oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD). *J. Investig. Med.* 65, 705–708.
- Cummings, C.J., Mancini, M.A., Antalffy, B., DeFranco, D.B., Orr, H.T., and Zoghbi, H.Y. (1998). Chaperone suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1. *Nat. Genet.* 19, 148–154.
- Das, B., and Gupta, C.D. (1992). Reconstitution of denatured E. coli alkaline phosphatase

with *E. coli* ribosome. *Indian J. Biochem. Biophys.* 29, 512–515.

Das, D., Das, A., Samanta, D., Ghosh, J., Dasgupta, S., Bhattacharya, A., Basu, A., Sanyal, S., and Das Gupta, C. (2008). Role of the ribosome in protein folding. *Biotechnol J* 3, 999–1009.

Das, I., Krzyzosiak, A., Schneider, K., Wrabetz, L., D'Antonio, M., Barry, N., Sigurdardottir, A., and Bertolotti, A. (2015). Preventing proteostasis diseases by selective inhibition of a phosphatase regulatory subunit. *Science* 348, 239–242.

Davies, J.E. (2005). Trehalose reduces aggregate formation and delays pathology in a transgenic mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics* 15, 23–31.

Davies, J.E., and Rubinsztein, D.C. (2011). Over-expression of BCL2 rescues muscle weakness in a mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 20, 1154–1163.

Davies, K.E., and Nowak, K.J. (2006). Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 762–773.

Davies, J.E., Wang, L., Garcia-Oroz, L., Cook, L.J., Vacher, C., O'Donovan, D.G., and Rubinsztein, D.C. (2005). Doxycycline attenuates and delays toxicity of the oculopharyngeal muscular dystrophy mutation in transgenic mice. *Nat. Med.* 11, 672–677.

Davies, J.E., Sarkar, S., and Rubinsztein, D.C. (2008). Wild-type PABPN1 is anti-apoptotic and reduces toxicity of the oculopharyngeal muscular dystrophy mutation. *Hum. Mol. Genet.* 17, 1097–1108.

Davies, J.E., Rose, C., Sarkar, S., and Rubinsztein, D.C. (2010). Cystamine suppresses polyalanine toxicity in a mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Science Translational Medicine* 2, 34ra40–34ra40.

Davies, S.W., Turmaine, M., Cozens, B.A., DiFiglia, M., Sharp, A.H., Ross, C.A., Scherzinger, E., Wanker, E.E., Mangiarini, L., and Bates, G.P. (1997). Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* 90, 537–548.

De Baere, E., Dixon, M.J., Small, K.W., Jabs, E.W., Leroy, B.P., Devriendt, K., Gillerot, Y., Mortier, G., Meire, F., Van Maldergem, L., et al. (2001). Spectrum of FOXL2 gene mutations in blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus (BPES) families demonstrates a genotype–phenotype correlation. *Hum Mol Genet* 10, 1591–1600.

Derti, A., Garrett-Engele, P., Macisaac, K.D., Stevens, R.C., Sriram, S., Chen, R., Rohl, C.A., Johnson, J.M., and Babak, T. (2012). A quantitative atlas of polyadenylation in five mammals. *Genome Res.* 22, 1173–1183.

DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K.O., Davies, S.W., Bates, G.P., Vonsattel, J.P., and Aronin, N. (1997). Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 277, 1990–1993.

Dion, P., Shanmugam, V., Gaspar, C., Messaed, C., Meijer, I., Toulouse, A., Laganier, J., Roussel, J., Rochefort, D., Laganier, S., et al. (2005). Transgenic expression of an expanded (GCG)₁₃ repeat PABPN1 leads to weakness and coordination defects in mice. *Neurobiol. Dis.* 18, 528–536.

Doorbar, J., and Griffin, H. (2007). Intrabody strategies for the treatment of human papillomavirus-associated disease. *Expert Opin Biol Ther* 7, 677–689.

Dubbioso, R., Moretta, P., Manganeli, F., Fiorillo, C., Iodice, R., Trojano, L., and Santoro,

- L. (2012). Executive functions are impaired in heterozygote patients with oculopharyngeal muscular dystrophy. *J Neurol* 259, 833–837.
- Duranceau, A. (1997). Cricopharyngeal myotomy in the management of neurogenic and muscular dysphagia. *Neuromuscul. Disord.* 7 *Suppl 1*, S85-89.
- Emery, A.E. (2002). The muscular dystrophies. *The Lancet* 359, 687–695.
- Esser, C., Alberti, S., and Höhfeld, J. (2004). Cooperation of molecular chaperones with the ubiquitin/proteasome system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1695, 171–188.
- Fabian, M.R., Sonenberg, N., and Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 351–379.
- Fan, X., and Rouleau, G.A. (2003). Progress in understanding the pathogenesis of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Can J Neurol Sci* 30, 8–14.
- Fan, H.-C., Ho, L.-I., Chi, C.-S., Chen, S.-J., Peng, G.-S., Chan, T.-M., Lin, S.-Z., and Harn, H.-J. (2014). Polyglutamine (PolyQ) diseases: genetics to treatments. *Cell Transplant* 23, 441–458.
- Fan, X., Dion, P., Laganier, J., Brais, B., and Rouleau, G.A. (2001). Oligomerization of polyalanine expanded PABPN1 facilitates nuclear protein aggregation that is associated with cell death. *Hum. Mol. Genet.* 10, 2341–2351.
- Fan, X., Messaed, C., Dion, P., Laganier, J., Brais, B., Karpati, G., and Rouleau, G.A. (2003). hnRNP A1 and A/B Interaction with PABPN1 in Oculopharyngeal Muscular Dystrophy. *Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien Des Sciences Neurologiques* 30, 244–251.
- Ford, L.P., Bagga, P.S., and Wilusz, J. (1997). The poly(A) tail inhibits the assembly of a 3'-to-5' exonuclease in an in vitro RNA stability system. *Mol. Cell. Biol.* 17, 398–406.
- Forloni, G., Colombo, L., Girola, L., Tagliavini, F., and Salmona, M. (2001). Anti-amyloidogenic activity of tetracyclines: studies in vitro. *FEBS Lett.* 487, 404–407.
- Forood, B., Perezpaya, E., Houghten, R.A., and Blondelle, S.E. (1995). Formation of an Extremely Stable Polyalanine β -Sheet Macromolecule. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 211, 7–13.
- Fox, A.H., Bond, C.S., and Lamond, A.I. (2005). P54nrb forms a heterodimer with PSP1 that localizes to paraspeckles in an RNA-dependent manner. *Mol. Biol. Cell* 16, 5304–5315.
- Fradet, G., Pouliot, D., Robichaud, R., St-Pierre, S., and Bouchard, J.P. (1997). Upper esophageal sphincter myotomy in oculopharyngeal muscular dystrophy: long-term clinical results. *Neuromuscul. Disord.* 7 *Suppl 1*, S90-95.
- Frontera, W.R., and Ochala, J. (2015). Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif. Tissue Int.* 96, 183–195.
- Fronz, K., Otto, S., Kölbl, K., Kühn, U., Friedrich, H., Schierhorn, A., Beck-Sickinger, A.G., Ostareck-Lederer, A., and Wahle, E. (2008). Promiscuous Modification of the Nuclear Poly(A)-binding Protein by Multiple Protein-arginine Methyltransferases Does Not Affect the Aggregation Behavior. *Journal of Biological Chemistry* 283, 20408–20420.
- Fronz, K., Güttinger, S., Burkert, K., Kühn, U., Stöhr, N., Schierhorn, A., and Wahle, E. (2011). Arginine methylation of the nuclear poly(a) binding protein weakens the interaction with its nuclear import receptor, transportin. *J. Biol. Chem.* 286, 32986–32994.
- Fugier, C., Klein, A.F., Hammer, C., Vassilopoulos, S., Ivarsson, Y., Toussaint, A., Tosch,

- V., Vignaud, A., Ferry, A., Messaddeq, N., et al. (2011). Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy. *Nat. Med.* *17*, 720–725.
- García-Castañeda, M., Vega, A.V., Rodríguez, R., Montiel-Jaen, M.G., Cisneros, B., Zarain-Herzberg, A., and Avila, G. (2017). Functional impact of an oculopharyngeal muscular dystrophy mutation in PABPN1. *J. Physiol. (Lond.)* *595*, 4167–4187.
- Garibaldi, M., Pennisi, E.M., Bruttini, M., Bizzarri, V., Bucci, E., Morino, S., Talerico, C., Stoppacciaro, A., Renieri, A., and Antonini, G. (2015). Dropped-head in recessive oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* *25*, 869–872.
- Gaspar, C., Jannatipour, M., Dion, P., Laganière, J., Sequeiros, J., Brais, B., and Rouleau, G.A. (2000). CAG tract of MJD-1 may be prone to frameshifts causing polyalanine accumulation. *Hum. Mol. Genet.* *9*, 1957–1966.
- Ge, H., Zhou, D., Tong, S., Gao, Y., Teng, M., and Niu, L. (2008). Crystal structure and possible dimerization of the single RRM of human PABPN1. *Proteins* *71*, 1539–1545.
- Gething, M.J., and Sambrook, J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature* *355*, 33–45.
- Gidaro, T., Negroni, E., Perié, S., Mirabella, M., Lainé, J., Lacau St Guily, J., Butler-Browne, G., Mouly, V., and Trollet, C. (2013). Atrophy, fibrosis, and increased PAX7-positive cells in pharyngeal muscles of oculopharyngeal muscular dystrophy patients. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *72*, 234–243.
- Girgenrath, M., Dominov, J.A., Kostek, C.A., and Miller, J.B. (2004). Inhibition of apoptosis improves outcome in a model of congenital muscular dystrophy. *J. Clin. Invest.* *114*, 1635–1639.
- Goodman, F.R., Mundlos, S., Muragaki, Y., Donnai, D., Giovannucci-Uzielli, M.L., Lapi, E., Majewski, F., McGaughan, J., McKeown, C., Reardon, W., et al. (1997). Synpolydactyly phenotypes correlate with size of expansions in HOXD13 polyalanine tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *94*, 7458–7463.
- Grewal, R.P., Karkera, J.D., Grewal, R.K., and Detera-Wadleigh, S.D. (1999). Mutation analysis of oculopharyngeal muscular dystrophy in Hispanic American families. *Arch. Neurol.* *56*, 1378–1381.
- Hacein-Bey-Abina, S., Garrigue, A., Wang, G.P., Soulier, J., Lim, A., Morillon, E., Clappier, E., Caccavelli, L., Delabesse, E., Beldjord, K., et al. (2008). Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J. Clin. Invest.* *118*, 3132–3142.
- Hagerman, R.J., Berry-Kravis, E., Hazlett, H.C., Bailey, D.B., Moine, H., Kooy, R.F., Tassone, F., Gantois, I., Sonenberg, N., Mandel, J.L., et al. (2017). Fragile X syndrome. *Nat Rev Dis Primers* *3*, 17065.
- Hall, L.L., Smith, K.P., Byron, M., and Lawrence, J.B. (2006). Molecular anatomy of a speckle. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* *288A*, 664–675.
- Hartl, F.U., Bracher, A., and Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* *475*, 324–332.
- Hebbar, S., Webberley, M.J., Lunt, P., and Robinson, D.O. (2007). Siblings with recessive oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* *17*, 254–257.
- Herrmann, F., Lee, J., Bedford, M.T., and Fackelmayer, F.O. (2005). Dynamics of Human Protein Arginine Methyltransferase 1(PRMT1) in Vivo. *J. Biol. Chem.* *280*, 38005–38010.

- Hill, M.E., Creed, G.A., McMullan, T.F., Tyers, A.G., Hilton-Jones, D., Robinson, D.O., and Hammans, S.R. (2001). Oculopharyngeal muscular dystrophy: phenotypic and genotypic studies in a UK population. *Brain* 124, 522–526.
- Hino, H., Araki, K., Uyama, E., Takeya, M., Araki, M., Yoshinobu, K., Miike, K., Kawazoe, Y., Maeda, Y., Uchino, M., et al. (2004). Myopathy phenotype in transgenic mice expressing mutated PABPN1 as a model of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 13, 181–190.
- Hocquemiller, M., Giersch, L., Audrain, M., Parker, S., and Cartier, N. (2016). Adeno-Associated Virus-Based Gene Therapy for CNS Diseases. *Hum Gene Ther* 27, 478–496.
- Hoffman, E.P., Brown, R.H., and Kunkel, L.M. (1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51, 919–928.
- Holmes, B., Brogden, R.N., Heel, R.C., Speight, T.M., and Avery, G.S. (1983). Guanabenz. A review of its pharmacodynamic properties and therapeutic efficacy in hypertension. *Drugs* 26, 212–229.
- Hoque, M., Li, W., and Tian, B. (2014). Accurate mapping of cleavage and polyadenylation sites by 3' region extraction and deep sequencing. *Methods Mol. Biol.* 1125, 119–129.
- Huang, Y., and Carmichael, G.G. (1996). Role of polyadenylation in nucleocytoplasmic transport of mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 16, 1534–1542.
- Huber, A.-L., Lebeau, J., Guillaumot, P., Pétrilli, V., Malek, M., Chilloux, J., Fauvet, F., Payen, L., Kfoury, A., Renno, T., et al. (2013). p58(IPK)-mediated attenuation of the proapoptotic PERK-CHOP pathway allows malignant progression upon low glucose. *Mol. Cell* 49, 1049–1059.
- Ikeuchi, T., Onodera, O., Oyake, M., Koide, R., Tanaka, H., and Tsuji, S. (1995). Dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA): Close correlation of CAG repeat expansions with the wide spectrum of clinical presentations and prominent anticipation. *Seminars in Cell Biology* 6, 37–44.
- Ikezoe, K., Nakamori, M., Furuya, H., Arahata, H., Kanemoto, S., Kimura, T., Imaizumi, K., Takahashi, M.P., Sakoda, S., Fujii, N., et al. (2007). Endoplasmic reticulum stress in myotonic dystrophy type 1 muscle. *Acta Neuropathol.* 114, 527–535.
- Impagliazzo, A., Tepper, A.W., Verrips, T.C., Ubbink, M., and van der Maarel, S.M. (2010). Structural basis for a PABPN1 aggregation-preventing antibody fragment in OPMD. *FEBS Lett.* 584, 1558–1564.
- Iseli, C., Stevenson, B.J., Souza, S.J. de, Samaia, H.B., Camargo, A.A., Buetow, K.H., Strausberg, R.L., Simpson, A.J.G., Bucher, P., and Jongeneel, C.V. (2002). Long-Range Heterogeneity at the 3' Ends of Human mRNAs. *Genome Res.* 12, 1068–1074.
- Iwasa, K., Nambu, Y., Motozaki, Y., Furukawa, Y., Yoshikawa, H., and Yamada, M. (2014). Increased skeletal muscle expression of the endoplasmic reticulum chaperone GRP78 in patients with myasthenia gravis. *J. Neuroimmunol.* 273, 72–76.
- Jan, C.H., Williams, C.C., and Weissman, J.S. (2014). Principles of ER coranslational translocation revealed by proximity-specific ribosome profiling. *Science* 346, 1257521.
- Jaruga, A., Hordyjewska, E., Kandzierski, G., and Tylzanowski, P. (2016). Cleidocranial dysplasia and RUNX2-clinical phenotype-genotype correlation. *Clin. Genet.* 90, 393–402.
- Jenal, M., Elkon, R., Loayza-Puch, F., van Haaften, G., Kühn, U., Menzies, F.M., Oude Vrielink, J.A.F., Bos, A.J., Drost, J., Rooijers, K., et al. (2012). The poly(A)-binding protein nuclear 1 suppresses alternative cleavage and polyadenylation sites. *Cell* 149, 538–553.

- Johnson, M.A., Polgar, J., Weightman, D., and Appleton, D. (1973). Data on the distribution of fibre types in thirty-six human muscles. An autopsy study. *J. Neurol. Sci.* *18*, 111–129.
- Jouan, L., Rocheford, D., Szuto, A., Carney, E., David, K., Dion, P.A., and Rouleau, G.A. (2014). An 18 alanine repeat in a severe form of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Can J Neurol Sci* *41*, 508–511.
- Julien, J., Vital, Cl., Vallat, J.M., Vallat, M., and Blanc, M.L. (1974). Oculopharyngeal muscular dystrophy: A case with abnormal mitochondria and “fingerprint” inclusions. *Journal of the Neurological Sciences* *21*, 165–169.
- Kadowaki, H., and Nishitoh, H. (2013). Signaling pathways from the endoplasmic reticulum and their roles in disease. *Genes (Basel)* *4*, 306–333.
- Kaufman, R.J. (1999). Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev.* *13*, 1211–1233.
- Keaton, A.A., Solomon, B.D., Kauvar, E.F., El-Jaick, K.B., Gropman, A.L., Zafer, Y., Meck, J.M., Bale, S.J., Grange, D.K., Haddad, B.R., et al. (2011). TGIF Mutations in Human Holoprosencephaly: Correlation between Genotype and Phenotype. *Mol Syndromol* *1*, 211–222.
- Kerwitz, Y., Kühn, U., Lilie, H., Knoth, A., Scheuermann, T., Friedrich, H., Schwarz, E., and Wahle, E. (2003). Stimulation of poly(A) polymerase through a direct interaction with the nuclear poly(A) binding protein allosterically regulated by RNA. *EMBO J.* *22*, 3705–3714.
- Kessler, E., Mould, A.P., and Hulmes, D.J. (1990). Procollagen type I C-proteinase enhancer is a naturally occurring connective tissue glycoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *173*, 81–86.
- Kharma, N., Varin, L., Abu-Baker, A., Ouellet, J., Najeh, S., Ehdaevand, M.-R., Belmonte, G., Ambri, A., Rouleau, G., and Perreault, J. (2016). Automated design of hammerhead ribozymes and validation by targeting the PABPN1 gene transcript. *Nucleic Acids Res* *44*, e39.
- Khodor, Y.L., Rodriguez, J., Abruzzi, K.C., Tang, C.-H.A., Marr, M.T., and Rosbash, M. (2011). Nascent-seq indicates widespread cotranscriptional pre-mRNA splicing in *Drosophila*. *Genes Dev.* *25*, 2502–2512.
- Khodor, Y.L., Menet, J.S., Tolan, M., and Rosbash, M. (2012). Cotranscriptional splicing efficiency differs dramatically between *Drosophila* and mouse. *RNA* *18*, 2174–2186.
- Kikuchi, H., Almer, G., Yamashita, S., Guégan, C., Nagai, M., Xu, Z., Sosunov, A.A., McKhann, G.M., and Przedborski, S. (2006). Spinal cord endoplasmic reticulum stress associated with a microsomal accumulation of mutant superoxide dismutase-1 in an ALS model. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 6025–6030.
- Kilchert, C., Wittmann, S., and Vasiljeva, L. (2016). The regulation and functions of the nuclear RNA exosome complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *17*, 227–239.
- Kim, Y.J., Noguchi, S., Hayashi, Y.K., Tsukahara, T., Shimizu, T., and Arahata, K. (2001). The product of an oculopharyngeal muscular dystrophy gene, poly(A)-binding protein 2, interacts with SKIP and stimulates muscle-specific gene expression. *Hum. Mol. Genet.* *10*, 1129–1139.
- Klein, A.F., Ebihara, M., Alexander, C., Dicaire, M.-J., Sasseville, A.M.-J., Langelier, Y., Rouleau, G.A., and Brais, B. (2008). PABPN1 polyalanine tract deletion and long expansions modify its aggregation pattern and expression. *Experimental Cell Research* *314*, 1652–1666.
- Klein, P., Oloko, M., Roth, F., Montel, V., Malerba, A., Jarmin, S., Gidaro, T., Popplewell,

- L., Perie, S., Lacau St Guily, J., et al. (2016). Nuclear poly(A)-binding protein aggregates misplace a pre-mRNA outside of SC35 speckle causing its abnormal splicing. *Nucleic Acids Res.*
- de Klerk, E., Venema, A., Anvar, S.Y., Goeman, J.J., Hu, O., Trollet, C., Dickson, G., den Dunnen, J.T., van der Maarel, S.M., Raz, V., et al. (2012). Poly(A) binding protein nuclear 1 levels affect alternative polyadenylation. *Nucleic Acids Res.* *40*, 9089–9101.
- Klucken, J., Shin, Y., Masliah, E., Hyman, B.T., and McLean, P.J. (2004). Hsp70 Reduces alpha-Synuclein Aggregation and Toxicity. *J. Biol. Chem.* *279*, 25497–25502.
- Kristmundsdottir, F., Mahon, M., Froes, M.M., and Cumming, W.J. (1990). Histomorphometric and histopathological study of the human cricopharyngeus muscle: in health and in motor neuron disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *16*, 461–475.
- Kühn, U., and Wahle, E. (2004). Structure and function of poly(A) binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* *1678*, 67–84.
- Kühn, U., Nemeth, A., Meyer, S., and Wahle, E. (2003). The RNA binding domains of the nuclear poly(A)-binding protein. *J. Biol. Chem.* *278*, 16916–16925.
- La Spada, A.R., Wilson, E.M., Lubahn, D.B., Harding, A.E., and Fischbeck, K.H. (1991). Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* *352*, 77–79.
- LaCava, J., Houseley, J., Saveanu, C., Petfalski, E., Thompson, E., Jacquier, A., and Tollervey, D. (2005). RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell* *121*, 713–724.
- Lam, Y.W., Trinkle-Mulcahy, L., and Lamond, A.I. (2005). The nucleolus. *Journal of Cell Science* *118*, 1335–1337.
- Le Grand, F., and Rudnicki, M.A. (2007). Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Curr Opin Cell Biol* *19*, 628–633.
- Lee, H., Park, M., Lee, J., Lee, E.S., and Baek, S. (2012). Histopathologic findings of the orbicularis oculi in upper eyelid aging: total or minimal excision of orbicularis oculi in upper blepharoplasty. *Arch Facial Plast Surg* *14*, 253–257.
- Lee, Y.J., Lee, J., Yang, I.C., Hahn, Y., Lee, Y., and Chung, J.H. (1998). Genomic structure and expression of murine poly(A) binding protein II gene. *Biochim. Biophys. Acta* *1395*, 40–46.
- de Leeuw, R.H., Garnier, D., Kroon, R.M.J.M., Horlings, C.G.C., de Meijer, E., Buermans, H., van Engelen, B.G.M., de Knijff, P., and Raz, V. (2018). Diagnostics of short tandem repeat expansion variants using massively parallel sequencing and componential tools. *Eur. J. Hum. Genet.*
- Lemay, J.-F., D'Amours, A., Lemieux, C., Lackner, D.H., St-Sauveur, V.G., Bähler, J., and Bachand, F. (2010). The Nuclear Poly(A)-Binding Protein Interacts with the Exosome to Promote Synthesis of Noncoding Small Nucleolar RNAs. *Molecular Cell* *37*, 34–45.
- Lezza, A.M.S., Cormio, A., Gerardi, P., Silvestri, G., Servidei, S., Serlenga, L., Cantatore, P., and Gadaleta, M.N. (1997). Mitochondrial DNA deletions in oculopharyngeal muscular dystrophy. *FEBS Letters* *418*, 167–170.
- Li, X., Yan, J., Wang, L., Xiao, F., Yang, Y., Guo, X., and Wang, H. (2013). Beclin1 inhibition promotes autophagy and decreases gemcitabine-induced apoptosis in MiaPaca2 pancreatic cancer cells. *Cancer Cell Int* *13*, 26.

- Liberek, K., Lewandowska, A., and Ziętkiewicz, S. (2008). Chaperones in control of protein disaggregation. *EMBO J* 27, 328–335.
- Liebold, J., Winter, R., Golbik, R., Hause, G., Parthier, C., and Schwarz, E. (2015). Conformational stability of the RNP domain controls fibril formation of PABPN1. *Protein Science* 24, 1789–1799.
- Liu, D., Brockman, J.M., Dass, B., Hutchins, L.N., Singh, P., McCarrey, J.R., MacDonald, C.C., and Graber, J.H. (2007). Systematic variation in mRNA 3'-processing signals during mouse spermatogenesis. *Nucleic Acids Res.* 35, 234–246.
- Lodderstedt, G., Hess, S., Hause, G., Scheuermann, T., Scheibel, T., and Schwarz, E. (2007). Effect of oculopharyngeal muscular dystrophy-associated extension of seven alanines on the fibrillation properties of the N-terminal domain of PABPN1. *The FEBS Journal* 274, 346–355.
- Luk, K.C., Kehm, V., Carroll, J., Zhang, B., O'Brien, P., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2012). Pathological α -synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science* 338, 949–953.
- Lutz, C.S. (2008). Alternative polyadenylation: a twist on mRNA 3' end formation. *ACS Chem. Biol.* 3, 609–617.
- Maciel, P., Gaspar, C., DeStefano, A.L., Silveira, I., Coutinho, P., Radvany, J., Dawson, D.M., Sudarsky, L., Guimarães, J., and Loureiro, J.E. (1995). Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. *Am. J. Hum. Genet.* 57, 54–61.
- Maffioletti, S.M., Sarcar, S., Henderson, A.B.H., Mannhardt, I., Pinton, L., Moyle, L.A., Steele-Stallard, H., Cappellari, O., Wells, K.E., Ferrari, G., et al. (2018). Three-Dimensional Human iPSC-Derived Artificial Skeletal Muscles Model Muscular Dystrophies and Enable Multilineage Tissue Engineering. *Cell Rep* 23, 899–908.
- Maison, C., Bailly, D., Peters, A.H.F.M., Quivy, J.-P., Roche, D., Taddei, A., Lachner, M., Jenuwein, T., and Almouzni, G. (2002). Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component. *Nat. Genet.* 30, 329–334.
- Malerba, A., Klein, P., Bachtarzi, H., Jarmin, S.A., Cordova, G., Ferry, A., Strings, V., Espinoza, M.P., Mamchaoui, K., Blumen, S.C., et al. (2017). PABPN1 gene therapy for oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nature Communications* 8, 14848.
- Malerba, A., Roth, F., Harish, P., Dhiab, J., Lu-Nguyen, N., Cappellari, O., Jarmin, S., Mahoudeau, A., Ythier, V., Lainé, J., et al. (2019). Pharmacological modulation of the ER stress response ameliorates oculopharyngeal muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.*
- Malhotra, J.D., and Kaufman, R.J. (2011). ER Stress and Its Functional Link to Mitochondria: Role in Cell Survival and Death. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.
- Mamchaoui, K., Trollet, C., Bigot, A., Negroni, E., Chaouch, S., Wolff, A., Kandalla, P.K., Marie, S., Di Santo, J., St Guily, J.L., et al. (2011). Immortalized pathological human myoblasts: towards a universal tool for the study of neuromuscular disorders. *Skelet Muscle* 1, 34.
- Manjaly, J.G., Vaughan-Shaw, P.G., Dale, O.T., Tyler, S., Corlett, J.C.R., and Frost, R.A. (2012). Cricopharyngeal dilatation for the long-term treatment of dysphagia in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Dysphagia* 27, 216–220.
- Manta, A., Stouth, D.W., Xhuti, D., Chi, L., Rebalka, I.A., Kalmar, J.M., Hawke, T.J., and

- Ljubicic, V. (2019). Chronic exercise mitigates disease mechanisms and improves muscle function in myotonic dystrophy type 1 mice. *J. Physiol. (Lond.)* 597, 1361–1381.
- Mao, Y.S., Zhang, B., and Spector, D.L. (2011). Biogenesis and Function of Nuclear Bodies. *Trends Genet* 27, 295–306.
- Marie-Josée Sasseville, A., Caron, A.W., Bourget, L., Klein, A.F., Dicaire, M.-J., Rouleau, G.A., Massie, B., Langelier, Y., and Brais, B. (2006). The dynamism of PABPN1 nuclear inclusions during the cell cycle. *Neurobiology of Disease* 23, 621–629.
- Martin, J.-J.R., Ceuterick, C.M., and Merceles, R.J. (1982). Nuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Muscle & Nerve* 5, 735–737.
- Mathieu, J., Lapointe, G., Brassard, A., Tremblay, C., Brais, B., Rouleau, G.A., and Bouchard, J.P. (1997). A pilot study on upper esophageal sphincter dilatation for the treatment of dysphagia in patients with oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 7 Suppl 1, S100-104.
- Matoulkova, E., Michalova, E., Vojtesek, B., and Hrstka, R. (2012). The role of the 3' untranslated region in post-transcriptional regulation of protein expression in mammalian cells. *RNA Biology* 9, 563–576.
- McCormack, M.P., and Rabbitts, T.H. (2004). Activation of the T-cell oncogene LMO2 after gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* 350, 913–922.
- McMurray, C.T. (2010). Mechanisms of trinucleotide repeat instability during human development. *Nat Rev Genet* 11, 786–799.
- Menéndez-Benito, V., Verhoef, L.G.G.C., Masucci, M.G., and Dantuma, N.P. (2005). Endoplasmic reticulum stress compromises the ubiquitin–proteasome system. *Hum Mol Genet* 14, 2787–2799.
- Meola, N., Domanski, M., Karadoulama, E., Chen, Y., Gentil, C., Pultz, D., Vitting-Seerup, K., Lykke-Andersen, S., Andersen, J.S., Sandelin, A., et al. (2016). Identification of a Nuclear Exosome Decay Pathway for Processed Transcripts. *Molecular Cell* 64, 520–533.
- Mercuri, E., and Muntoni, F. (2013). Muscular dystrophies (*The Lancet*).
- Messaed, C., and Rouleau, G.A. (2009). Molecular mechanisms underlying polyalanine diseases. *Neurobiol. Dis.* 34, 397–405.
- Messaed, C., Dion, P.A., Abu-Baker, A., Rochefort, D., Laganier, J., Brais, B., and Rouleau, G.A. (2007). Soluble expanded PABPN1 promotes cell death in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neurobiol. Dis.* 26, 546–557.
- Michailovici, I., Eigler, T., and Tzahor, E. (2015). Craniofacial Muscle Development. In *Current Topics in Developmental Biology*, (Elsevier), pp. 3–30.
- Millay, D.P., O'Rourke, J.R., Sutherland, L.B., Bezprozvannaya, S., Shelton, J.M., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2013). Myomaker is a membrane activator of myoblast fusion and muscle formation. *Nature* 499, 301–305.
- Miller, J.D., Ganat, Y.M., Kishinevsky, S., Bowman, R.L., Liu, B., Tu, E.Y., Mandal, P.K., Vera, E., Shim, J., Kriks, S., et al. (2013). Human iPSC-based modeling of late-onset disease via progerin-induced aging. *Cell Stem Cell* 13, 691–705.
- Mirabella, M., Silvestri, G., de Rosa, G., Di Giovanni, S., Di Muzio, A., Uncini, A., Tonali, P., and Servidei, S. (2000). GCG genetic expansions in Italian patients with oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neurology* 54, 608–614.

- Monaco, A.P., Neve, R.L., Colletti-Feener, C., Bertelson, C.J., Kurnit, D.M., and Kunkel, L.M. (1986). Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* 323, 646–650.
- Monier, B., and Suzanne, M. (2015). The Morphogenetic Role of Apoptosis. *Curr. Top. Dev. Biol.* 114, 335–362.
- Morgan, J.E., Beauchamp, J.R., Pagel, C.N., Peckham, M., Ataliotis, P., Jat, P.S., Noble, M.D., Farmer, K., and Partridge, T.A. (1994). Myogenic cell lines derived from transgenic mice carrying a thermolabile T antigen: a model system for the derivation of tissue-specific and mutation-specific cell lines. *Dev. Biol.* 162, 486–498.
- Mori, K. (2000). Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 101, 451–454.
- Müller, T., Schröder, R., and Zierz, S. (2001). GCG repeats and phenotype in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 24, 120–122.
- Muniz, L., Davidson, L., and West, S. (2015). Poly(A) Polymerase and the Nuclear Poly(A) Binding Protein, PABPN1, Coordinate the Splicing and Degradation of a Subset of Human Pre-mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* 35, 2218–2230.
- Muqit, M.M.K., Larner, A.J., Sweeney, M.G., Sewry, C., Stinton, V.J., Davis, M.B., Healy, D.G., Payne, S.J., Chotai, K., Wood, N.W., et al. (2008). Multiple mitochondrial DNA deletions in monozygotic twins with OPMD. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 79, 68–71.
- Nakamoto, M., Nakano, S., Kawashima, S., Ihara, M., Nishimura, Y., Shinde, A., and Kakizuka, A. (2002). Unequal crossing-over in unique PABP2 mutations in Japanese patients: a possible cause of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Arch. Neurol.* 59, 474–477.
- Nandi, D., Tahiliani, P., Kumar, A., and Chandu, D. (2006). The ubiquitin-proteasome system. *J. Biosci.* 31, 137–155.
- Naso, M.F., Tomkowicz, B., Perry, W.L., and Strohl, W.R. (2017). Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs* 31, 317–334.
- Nasrallah, I.M., Minarcik, J.C., and Golden, J.A. (2004). A polyalanine tract expansion in Arx forms intranuclear inclusions and results in increased cell death. *J. Cell Biol.* 167, 411–416.
- Nemeth, A., Krause, S., Blank, D., Jenny, A., Jenö, P., Lustig, A., and Wahle, E. (1995). Isolation of genomic and cDNA clones encoding bovine poly(A) binding protein II. *Nucleic Acids Res.* 23, 4034–4041.
- Neuber, C., Uebeler, J., Schulze, T., Sotoud, H., El-Armouche, A., and Eschenhagen, T. (2014). Guanabenz Interferes with ER Stress and Exerts Protective Effects in Cardiac Myocytes. *PLOS ONE* 9, e98893.
- Nguyen, D., Grenier St-Sauveur, V., Bergeron, D., Dupuis-Sandoval, F., Scott, M.S., and Bachand, F. (2015). A Polyadenylation-Dependent 3' End Maturation Pathway Is Required for the Synthesis of the Human Telomerase RNA. *Cell Rep* 13, 2244–2257.
- Ni, M., Zhang, Y., and Lee, A.S. (2011). Beyond the endoplasmic reticulum: atypical GRP78 in cell viability, signaling and therapeutic targeting. *Biochem J* 434, 181–188.
- Nigam, S.K., Jin, Y.J., Jin, M.J., Bush, K.T., Bierer, B.E., and Burakoff, S.J. (1993). Localization of the FK506-binding protein, FKBP 13, to the lumen of the endoplasmic reticulum. *Biochem J* 294, 511–515.

- Novoselova, T.V., Margulis, B.A., Novoselov, S.S., Sapozhnikov, A.M., van der Spuy, J., Cheetham, M.E., and Guzhova, I.V. (2005). Treatment with extracellular HSP70/HSC70 protein can reduce polyglutamine toxicity and aggregation. *J. Neurochem.* *94*, 597–606.
- Oakes, S.A., and Papa, F.R. (2015). The Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Human Pathology. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* *10*, 173–194.
- Oddo, S. (2008). The ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* *12*, 363–373.
- Oyadomari, S., and Mori, M. (2004). Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ.* *11*, 381–389.
- Park, S.Y., LEE, J.H., KIM, H.Y., YOON, K.H., PARK, S.K., and CHANG, M.S. (2014). Differential expression of apoptosis-related factors induces the age-related apoptosis of the gracilis muscle in humans. *Int J Mol Med* *33*, 1110–1116.
- Parodi, S., Vollono, C., Baglietto, M.P., Balestri, M., Di Duca, M., Landri, P.A., Ceccherini, I., Ottonello, G., and Cilio, M.R. (2010). Congenital central hypoventilation syndrome: genotype-phenotype correlation in parents of affected children carrying a PHOX2B expansion mutation. *Clin. Genet.* *78*, 289–293.
- Passos, E., Ascensão, A., Martins, M.J., and Magalhães, J. (2015). Endoplasmic Reticulum Stress Response in Non-alcoholic Steatohepatitis: The Possible Role of Physical Exercise. *Metab. Clin. Exp.* *64*, 780–792.
- Patel, A., Lee, H.O., Jawerth, L., Maharana, S., Jahnel, M., Hein, M.Y., Stoynev, S., Mahamid, J., Saha, S., Franzmann, T.M., et al. (2015). A Liquid-to-Solid Phase Transition of the ALS Protein FUS Accelerated by Disease Mutation. *Cell* *162*, 1066–1077.
- Périé, S., Eymard, B., Laccourreye, L., Chaussade, S., Fardeau, M., and Lacau St Guily, J. (1997). Dysphagia in oculopharyngeal muscular dystrophy: a series of 22 French cases. *Neuromuscul. Disord.* *7 Suppl 1*, S96-99.
- Périé, S., Mamchaoui, K., Mouly, V., Blot, S., Bouazza, B., Thornell, L.-E., St Guily, J.L., and Butler-Browne, G. (2006). Premature proliferative arrest of cricopharyngeal myoblasts in oculo-pharyngeal muscular dystrophy: Therapeutic perspectives of autologous myoblast transplantation. *Neuromuscul. Disord.* *16*, 770–781.
- Périé, S., Trollet, C., Mouly, V., Vanneaux, V., Mamchaoui, K., Bouazza, B., Marolleau, J.P., Laforêt, P., Chapon, F., Eymard, B., et al. (2014). Autologous myoblast transplantation for oculopharyngeal muscular dystrophy: a phase I/IIa clinical study. *Mol. Ther.* *22*, 219–225.
- Peskett, T.R., Rau, F., O'Driscoll, J., Patani, R., Lowe, A.R., and Saibil, H.R. (2018). A Liquid to Solid Phase Transition Underlying Pathological Huntingtin Exon1 Aggregation. *Mol. Cell* *70*, 588-601.e6.
- Phillips, B.L., Banerjee, A., Sanchez, B.J., Di Marco, S., Gallouzi, I.-E., Pavlath, G.K., and Corbett, A.H. (2018). Post-transcriptional regulation of Pabpn1 by the RNA binding protein HuR. *Nucleic Acids Research* *46*, 7643–7661.
- Picard, M., Hepple, R.T., and Burrelle, Y. (2012). Mitochondrial functional specialization in glycolytic and oxidative muscle fibers: tailoring the organelle for optimal function. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* *302*, C629-641.
- Polak, U., McIvor, E., Dent, S.Y.R., Wells, R.D., and Napierala, M. (2013). Expanded complexity of unstable repeat diseases. *Biofactors* *39*, 164–175.
- Pratt, M.F., and Meyers, P.K. (1986). Oculopharyngeal muscular dystrophy: recent ultrastructural evidence for mitochondrial abnormalities. *Laryngoscope* *96*, 368–373.

- Probst, A., Tackmann, W., Stoeckli, H.R., Jerusalem, F., and Ulrich, J. (1982). Evidence for a chronic axonal atrophy in oculopharyngeal “muscular dystrophy.” *Acta Neuropathol.* *57*, 209–216.
- Proudfoot, N.J. (2011). Ending the message: poly(A) signals then and now. *Genes Dev.* *25*, 1770–1782.
- Prusiner, S.B. (1987). Prions causing degenerative neurological diseases. *Annu. Rev. Med.* *38*, 381–398.
- Rahimov, F., and Kunkel, L.M. (2013). Cellular and molecular mechanisms underlying muscular dystrophy. *J Cell Biol* *201*, 499–510.
- Rambaran, R.N., and Serpell, L.C. (2008). Amyloid fibrils. *Prion* *2*, 112–117.
- Randolph, M.E., Luo, Q., Ho, J., Vest, K.E., Sokoloff, A.J., and Pavlath, G.K. (2014). Ageing and muscular dystrophy differentially affect murine pharyngeal muscles in a region-dependent manner. *J Physiol* *592*, 5301–5315.
- Rankin, J., Wyttenbach, A., and Rubinsztein, D.C. (2000). Intracellular green fluorescent protein-polyalanine aggregates are associated with cell death. *Biochem. J.* *348 Pt 1*, 15–19.
- Rao, R.V., Peel, A., Logvinova, A., del Rio, G., Hermel, E., Yokota, T., Goldsmith, P.C., Ellerby, L.M., Ellerby, H.M., and Bredesen, D.E. (2002). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78. *FEBS Lett.* *514*, 122–128.
- Raper, S.E., Chirmule, N., Lee, F.S., Wivel, N.A., Bagg, A., Gao, G., Wilson, J.M., and Batshaw, M.L. (2003). Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol. Genet. Metab.* *80*, 148–158.
- Raz, V., Abraham, T., van Zwet, E.W., Dirks, R.W., Tanke, H.J., and van der Maarel, S.M. (2011a). Reversible aggregation of PABPN1 pre-inclusion structures. *Nucleus* *2*, 208–218.
- Raz, V., Routledge, S., Venema, A., Buijze, H., van der Wal, E., Anvar, S., Straasheijm, K.R., Klooster, R., Antoniou, M., and van der Maarel, S.M. (2011b). Modeling Oculopharyngeal Muscular Dystrophy in Myotube Cultures Reveals Reduced Accumulation of Soluble Mutant PABPN1 Protein. *The American Journal of Pathology* *179*, 1988–2000.
- Raz, V., Butler-Browne, G., van Engelen, B., and Brais, B. (2013a). 191st ENMC international workshop: recent advances in oculopharyngeal muscular dystrophy research: from bench to bedside 8-10 June 2012, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul. Disord.* *23*, 516–523.
- Raz, V., Sterrenburg, E., Routledge, S., Venema, A., van der Sluijs, B.M., Trollet, C., Dickson, G., van Engelen, B.G., van der Maarel, S.M., and Antoniou, M.N. (2013b). Nuclear entrapment and extracellular depletion of PCOLCE is associated with muscle degeneration in oculopharyngeal muscular dystrophy. *BMC Neurology* *13*, 70.
- Raz, V., Dickson, G., and 't Hoen, P.A.C. (2017). Dysfunctional transcripts are formed by alternative polyadenylation in OPMD. *Oncotarget* *8*, 73516–73528.
- Restivo, D.A., Marchese Ragona, R., Staffieri, A., and de Grandis, D. (2000). Successful botulinum toxin treatment of dysphagia in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Gastroenterology* *119*, 1416.
- Riaz, M., Raz, Y., van Putten, M., Paniagua-Soriano, G., Krom, Y.D., Florea, B.I., and Raz, V. (2016). PABPN1-Dependent mRNA Processing Induces Muscle Wasting. *PLoS Genet.* *12*, e1006031.

- Richard, P., Trollet, C., Gidaro, T., Demay, L., Brochier, G., Malfatti, E., Tom, F.M., Fardeau, M., Lafor, P., Romero, N., et al. (2015). PABPN1 (GCN)11 as a Dominant Allele in Oculopharyngeal Muscular Dystrophy –Consequences in Clinical Diagnosis and Genetic Counselling. *J Neuromuscul Dis* 2, 175–180.
- Richard, P., Roth, F., Stojkovic, T., and Trollet, C. (2016). Dystrophie musculaire oculopharyngée. In *EMC-Neurologie*, (Masson), p.
- Richard, P., Trollet, C., Stojkovic, T., de Becdelievre, A., Perie, S., Pouget, J., Eymard, B., and For the Neurologists of French Neuromuscular Reference Centers CORNEMUS and FILNEMUS (2017). Correlation between PABPN1 genotype and disease severity in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neurology* 88, 359–365.
- Riehl, B.D., Park, J.-H., Kwon, I.K., and Lim, J.Y. (2012). Mechanical Stretching for Tissue Engineering: Two-Dimensional and Three-Dimensional Constructs. *Tissue Engineering. Part B, Reviews* 18, 288.
- Riggs, A.C., Bernal-Mizrachi, E., Ohsugi, M., Wasson, J., Fatrai, S., Welling, C., Murray, J., Schmidt, R.E., Herrera, P.L., and Permutt, M.A. (2005). Mice conditionally lacking the Wolfram gene in pancreatic islet beta cells exhibit diabetes as a result of enhanced endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Diabetologia* 48, 2313–2321.
- Robinson, D.O., Hammans, S.R., Read, S.P., and Sillibourne, J. (2005). Oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD): analysis of the PABPN1 gene expansion sequence in 86 patients reveals 13 different expansion types and further evidence for unequal recombination as the mutational mechanism. *Hum. Genet.* 116, 267–271.
- Rodrigue, D., and Molgat, Y.M. (1997). Surgical correction of blepharoptosis in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 7 *Suppl 1*, S82-84.
- Ron, E., Shenkman, M., Groisman, B., Izenshtein, Y., Leitman, J., and Lederkremer, G.Z. (2011). Bypass of glycan-dependent glycoprotein delivery to ERAD by up-regulated EDEM1. *Mol. Biol. Cell* 22, 3945–3954.
- Roos-Mattjus, P., and Sistonen, L. (2004). The ubiquitin-proteasome pathway. *Ann. Med.* 36, 285–295.
- Rüb, U., Schöls, L., Paulson, H., Auburger, G., Kermer, P., Jen, J.C., Seidel, K., Korf, H.-W., and Deller, T. (2013). Clinical features, neurogenetics and neuropathology of the polyglutamine spinocerebellar ataxias type 1, 2, 3, 6 and 7. *Progress in Neurobiology* 104, 38–66.
- Rüegg, S., Lehky Hagen, M., Hohl, U., Kappos, L., Fuhr, P., Plasilov, M., Müller, H., and Heinemann, K. (2005). Oculopharyngeal muscular dystrophy - an under-diagnosed disorder? *Swiss Med Wkly* 135, 574–586.
- Sadeh, M., Pauzner, R., Blatt, I., Mouallem, M., and Farfel, Z. (1993). Mitochondrial abnormalities in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 16, 982–983.
- Sandri, M., El Meslemani, A.H., Sandri, C., Schjerling, P., Vissing, K., Andersen, J.L., Rossini, K., Carraro, U., and Angelini, C. (2001). Caspase 3 Expression Correlates With Skeletal Muscle Apoptosis in Duchenne and Facioscapulo Human Muscular Dystrophy. A Potential Target for Pharmacological Treatment? *J Neuropathol Exp Neurol* 60, 302–312.
- Scherzinger, E., Lurz, R., Turmaine, M., Mangiarini, L., Hollenbach, B., Hasenbank, R., Bates, G.P., Davies, S.W., Lehrach, H., and Wanker, E.E. (1997). Huntingtin-Encoded Polyglutamine Expansions Form Amyloid-like Protein Aggregates In Vitro and In Vivo. *Cell* 90, 549–558.

- Scheuermann, T., Schulz, B., Blume, A., Wahle, E., Rudolph, R., and Schwarz, E. (2003). Trinucleotide expansions leading to an extended poly-l-alanine segment in the poly (A) binding protein PABPN1 cause fibril formation. *Protein Science* *12*, 2685–2692.
- Schiaffino, S., and Reggiani, C. (2011). Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol. Rev.* *91*, 1447–1531.
- Schmitt, H.P., and Krause, K.H. (1981). An autopsy study of a familial oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) with distal spread and neurogenic involvement. *Muscle Nerve* *4*, 296–305.
- Schober, R., Kress, W., Grahmann, F., Kellermann, S., Baum, P., Günzel, S., and Wagner, A. (2001). Unusual triplet expansion associated with neurogenic changes in a family with oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neuropathology* *21*, 45–52.
- Semmler, A., Kress, W., Vielhaber, S., Schröder, R., and Kornblum, C. (2007). Variability of the recessive oculopharyngeal muscular dystrophy phenotype. *Muscle Nerve* *35*, 681–684.
- Serdaroglu, A., Gücüyener, K., Erdem, S., Köse, G., Tan, E., and Okuyaz, C. (2002). Role of apoptosis in Duchenne’s muscular dystrophy. *J. Child Neurol.* *17*, 66–68.
- de Seze, J., Pasquier, F., Ruchoux, M.M., Hurtevent, J.F., and Petit, H. (1997). [Mitochondrial anomalies in oculopharyngeal muscular dystrophy]. *Rev. Neurol. (Paris)* *153*, 335–338.
- Shan, J., Chen, B., Lin, P., Li, D., Luo, Y., Ji, K., Zheng, J., Yuan, Y., and Yan, C. (2014). Oculopharyngeal muscular dystrophy: phenotypic and genotypic studies in a Chinese population. *Neuromolecular Med.* *16*, 782–786.
- Sheets, M.D., and Wickens, M. (1989). Two phases in the addition of a poly(A) tail. *Genes Dev.* *3*, 1401–1412.
- Shen, N.Y., Ng, S.Y., Toepf, S.L., and Ljubicic, V. (2018). Protein arginine methyltransferase expression and activity during myogenesis. *Biosci. Rep.* *38*.
- Shoubridge, C., and Gecz, J. (2013). POLYALANINE TRACT DISORDERS AND NEUROCOGNITIVE PHENOTYPES (Landes Bioscience).
- Simon, J.-P. (2014). Dystrophie musculaire oculo-pharyngée: analyses histologiques du muscle releveur de la paupière supérieure: analyses préliminaires en vue d’un projet de greffe de myoblastes pour le traitement du ptosis. Thèse d’exercice. Université de Caen. UFR de médecine.
- Sipe, J.D., and Cohen, A.S. (2000). Review: history of the amyloid fibril. *J. Struct. Biol.* *130*, 88–98.
- Sivarao, D.V., and Goyal, R.K. (2000). Functional anatomy and physiology of the upper esophageal sphincter. *Am. J. Med.* *108 Suppl 4a*, 27S-37S.
- Sleeman, J.E., and Trinkle-Mulcahy, L. (2014). Nuclear bodies: new insights into assembly/dynamics and disease relevance. *Curr. Opin. Cell Biol.* *28*, 76–83.
- Soliman, A.Z., Xing, C., Radwan, S.H., Gong, X., and Mootha, V.V. (2015). Correlation of Severity of Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy With Triplet Repeat Expansion in TCF4. *JAMA Ophthalmol* *133*, 1386–1391.
- Song, J., McGivern, J.V., Nichols, K.W., Markley, J.L., and Sheets, M.D. (2008). Structural basis for RNA recognition by a type II poly(A)-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 15317–15322.
- Sousa, J.S., D’Imprima, E., and Vonck, J. (2018). Mitochondrial Respiratory Chain

- Complexes. In *Membrane Protein Complexes: Structure and Function*, pp. 167–227.
- Standart, N., and Weil, D. (2018). P-Bodies: Cytosolic Droplets for Coordinated mRNA Storage. *Trends Genet.* *34*, 612–626.
- Stine, O.C., Pleasant, N., Franz, M.L., Abbott, M.H., Folstein, S.E., and Ross, C.A. (1993). Correlation between the onset age of Huntington's disease and length of the trinucleotide repeat in IT-15. *Hum. Mol. Genet.* *2*, 1547–1549.
- Stöhr, J., Watts, J.C., Mensinger, Z.L., Oehler, A., Grillo, S.K., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., and Giles, K. (2012). Purified and synthetic Alzheimer's amyloid beta (A β) prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *109*, 11025–11030.
- Strasser, H., Tiefenthaler, M., Steinlechner, M., Eder, I., Bartsch, G., and Konwalinka, G. (2000). Age dependent apoptosis and loss of rhabdosphincter cells. *J. Urol.* *164*, 1781–1785.
- Stroo, E., Koopman, M., Nollen, E.A.A., and Mata-Cabana, A. (2017). Cellular Regulation of Amyloid Formation in Aging and Disease. *Front Neurosci* *11*, 64.
- Suhy, D., Graham, M., Trollet, C., MALERBA, A., and DICKSON, G.J. (2017). Réactifs pour le traitement de la dystrophie musculaire oculopharyngée (opmd) et leur utilisation.
- Sun, Y.-M., Zhang, Y.-B., and Wu, Z.-Y. (2017). Huntington's Disease: Relationship Between Phenotype and Genotype. *Mol. Neurobiol.* *54*, 342–348.
- Sunde, M., Serpell, L.C., Bartlam, M., Fraser, P.E., Pepys, M.B., and Blake, C.C. (1997). Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J. Mol. Biol.* *273*, 729–739.
- Suzuki, K., Katsuno, M., Banno, H., Takeuchi, Y., Atsuta, N., Ito, M., Watanabe, H., Yamashita, F., Hori, N., Nakamura, T., et al. (2008). CAG repeat size correlates to electrophysiological motor and sensory phenotypes in SBMA. *Brain* *131*, 229–239.
- Suzuki, S., Utsugisawa, K., Iwasa, K., Satoh, T., Nagane, Y., Yoshikawa, H., Kuwana, M., and Suzuki, N. (2011). Autoimmunity to endoplasmic reticulum chaperone GRP94 in myasthenia gravis. *J. Neuroimmunol.* *237*, 87–92.
- Takigawa, S., Chen, A., Nishimura, A., Liu, S., Li, B.-Y., Sudo, A., Yokota, H., and Hamamura, K. (2016). Guanabenz Downregulates Inflammatory Responses via eIF2 α Dependent and Independent Signaling. *Int J Mol Sci* *17*.
- Talbot, J., and Maves, L. (2016). Skeletal muscle fiber type: using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle disease. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* *5*, 518–534.
- Tan, H., Xu, Z., and Jin, P. (2012). Role of noncoding RNAs in Trinucleotide repeat neurodegenerative disorders. *Exp Neurol* *235*, 469–475.
- Tanaka, M., Machida, Y., Niu, S., Ikeda, T., Jana, N.R., Doi, H., Kurosawa, M., Nekooki, M., and Nukina, N. (2004). Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. *Nat. Med.* *10*, 148–154.
- Tavanez, J.P., Calado, P., Braga, J., Lafarga, M., and Carmo-Fonseca, M. (2005). In vivo aggregation properties of the nuclear poly(A)-binding protein PABPN1. *RNA* *11*, 752–762.
- Tavanez, J.P., Bengoechea, R., Berciano, M.T., Lafarga, M., Carmo-Fonseca, M., and Enguita, F.J. (2009). Hsp70 Chaperones and Type I PRMTs Are Sequestered at Intranuclear Inclusions Caused by Polyalanine Expansions in PABPN1. *PLoS One* *4*.
- Taylor, E.W. (1915). Progressive vagus-glossopharyngeal paralysis with ptosis. A contribution to the group of family. *The Journal of Nervous and Mental Disease* *42*.

- Thomas, M., George, N.I., Saini, U.T., Patterson, T.A., Hanig, J.P., and Bowyer, J.F. (2010). Endoplasmic reticulum stress responses differ in meninges and associated vasculature, striatum, and parietal cortex after a neurotoxic amphetamine exposure. *Synapse* 64, 579–593.
- Thornton, C.A. (2014). Myotonic Dystrophy. *Neurol Clin* 32, 705–719.
- Tilgner, H., Knowles, D.G., Johnson, R., Davis, C.A., Chakraborty, S., Djebali, S., Curado, J., Snyder, M., Gingeras, T.R., and Guigó, R. (2012). Deep sequencing of subcellular RNA fractions shows splicing to be predominantly co-transcriptional in the human genome but inefficient for lncRNAs. *Genome Res.* 22, 1616–1625.
- Todd, T.W., and Lim, J. (2013). Aggregation Formation in the Polyglutamine Diseases: Protection at a Cost? *Mol Cells* 36, 185–194.
- Tofaris, G.K., Razaq, A., Ghetti, B., Lilley, K.S., and Spillantini, M.G. (2003). Ubiquitination of alpha-synuclein in Lewy bodies is a pathological event not associated with impairment of proteasome function. *J. Biol. Chem.* 278, 44405–44411.
- Tomé, F.M., and Fardeau, M. (1980). Nuclear inclusions in oculopharyngeal dystrophy. *Acta Neuropathol.* 49, 85–87.
- Tomé, F.M., and Fardeau, M. (1986). Nuclear changes in muscle disorders. *Methods Achiev Exp Pathol* 12, 261–296.
- Tomé, F.M., Askanas, V., Engel, W.K., Alvarez, R.B., and Lee, C.S. (1989). Nuclear inclusions in innervated cultured muscle fibers from patients with oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neurology* 39, 926–932.
- Tomé, F.M.S., Chateau, D., Helbling-Leclerc, A., and Fardeau, M. (1997). Morphological changes in muscle fibers in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders* 7, S63–S69.
- Tondo, M., Gámez, J., Gutiérrez-Rivas, E., Medel-Jiménez, R., and Martorell, L. (2012). Genotype and phenotype study of 34 Spanish patients diagnosed with oculopharyngeal muscular dystrophy. *J. Neurol.* 259, 1546–1552.
- Toyoshima, Y., and Takahashi, H. (2018). Spinocerebellar Ataxia Type 17 (SCA17). *Adv. Exp. Med. Biol.* 1049, 219–231.
- Tremblay, J.P., Bouchard, J.P., Malouin, F., Théau, D., Cottrell, F., Collin, H., Rouche, A., Gilgenkrantz, S., Abbadi, N., and Tremblay, M. (1993). Myoblast transplantation between monozygotic twin girl carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 3, 583–592.
- Tribouillard-Tanvier, D., Béringue, V., Desban, N., Gug, F., Bach, S., Voisset, C., Galons, H., Laude, H., Vilette, D., and Blondel, M. (2008a). Antihypertensive drug guanabenz is active in vivo against both yeast and mammalian prions. *PLoS ONE* 3, e1981.
- Tribouillard-Tanvier, D., Dos Reis, S., Gug, F., Voisset, C., Béringue, V., Sabate, R., Kikowska, E., Talarek, N., Bach, S., Huang, C., et al. (2008b). Protein Folding Activity of Ribosomal RNA Is a Selective Target of Two Unrelated Antiprion Drugs. *PLoS One* 3.
- Trochet, D., Hong, S.J., Lim, J.K., Brunet, J.-F., Munnich, A., Kim, K.-S., Lyonnet, S., Goridis, C., and Amiel, J. (2005). Molecular consequences of PHOX2B missense, frameshift and alanine expansion mutations leading to autonomic dysfunction. *Hum. Mol. Genet.* 14, 3697–3708.
- Trollet, C., Anvar, S.Y., Venema, A., Hargreaves, I.P., Foster, K., Vignaud, A., Ferry, A., Negroni, E., Hourde, C., Baraibar, M.A., et al. (2010). Molecular and phenotypic characterization of a mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy reveals severe

- muscular atrophy restricted to fast glycolytic fibres. *Hum. Mol. Genet.* *19*, 2191–2207.
- Trollet, C., Gidaro, T., Klein, P., Périé, S., Butler-Browne, G., and Lacau St Guily, J. (2014). Oculopharyngeal Muscular Dystrophy. In *GeneReviews®*, M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J. Bean, K. Stephens, and A. Amemiya, eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle), p.
- Tsanov, N., Samacoits, A., Chouaib, R., Traboulsi, A.-M., Gostan, T., Weber, C., Zimmer, C., Zibara, K., Walter, T., Peter, M., et al. (2016). smiFISH and FISH-quant - a flexible single RNA detection approach with super-resolution capability. *Nucleic Acids Res.* *44*, e165.
- Tsaytler, P., Harding, H.P., Ron, D., and Bertolotti, A. (2011). Selective inhibition of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 restores proteostasis. *Science* *332*, 91–94.
- Uversky, V.N., Oldfield, C.J., and Dunker, A.K. (2008). Intrinsically disordered proteins in human diseases: introducing the D2 concept. *Annu Rev Biophys* *37*, 215–246.
- Van Der Sluijs, B.M., Hoefsloot, L.H., Padberg, G.W., Van Der Maarel, S.M., and Van Engelen, B.G.M. (2003). Oculopharyngeal muscular dystrophy with limb girdle weakness as major complaint. *J. Neurol.* *250*, 1307–1312.
- Vattemi, G., Engel, W.K., McFerrin, J., and Askanas, V. (2004). Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in inclusion body myositis muscle. *Am. J. Pathol.* *164*, 1–7.
- Verheesen, P., de Kluijver, A., van Koningsbruggen, S., de Brij, M., de Haard, H.J., van Ommen, G.-J.B., van der Maarel, S.M., and Verrips, C.T. (2006). Prevention of oculopharyngeal muscular dystrophy-associated aggregation of nuclear polyA-binding protein with a single-domain intracellular antibody. *Hum. Mol. Genet.* *15*, 105–111.
- Vest, K.E., Phillips, B.L., Banerjee, A., Apponi, L.H., Dammer, E.B., Xu, W., Zheng, D., Yu, J., Tian, B., Pavlath, G.K., et al. (2017). Novel mouse models of oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) reveal early onset mitochondrial defects and suggest loss of PABPN1 may contribute to pathology. *Hum. Mol. Genet.* *26*, 3235–3252.
- Victor, M., Hayes, R., and Adams, R.D. (1962a). Oculopharyngeal Muscular Dystrophy. *N Engl J Med* *267*, 1267–1272.
- Victor, M., Hayes, R., and Adams, R.D. (1962b). Oculopharyngeal muscular dystrophy. A familial disease of late life characterized by dysphagia and progressive ptosis of the eyelids. *N. Engl. J. Med.* *267*, 1267–1272.
- Vieira, F.G., Ping, Q., Moreno, A.J., Kidd, J.D., Thompson, K., Jiang, B., Lincecum, J.M., Wang, M.Z., De Zutter, G.S., Tassinari, V.R., et al. (2015). Guanabenz Treatment Accelerates Disease in a Mutant SOD1 Mouse Model of ALS. *PLoS ONE* *10*, e0135570.
- Vilmont, V., Cadot, B., Ouanounou, G., and Gomes, E.R. (2016). A system for studying mechanisms of neuromuscular junction development and maintenance. *Development* *143*, 2464–2477.
- Vinciguerra, P., and Stutz, F. (2004). mRNA export: an assembly line from genes to nuclear pores. *Curr. Opin. Cell Biol.* *16*, 285–292.
- Voisset, C., Blondel, M., Jones, G.W., Friocourt, G., Stahl, G., Chédin, S., Béringue, V., and Gillet, R. (2017). The double life of the ribosome: When its protein folding activity supports prion propagation. *Prion* *11*, 89–97.
- Wagenmakers, A.J. (1998). Protein and amino acid metabolism in human muscle. *Adv. Exp. Med. Biol.* *441*, 307–319.

- Wahle, E. (1991). A novel poly(A)-binding protein acts as a specificity factor in the second phase of messenger RNA polyadenylation. *Cell* 66, 759–768.
- Wallace, G.Q., and McNally, E.M. (2009). Mechanisms of muscle degeneration, regeneration, and repair in the muscular dystrophies. *Annu. Rev. Physiol.* 71, 37–57.
- Wang, Z., and Burge, C.B. (2008). Splicing regulation: From a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA* 14, 802–813.
- Wang, D., Tai, P.W.L., and Gao, G. (2019). Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov.*
- Wang, L., Popko, B., Tixier, E., and Roos, R.P. (2014). Guanabenz, which enhances the unfolded protein response, ameliorates mutant SOD1-induced amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* 71, 317–324.
- Wang, Q., Mosser, D.D., and Bag, J. (2005). Induction of HSP70 expression and recruitment of HSC70 and HSP70 in the nucleus reduce aggregation of a polyalanine expansion mutant of PABPN1 in HeLa cells. *Hum. Mol. Genet.* 14, 3673–3684.
- Warren, S.T. (1997). Polyalanine expansion in synpolydactyly might result from unequal crossing-over of HOXD13. *Science* 275, 408–409.
- Welch, W.J., and Brown, C.R. (1996). Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding. *Cell Stress Chaperones* 1, 109–115.
- Wetterberg, I., Baurén, G., and Wieslander, L. (1996). The intranuclear site of excision of each intron in Balbiani ring 3 pre-mRNA is influenced by the time remaining to transcription termination and different excision efficiencies for the various introns. *RNA* 2, 641–651.
- Winter, R., Kühn, U., Hause, G., and Schwarz, E. (2012). Polyalanine-independent conformational conversion of nuclear poly(A)-binding protein 1 (PABPN1). *J. Biol. Chem.* 287, 22662–22671.
- Wirth, T., Parker, N., and Ylä-Herttuala, S. (2013). History of gene therapy. *Gene* 525, 162–169.
- Wong, K.T., Dick, D., and Anderson, J.R. (1996). Mitochondrial abnormalities in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 6, 163–166.
- Wormington, M., Searfoss, A.M., and Hurney, C.A. (1996). Overexpression of poly(A) binding protein prevents maturation-specific deadenylation and translational inactivation in *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* 15, 900–909.
- Yamaguchi, M., Watanabe, Y., Ohtani, T., Uezumi, A., Mikami, N., Nakamura, M., Sato, T., Ikawa, M., Hoshino, M., Tsuchida, K., et al. (2015). Calcitonin Receptor Signaling Inhibits Muscle Stem Cells from Escaping the Quiescent State and the Niche. *Cell Rep* 13, 302–314.
- Yoon, J.-H., De, S., Srikantan, S., Abdelmohsen, K., Grammatikakis, I., Kim, J., Kim, K.M., Noh, J.H., White, E.J.F., Martindale, J.L., et al. (2014). PAR-CLIP analysis uncovers AUF1 impact on target RNA fate and genome integrity. *Nat Commun* 5, 5248.
- Yu, L., Chen, Y., and Tooze, S.A. (2018). Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *Autophagy* 14, 207–215.
- Yum, K., Wang, E.T., and Kalsotra, A. (2017). Myotonic Dystrophy: Disease Repeat Range, Penetrance, Age of Onset, and Relationship Between Repeat Size and Phenotypes. *Curr Opin Genet Dev* 44, 30–37.
- Yunis, E.J., and Samaha, F.J. (1971). Inclusion body myositis. *Lab. Invest.* 25, 240–248.
- Zammit, P.S. (2017). Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin

and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 72, 19–32.

Zammit, P.S., Golding, J.P., Nagata, Y., Hudon, V., Partridge, T.A., and Beauchamp, J.R. (2004). Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *J. Cell Biol.* 166, 347–357.

Zhang, H., Lee, J.Y., and Tian, B. (2005). Biased alternative polyadenylation in human tissues. *Genome Biology* 6, R100.

Zhang, Y., King, O.D., Rahimov, F., Jones, T.I., Ward, C.W., Kerr, J.P., Liu, N., Emerson, C.P., Kunkel, L.M., Partridge, T.A., et al. (2014). Human skeletal muscle xenograft as a new preclinical model for muscle disorders. *Hum. Mol. Genet.* 23, 3180–3188.

Zhu, C.-H., Mouly, V., Cooper, R.N., Mamchaoui, K., Bigot, A., Shay, J.W., Di Santo, J.P., Butler-Browne, G.S., and Wright, W.E. (2007). Cellular senescence in human myoblasts is overcome by human telomerase reverse transcriptase and cyclin-dependent kinase 4: consequences in aging muscle and therapeutic strategies for muscular dystrophies. *Aging Cell* 6, 515–523.