



**HAL**  
open science

# Implication de la dérégulation de miR-1 et de sa cible Multiplexin dans les défauts cardiaques associés à la dystrophie myotonique de type 1

Anissa Souidi

► **To cite this version:**

Anissa Souidi. Implication de la dérégulation de miR-1 et de sa cible Multiplexin dans les défauts cardiaques associés à la dystrophie myotonique de type 1. Biologie du développement. Université Clermont Auvergne, 2023. Français. NNT : 2023UCFA0006 . tel-04151654

**HAL Id: tel-04151654**

**<https://theses.hal.science/tel-04151654>**

Submitted on 5 Jul 2023

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

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

Université Clermont- Auvergne

Année 2023

**Ecole Doctorale des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie,  
Environnement**

**Thèse**

**Présentée à l'Université Clermont-Auvergne  
pour l'obtention du grade de DOCTEUR  
(Décret du 5 juillet 1984)**

**Spécialité : Génétique et modélisation de maladie humaine  
Soutenue publiquement le mardi 10 janvier 2023**

**SOUIDI Anissa**

**Implication de la dérégulation de *miR-1* et de sa cible  
*Multiplexin* dans les défauts cardiaques associés à la  
dystrophie myotonique de type 1**

**Membres du jury**

**Présidente du jury :** Dr Laurence VANDEL, Université Clermont-Auvergne

**Rapportrice :** Dr Véronique MONNIER, Université Paris Diderot

**Rapporteur :** Dr Laurent PERRIN, Université Aix Marseille

**Rapporteur :** Dr Denis FURLING, Université Paris Sorbonne

**Examinatrice :** Dr Benedicte CHAZAUD, Université Claude Bernard Lyon

**Directeur de thèse :** Dr Krzysztof JAGLA, Université Clermont-Auvergne

**Institut GReD : Génétique, Reproduction & Développement, Université Clermont-Auvergne**

**CNRS (UMR6293) – INSERM (U1103)**

## **Remerciements**

*Ce travail a été réalisé au sein de l'institut GR&D (Génétique, Reproduction et Développement), où j'ai intégré l'équipe « Mécanismes de la diversification des cellules musculaires et cardiaques au cours du développement normal et en conditions pathologiques », dirigée par le Dr Krzysztof JAGŁA. Ce travail a été financé par l'AFM téléthon.*

*Je tiens à remercier en premier lieu mon directeur de thèse Krzysztof JAGŁA. Ce travail n'aurait pu être réalisé sans son soutien permanent, ses conseils avisés et ses remarques instructives. Je le remercie pour sa présence quotidienne à mes côtés jusqu'à la dernière minute de la réalisation de ce travail, sa patience, ses précieux conseils et ses encouragements. Je lui en suis extrêmement reconnaissante. Je lui dis merci pour toutes les heures de discussion sur la stratégie de réalisation de ce projet. Je le remercie également pour l'intérêt marqué avec lequel il a dirigé et suivi le déroulement de ce travail. Je le remercie surtout de m'avoir témoigné toute sa confiance à mes compétences qui m'encourage à continuer dans le domaine de la recherche.*

*Je remercie vivement les membres de mon jury de thèse qui ont accepté de consacrer une partie de leur temps précieux à l'évaluation de ce travail. C'est un grand honneur pour moi d'avoir pu soumettre ce travail à leur regard scientifique.*

*Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à la plus chère à mon cœur « Monika », pour le temps qu'elle m'a consacré afin de me former à effectuer les analyses de la physiologie cardiaque et à m'avoir aidé pour les expériences de la génétique. Je la remercie également d'avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions et d'avoir été disponible à tout moment.*

*Mes plus sincères remerciements vont à ma confidente « Teresa ». Je tiens à la remercier de m'avoir fait partager ses grandes connaissances scientifiques en biologie moléculaire. Je la remercie pour ses encouragements et ses conseils constructifs et surtout pour la création de lignées de mouches transgéniques.*

*Je dois ajouter que ce travail n'a pu être possible que grâce à la contribution de tous les membres de l'équipe JAGŁA. Je remercie chaleureusement Cédric, Guillaume, Sandy, Blandine, Margot, Jean-philippe, Elodie, Elia et Fabian. Je les remercie tous de m'avoir accueilli avec gentillesse et avec ouverture d'esprit. Merci pour vos conseils précieux et aussi pour les moments d'humour que nous avons partagé ensemble. Votre accueil chaleureux après mon retour de mon congé de maternité m'a vraiment marqué. Vous étiez pour moi une très belle expérience aussi bien du point de vue scientifique qu'humain.*

*C'est également avec plaisir que je remercie notre bioinformaticien Yoan pour ses nombreux conseils et sa gentillesse ainsi que pour l'aide qu'il m'a apporté lors des analyses bioinformatiques.*

*Merci à mes chères amies, Souad, Soumia et Manel. Merci à ma chère sœur et à mon très cher frère qui m'ont souvent manqué ces dernières années mais qui m'ont toujours soutenu et encouragé. Merci d'avoir cru en moi.*

### *À mon cher époux*

*Un remerciement spécial s'adresse chaleureusement à mon cher amour « Mohamed ». Nous avons partagé ensemble beaucoup de bonheur durant mes 4 ans de thèse : nous avons commencé notre vie sous le même toit au début de ma thèse et nous avons eu la naissance de notre jolie princesse Imen en dernière année de thèse.*

*Nous avons réussi ensemble à surpasser plusieurs difficultés pour arriver jusqu'à la.*

*Je te remercie d'avoir cru à mes compétences, je te remercie de m'avoir encouragé pendant les moments difficiles, de m'avoir supporté en période de stress surtout les derniers mois de la thèse. Je suis reconnaissante de m'avoir accompagné durant toute ma thèse, et surtout d'avoir choisi de ne pas quitter la ville de Clermont Ferrand et de rester à mes côtés jusqu'à la dernière minute malgré tes obligations professionnelles. Tu es « une perle rare ».*

### *À mon très cher papa*

*C'est avec profonde gratitude que je dédie ce travail à mon très cher papa : tu es loin de mes yeux mais tu ne seras jamais loin de mon cœur*

*Papa ; tu as sacrifié ta vie pour ma réussite, j'espère qu'un jour je pourrais te rendre un peu de ce que tu as fait pour nous faire grandir. Que dieu te prête bonheur et longue vie afin que je puisse à mon tour te combler.*

### *À la mémoire de ma mère...*

*Maman ; tu es partie trop tôt, J'aurais tant voulu que tu assistes à cette réussite et que tu me partages ma joie. Tu as été pour moi un excellent exemple de courage, d'honnêteté, de dignité, de sagesse, et des valeurs humaines. Tu as consacré le meilleur de toi-même à notre éducation pour faire de nous ce que nous sommes aujourd'hui. Que ton âme repose en paix, Maman.*

## Résumé

Les défauts cardiaques sont la seconde cause de décès des patients de la dystrophie myotonique de type 1 (DM1), après les complications respiratoires. Cette maladie neuromusculaire à transmission autosomique dominante est due à une expansion de répétitions CTG dans la région 3'UTR du gène *Dmpk* (*dystrophia myotonica protein kinase*) mettant en jeu un mécanisme de gain de fonction toxique de l'ARN muté. Les transcrits mutés *Dmpk* forment des foci nucléaires qui séquestrent MBNL1 (Muscleblind-like 1) et stabilisent CELF1 (CUGBP, Elav-Like Factors 1). Ces deux facteurs jouent un rôle antagoniste dans la régulation de l'épissage alternatif des transcrits communs responsables de la transition des isoformes de la forme fœtale à la forme adulte. Le déséquilibre de la balance MBNL1/ CELF1 conduit à des défauts d'épissage qui sont responsables de certains symptômes de la DM1. L'objectif de cette étude était d'analyser l'implication de la dérégulation génique via 3'UTR dans les défauts cardiaques associés à la DM1 en utilisant le modèle de Drosophile. Nous avons mis en évidence l'implication de la surexpression de Multiplexin « Mp » (orthologue de collagène XV/ XVIII) dans les défauts cardiaques associées à la DM1. Cette dérégulation met en jeu un mécanisme de régulation génique en région 3'UTR impliquant d'un côté un miARN conservé à expression musculaire et cardiaque, le *miR-1*, et d'un autre côté une régulation potentielle par le facteur Bru3, orthologue de CELF1. L'analyse fonctionnelle de Mp dans la physiologie cardiaque nous a permis de mettre en évidence l'importance de cette protéine dans le maintien de la structure et de la fonction cardiaque chez la Drosophile. Ainsi, nous avons montré que la surexpression de Mp dans le tissu cardiaque conduit à des arythmies cardiaques de type bradycardie et à la cardiomyopathie dilatée, deux symptômes cardiaques observés chez les patients DM1. Je me suis ensuite focalisée sur la cardiomyopathie dilatée, donc j'ai effectué une expérience de sauvetage de phénotype dans la lignée DM1. Nos résultats ont été validés chez l'Homme par le fait que les biopsies cardiaques des patients DM1 avec une cardiomyopathie dilatée présentent une expression très élevée de Col15A1, orthologue de Mp.

## Abstract

Heart defects are the second cause of death in myotonic dystrophy type 1 (DM1) patients, after respiratory complications. DM1 is an autosomal dominant disease caused by an expansion of CTG repeats in 3'-untranslated region of the *dystrophia myotonica protein kinase (DMPK)* gene and involving a toxic gain-of-function mechanism of the mutated RNA. Mutated *DMPK* transcripts form nuclear foci that sequester MBNL1 (Muscleblind-like 1) and stabilize CELF1 (CUGBP, Elav-Like Factors 1). These two factors play an antagonistic role in regulating the alternative splicing of common transcripts responsible for the transition of isoforms from the fetal to the adult form. The imbalance of the MBNL1/CELF1 leads to splicing defects which are responsible of DM1 symptoms. The objective of this study was to analyze the involvement of gene dysregulations on 3'UTR in DM1-associated heart defects using the *Drosophila* model. We have demonstrated the involvement of overexpression of Multiplexin « Mp » (Collagen XV/XVIII in mammals) in cardiac defects observed in DM1. This deregulation brings into play a mechanism of gene regulation in the 3'UTR region involving on the one hand a conserved muscular and heart specific- miRNA, *miR-1*, and on the other hand a potential regulation by the Bru3 factor, ortholog of CELF1. The functional analysis of Mp in cardiac physiology allowed us to highlight the importance of this protein in the maintenance of cardiac structure and function in *Drosophila*. Thus, we have shown that overexpression of Mp in cardiac tissue leads to bradycardia and dilated cardiomyopathy, two cardiac symptoms observed in DM1 patients. I then focused on dilated cardiomyopathy, so I performed a phenotype rescue experiment in the DM1 line. Our results have been validated in humans by the fact that cardiac biopsies from DM1 patients with dilated cardiomyopathy show a very high expression of COL15A1, ortholog of Mp.

## TABLE DE MATIERES

---

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE .....	
I. LA DYSTROPHIE MYOTONIQUE DE TYPE 1 (DM1) .....	1
1. GENERALITES SUR LA DM1 .....	1
2. LES DIFFERENTES FORMES DE LA DM1 ET SYMPTOMES ASSOCIES.....	2
A. Forme congénitale .....	5
B. Forme infantile.....	5
C. Forme adulte .....	6
D. Forme tardive ou asymptomatique .....	6
3. EXEMPLE DE DEUX ATTEINTES DE LA DM1 L : LE MUSCLE SQUELETTIQUE ET CARDIAQUE .....	7
A. Altérations musculaires dans la DM1 .....	7
B. Altérations cardiaques des patients DM1.....	9
a) Généralités sur les propriétés cardiaques.....	9
i. La structure cardiaque .....	9
ii. La fonction cardiaque .....	10
b) Anomalies du cœur des patients DM1 .....	13
i. Troubles de la conduction cardiaque.....	15
• La conduction cardiaque chez les personnes saines .....	15
• Les blocs auriculo-ventriculaires (BAV).....	16
• Le bloc de branche (BB).....	16
ii. Troubles du rythme cardiaque .....	17
• Tachycardies .....	17
• Bradycardies .....	18
• Extrasystoles .....	18
• La fibrillation et le flutter auriculaires .....	18
iii. Mort subite.....	19
iv. Autres manifestations cardiaques.....	20
4. IDENTIFICATION DE LA MUTATION RESPONSABLE DE LA DM1 .....	22
A. Mécanisme d'instabilité des répétitions CTG .....	24
a) Mosaïsme somatique .....	25
b) Mosaïsme gonadique.....	26
II. PATHOGENÈSE DE LA DM1 : CONSÉQUENCES DE LA MUTATION.....	27
1. EFFETS EN CIS DU GENE MUTE DE LA DMPK.....	28
A. Haplo-insuffisance de la protéine DMPK.....	28
B. Répression des gènes adjacents à la DMPK.....	29
2. EFFETS EN TRANS DU TRANSCRIT MUTE DMPK .....	32
A. Le gain de fonction toxique de l'ARN muté .....	32
a) Altération des protéines de liaison à l'ARN dans la DM1 .....	34
i. La famille des Muscleblind-like (MBNL) .....	34
ii. La perte de fonction de MBNL1 dans la DM1.....	34
iii. La famille des CUGBP, Elav-Like Family (CELF) .....	36
iv. Gain de fonction de CELF1 dans la DM1.....	37
b) Effets de dérégulation de la balance MBNL1/CELF1 sur l'épissage alternatif .....	40
c) La dérégulation traductionnelle dans la DM1 .....	44
d) La dérégulation des facteurs de transcription dans la DM1 .....	44
e) La dérégulation des miARN dans la DM1 .....	45
i. Dérégulation des miRNA dans le muscle DM1.....	45
ii. Dérégulation de miARN dans le cœur en DM1.....	47

III.	LA DROSOPHILE COMME MODÈLE D'ÉTUDE DE LA DM1 .....	48
1.	UNE BREVE PRESENTATION DE LA DROSOPHILE .....	48
2.	MODELES DE DROSOPHILE POUR L'ÉTUDE DE LA DM1 .....	52
3.	CARDIOGENESE CHEZ LA DROSOPHILE .....	57
A.	Formation du cœur embryonnaire.....	57
B.	Formation du cœur adulte.....	61
4.	CARDIOGENESE CHEZ LES VERTEBRES .....	63
5.	CONSERVATION DES MECANISMES DE CARDIOGENESE ENTRE DROSOPHILE ET VERTEBRES.....	66
A.	Conservation de la structure et de la fonction cardiaque.....	67
B.	Conservation des voies de signalisation impliquées dans le développement cardiaques.....	68
i.	Conservation des facteurs de transcription .....	69
•	Tinman .....	69
•	Mef2 .....	69
•	HAND.....	70
ii.	Conservation des voies de signalisation .....	70
•	Wg et Dpp .....	70
	OBJECTIFS DU TRAVAIL.....	72
	RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	75
I.	LA DÉRÉGULATION DE <i>MIR-1</i> ET DE SA CIBLE <i>MULTIPLEXIN</i> FAVORISE LA CARDIOMYOPATHIE DILATÉE ASSOCIÉE À LA DYSTROPHIE MYOTONIQUE DE TYPE 1 .....	76
1.	ARTICLE : DEREGULATIONS OF <i>MIR-1</i> AND ITS TARGET <i>MULTIPLEXIN</i> PROMOTE DILATED CARDIOMYOPATHY ASSOCIATED WITH MYOTONIC DYSTROPHY TYPE 1.....	81
II.	RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES NON PUBLIÉS .....	122
1.	IMPLICATION DE <i>BRU3</i> DANS LA REGULATION DE L'EXPRESSION DE <i>MP</i> VIA 3'UTR.....	122
2.	IMPLICATION DE LA DEREGULATION DE <i>MP</i> DANS LES ARYTHMIES CARDIAQUES DANS LA DM1.....	127
III.	MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	158
1.	LIGNEES DE DROSOPHILES .....	158
2.	HYBRIDATION <i>IN SITU</i> STELLARIS.....	158
3.	RT-qPCR POUR ARN <i>MP</i> .....	159
IV.	DISCUSSION.....	160
1.	<i>MIR-1</i> EST DEREGULE DANS LE MODELE DE DROSOPHILE DM1.....	161
2.	<i>MP</i> EST SUREXPRIMEE DANS LES MODELES DM1 VIA UNE REGULATION 3'UTR DEPENDANTE .....	162
3.	LA SUREXPRESSION DE <i>MP</i> EST IMPLIQUEE DANS LES DEFAUTS CARDIAQUES ASSOCIES A LA DM1 .	165
A.	Implication de <i>MP</i> dans la cardiomyopathie dilatée .....	165
B.	Implication de <i>MP</i> dans les arythmies cardiaques .....	167
4.	LA LIGNEE <i>HAND&gt;960CTG</i> REPRESENTE UN MODELE DE LA FORME TARDIVE DM1 .....	168
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....	171
	ANNEXES .....	196

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

---

### Figures

#### Introduction

Figure 1 : Caractéristiques cliniques et moléculaires de la dystrophie myotonique de type 1 (DM1) et 2 (DM2)

Figure 2 : Structure anatomique du cœur humain.

Figure 3 : Schéma d'un électrocardiogramme normal

Figure 4 : Défauts cardiaques observés chez les patients DM1

Figure 5 : Schéma montrant la cardiomyopathie dilatée et hypertrophique chez l'Homme

Figure 6 : Mutation en cause dans la Dystrophie myotonique de type 1 (DM1)

Figure 7 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la physiopathologie de la DM1

Figure 8 : Perturbation de l'équilibre de la balance MBNL1/CELF1 dans la DM1

Figure 9 : Le cycle de développement de la Drosophile à 25°C

Figure 10 : Principe du système UAS/GAL4

Figure 11 : Implication de *miR-1* dans les symptômes cardiaques de la DM1

Figure 12 : Réseau de régulation cardiaque de diversification cellulaire chez la Drosophile

Figure 13 : Développement cardiaque chez la Drosophile

Figure 14 : Le cœur larvaire et adulte de la Drosophile

Figure 15 : Etape du développement du cœur primitif pour donner le cœur à quatre cavités chez l'Homme.

#### Résultats

Figure 16 : Le rôle de Bru3 dans la régulation de Mp.

Figure 17 : Expression de Multiplexin dans le cœur adulte des lignées atténuées pour Mp

Figure 18 : Paramètres rythmiques de la fonction cardiaque des lignées atténuées pour Mp

Figure 19 : Distribution des périodes cardiaques pour la lignée atténuée pour Mp

Figure 20 : Analyse des arythmies dans les lignées atténuées pour Mp

Figure 21 : Distribution des arythmies cardiaques dans la lignée atténuée pour Mp à l'âge de 5 semaines.

Figure 22 : Analyse de paramètres de rythme cardiaque dans une lignée atténuée pour Mp âgées de 5 semaines

Figure 23 : Paramètres contractiles et rythmiques de la fonction cardiaque de la lignée invalidée pour Mp

Figure 24 : Paramètres rythmiques de battement cardiaque des lignées gain de fonction Mp.

Figure 25 : Analyse de paramètres de rythme cardiaque des mouches de la lignée gain de fonction Mp âgées de 5 semaines

Figure 26 : Analyse des arythmies cardiaques dans la lignée gain de fonction de Mp

Figure 27 : Distribution des arythmies dans la lignée gain de fonction de Mp à l'âge d'1 semaine

Figure 28 : Distribution des arythmies cardiaques dans la lignée gain de fonction de Mp à l'âge de 5 semaines

Figures 29 : Analyse de paramètres de rythme cardiaque dans une lignée gain de fonction Mp âgée d'1 semaine

Figure 30 : Expression de Multiplexin dans le modèle DM1 exprimant des expansions CTG

Figure 31 : Analyse de l'arythmie cardiaque dans les modèles DM1

Figure 32 : Prévalence des arythmies dans la lignée DM1 exprimant des expansion CTG âgée d'1 semaine

Figure 33 : Analyse de paramètres de rythme cardiaque dans une lignée DM1 exprimant des expansions CTG âgée d'1 semaine

Figure 34 : Distribution des arythmies cardiaques dans la lignée DM1 exprimant des expansions CTG à 5 semaines

Figure 35 : Analyse de paramètres de rythme cardiaque dans une lignée DM1 exprimant des expansions CTG âgée de 5 semaines

Figure 36 : Distribution des arythmies cardiaques dans la lignée DM1 atténuée pour mbl, mouches âgées d'1 semaine

Figure 37 : Distribution des arythmies cardiaques dans la lignée DM1 atténuée pour mbl, mouches âgées de 5 semaines

Figure 38 : Analyse de paramètres de rythme cardiaque dans une lignée DM1 atténuée pour mbl âgée de 5 semaines

Figure 39 : Pourcentage de mouches qui fibrillent mesuré par SOHA

## **Tableaux :**

**Tableau 1 :** Modèles de souris transgéniques impliquant le rôle pathologique des répétitions CUG

**Tableau 2 :** Liste des principaux pre-ARNs dérégulés dans la DM1

**Tableau 3 :** Liste des gènes conservés dans la cardiogenèse entre la Drosophile et les vertébrés

## **Annexes :**

**Revue 1 :** Dissecting Pathogenetic Mechanisms and Therapeutic Strategies in Drosophila Models of Myotonic Dystrophy Type 1

**Revue 2 :** Drosophila Heart as a Model for Cardiac Development and Diseases

**Court article :** Analyse de miR-1 et de sa cible potentielle Multiplexin dérégulés dans la dystrophie myotonique type 1

## Abréviations :

3'UTR : Three prime Untranslated Transcribed Region

3HNC1 : Collagen tripple helix trimerization region C-terminal non-triple helical domain

4-TU : 4-thio Uracile

abdA : Abdominal A

Acs11: Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 1

Actn : Actinine

ADN : Acide désoxyribonucléique

AH: Hemolymph

AHF : Acute *Heart* Failure

Antp : Antennapedia

Apln: Apelin

ARNi : ARN interference

ARNm : Acide ribonucléique messenger

Asph : Aspartate Beta-Hydroxylase

ATG4 : Autophagy regulator cysteine protease

ATP : Adénosine triphosphate

Atp2a1 : ATPase Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Transporting 1

ATXN2 : Ataxine-2

BAV : Blocs auriculo-ventriculaire

BAV1 : Blocs auriculo-ventriculaire de premier degré

BAV2 : Blocs auriculo-ventriculaire de second degré

BAV3 : Blocs auriculo-ventriculaire de troisième degré

BB : Bloc de branche

BBD : Blocs de branche droite

BBG : Blocs de branche gauche

BMP : Bone morphogenetic protein

Bru3 : Bruno 3

C : Conus

Ca<sup>2+</sup> : Calcium

CaCl<sub>2</sub> : Chlorure de calcium

CACNA1C : Alpha-1 subunit of a voltage-dependent calcium channel

CACNA1S : Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 S  
CACNA2D3)/ $\alpha$ 2 $\delta$ 3 : Calcium Voltage-Gated Channel Auxiliary Subunit Alpha 2 delta 3  
CALM2 : Calmodulin 2  
Capn3 : Calpain 3  
Capzb : Capping Actin Protein Of Muscle Z-Line Subunit Beta  
CB : Cardioblastes  
CCR4-Not : Carbon Catabolite Repression-Negative On TATA-less  
Cdc42 : Cell division control protein 42 homolog  
Cdc42: Cell Division Cycle 42  
CELF1 : CUGBP, Elav-Like Family  
ChIPseq : Chromatin ImmunoPrecipitation Sequencing  
Cl<sup>-</sup> : Chlorure  
CLC-1 : Chloride channel 1  
Clta : Clathrin Light Chain A  
CMD : cardiomyopathie dilatée  
CMV-Dox: Cytomegalovirus  
CNBP : Cellular nucleic acid binding protein  
CNS : Central nervous system  
Col : Collagen  
Col15A1: Collagen15A1  
COUP-TF II : COUP transcription factor 2  
CS: Chondroitin sulphate  
Csda : Enzyme cysteine sulfinatase desulfinate  
CTCF: Corrected Total Cell Fluorescence  
CTG : Cytosine, Thymine, Guanine  
CUG-BP : CUG-binding protein  
CX43 : connexine 43  
DAG1 : Dystroglycan 1  
DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole  
DCM : Dilated cardiomyopathy  
DD: Diastolic diameter  
DGRC : Drosophila Genomics Resource Center

DIABLO : Diablo IAP-Binding Mitochondrial Protein  
DIAP1 : Death-associated inhibitor of apoptosis 1  
DM : Dystrophie myotonique  
DM1 : Dystrophie myotonique de type 1  
DM2 : Dystrophie myotonique de type 2  
dmef2 : Drosophila myocyte enhancer factor-2  
DMPK : Dystrophia myotonica protein kinase  
DMWD : Dystrophia Myotonica containing WD repeat motif  
Doc : Dorsocross  
Dpp : Decapentaplegic  
Dpp : Decepentaplegic  
DsRed : Discosoma red  
ECG : Electrocardiogramme  
ERK : Extracellular signal-regulated kinases  
FC : Fold change  
FGF : Fibroblast growth factor  
FHF : First heart field  
Fhod1 : Formin Homology 2 Domain Containing 1  
FISH : Fluorescence in situ hybridization  
FLNC : Filamin-C  
FMRP : Fragile X Messenger Ribonucleoprotein  
FS: Fractional shortening  
GAG: Glycosaminoglycan  
GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase  
GATA6 : GATA Binding Protein 6  
GFP: Green Fluorescent Protein  
GJA1 :Gap Junction Protein Alpha 1  
Hand : Heart- and neural crest derivatives-expressed protein  
HAND2 : Heart And Neural Crest Derivatives Expressed 2  
HAS : Human skeletal actin  
Hh : Hedgehog  
HK II : Hexokinase II

Hz : Hertz

IR : Insulin receptor

Isl1 : ISL LIM Homeobox 1

KCl: Chlorure de potassium

KCNE : Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily E Regulatory Subunit

KD: Knockdown

kDa : Kilodalton

KNO1 : Knobloch 1

KO : Knock out

LacZ : Beta-galactosidase

Lbe : Ladybird early

Ldb3 : LIM Domain Binding 3

LIN28 : Lin-28 homolog A

LMNA: Lamin A

Mapt : Microtubule Associated Protein Tau

mb1 : Muscleblind

MBNL : Muscleblind-like

MDRS : Muscular Disability Rating Scale

Mef2a : Myocyte enhancer factor 2A

MET : MET Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase

Mfn2 : Mitofusin-2

MgCl<sub>2</sub> : chlorure de magnésium

miARN : Micro acide ribonucléique

MLC2V : Ventricular-specific Myosin light chain-2

Mp : Multiplexin

mPTP : 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine

MRCK : Myotonic dystrophy-related Cdc42-binding kinases

ms : Milliseconde

Mtmt1 : Myotubularine

mTOR : Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase

Multiplexin : Multiple triple-helix domains and interruptions

MYH7 : Myosin heavy chain 7

MyoD : Myogenic differentiation 1

Na<sup>+</sup>: L'ion sodium

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : Dihydrogénophosphate de sodium

NaHCO<sub>3</sub> : Bicarbonate de sodium

NC1 : Non collagen 1

Nedd4 : Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4

Nep4 : Neprilysin 4

NET1 : Nucleotide exchange factor Neuroepithelial Cell Transforming 1

Nk2 : *NK2* homeobox 1

Nkx2.5 : *NK2* Homeobox 5

Notch : Neurogenic locus notch homolog protein

Nurf-38 : Nucleosome remodeling factor - 38kD

O : Oreillette

OD : Oreillette droite

OG : Oreillette gauche

p21 : Protein 21

PA : Pôle artériel

PARN : Poly(A)-Specific Ribonuclease

P-bodies : Processing bodies

PC : Cellules péricardiques

PCR : Polymerase Chain Reaction

Pdlim : PDZ And LIM Domain

PKC : Protéine kinase C

Pnr : Pannier

PNS : Peripheral nervous system

Ppfibp1 : PPFIA Binding Protein 1

PV: Pôle veineux

RAR $\gamma$  : Retinoic Acid Receptor

RBM20: RNA binding motif protein 20

RET : Rearranged during transfection

RISC : RNA-induced silencing complex

RISC : RNA-induced silencing complex

RNP : Ribonucléoprotéines

ROBO2 : Roundabout Guidance Receptor 2

ROCK : Rho-associated protein kinase

ROS : Reactive oxygen species

Rp49 : Ribosomal protein 49

RRM : RNA Recognition Motifs

RT-qPCR: Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR

Ryr2 : Ryanodine receptor 2

S1P1 : S1P receptor 1;

Scn5a : Sodium voltage-gated channel alpha subunit 5

SD : Systolic diameter

Serca1 : Sarco(endo)plasmic reticulum calcium-ATPase 1

SERCA2a : Sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase

Shh : Sonic Hedgehog proteins

siARN : Short interfering RNA

Sirt2 : Silencing information regulator two 2

SIX5 : Sine oculis homeobox homolog 5

Slit : Slit

SMARCA4 : SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamilyA,member 4

snRNP U2 : U2 small nuclear ribonucleoprotein

SOD1 : Superoxide Dismutase 1

SOHA : Semi-automatic Optical Heartbeat Analysis

Sorbs : Sorbin And SH3 Domain Containing

SP1: Specificity Protein 1

Spag9 : Sperm Associated Antigen 9

SPRY1 : Sprouty RTK Signaling Antagonist 1

Src : SRC Proto-Oncogene, Non-Receptor Tyrosine Kinase

SRF : Serum response factor

Ssc : Sperm de saumon

SSS : Sum of Symptoms Score

STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription

stj : Straightjacket  
Stx2 : Syntaxin 2  
Sur : Sulfonylurea receptors  
Svp : Seven-up  
TBP : TATA binding protein  
Tbx : T-box protein  
TBX6 : T-Box Transcription Factor 6  
Tfam : Transcription factor A mitochondrial  
TGFB3 : TGF bêta 3  
TGF $\beta$  : Transforming growth factor-beta  
Tin : Tinman  
Tjp1 : Tight Junction Protein 1  
Tm2 : Tropomyosin 2  
Tnnt2 : Troponin T2  
Tnnt2 : Troponine T cardiaque 2  
TPM1 : Tropomyosin 1  
TpnI : Troponin I  
Trim55 : Tripartite Motif Containing 55  
TRIM63 : Tripartite Motif Containing 63  
tRNA : Transfer RNA  
Tup : Tailup  
TUT4 : Terminal l'uridylyltransférase 4  
Twi : Twist  
U2AF65 : U2 snRNP auxiliary factor 65 kDa  
UAS : Upstream Activating Sequence  
UBE11 : Ubiquitin-activating enzyme E1  
Ubx : Ultrabithorax  
UPRT : Uracile PhosphoRibosyl Transferase  
V : Ventricule  
VCL : Vinculine  
VD : Ventricule droit  
VDEC : Vienna Drosophila Resource Center

VG : Ventricule gauche

VLM : Ventral longitudinal muscle

VNC : Cordon nerveux ventral

Wg : Wingless

Zfh-1 : Zinc-finger homeobox 1

ZFN9 : Zinc finger 9

Znf : Zinc fingers

A MHC : Alpha myosin heavy chain

# **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

## I. LA DYSTROPHIE MYOTONIQUE DE TYPE 1 (DM1)

### 1. Généralités sur la DM1

Certaines personnes qui vont lire cette thèse sont des spécialistes en dystrophie myotonique, d'autres connaissent peu de choses ou pas sur cette maladie. Ce chapitre représente un bon point de départ pour comprendre les bases cliniques et moléculaires de cette pathologie.

Les maladies à expansions microsatellites aussi appelées « maladies à triplets » sont des troubles génétiques impliquant des répétitions « instables et dynamiques » dans un gène donné. Ces répétitions augmentent en nombre de copies jusqu'à qu'elles deviennent pathologiques. Des exemples de tels désordres incluent les maladies à expansion de polyglutamines représentées par la maladie de Huntington, ou les ataxies spino-cerebelleuses où l'allèle lié étendu se situe dans la séquence traduite du gène. Nous avons également le syndrome de l'X fragile, Ataxie de Friedreich et la dystrophie myotonique (DM) où l'allèle étendu se trouve dans une séquence du gène non traduite. En fonction de la localisation de ces extensions dans le gène, elles peuvent causer des effets variables : une perte de fonction de la protéine codée par le gène muté, un gain de fonction dû à la production d'une protéine mutée ou même un mécanisme de gain de fonction toxique de l'ARNm muté.

Les dystrophies myotoniques (DM) sont les formes les plus communes des dystrophies musculaires à transmission autosomique dominante avec une pénétrance variable. Les DM sont caractérisées par une faiblesse et une atrophie des muscles du corps et du visage, une myotonie, une cataracte, une résistance à l'insuline ainsi que par des troubles cardiaques et cognitifs. Deux types sont reconnus : la dystrophie myotonique de type 1 (aussi appelée dystrophie de Steinert, DM1) et la dystrophie myotonique de type 2 (DM2). La DM1 étant le sujet principal de ma thèse, elle est décrite plus en détail dans la partie qui suit.

La DM1 était décrite pour la première fois en 1909 par le médecin allemand Hans Steinert et les médecins anglais Batten et Gibb, qui observaient chez leurs malades une faiblesse musculaire progressive associée à une difficulté du muscle à se relaxer après une contraction ou myotonie et une atrophie musculaire distale et une atrophie des muscles sterno-cléido-mastoïdiens (Batten and Gibb, 1909). La DM1 est une maladie neuromusculaire évolutive et chronique. Cette maladie est considérée multi-systémique puisqu'elle atteint également plusieurs systèmes comme le système musculaire, cardiovasculaire, respiratoire, nerveux

central, endocrinien et oculaire. D'un patient à un autre, les manifestations cliniques sont variables au niveau de la nature des symptômes et de l'âge de leur apparition et leur évolution.

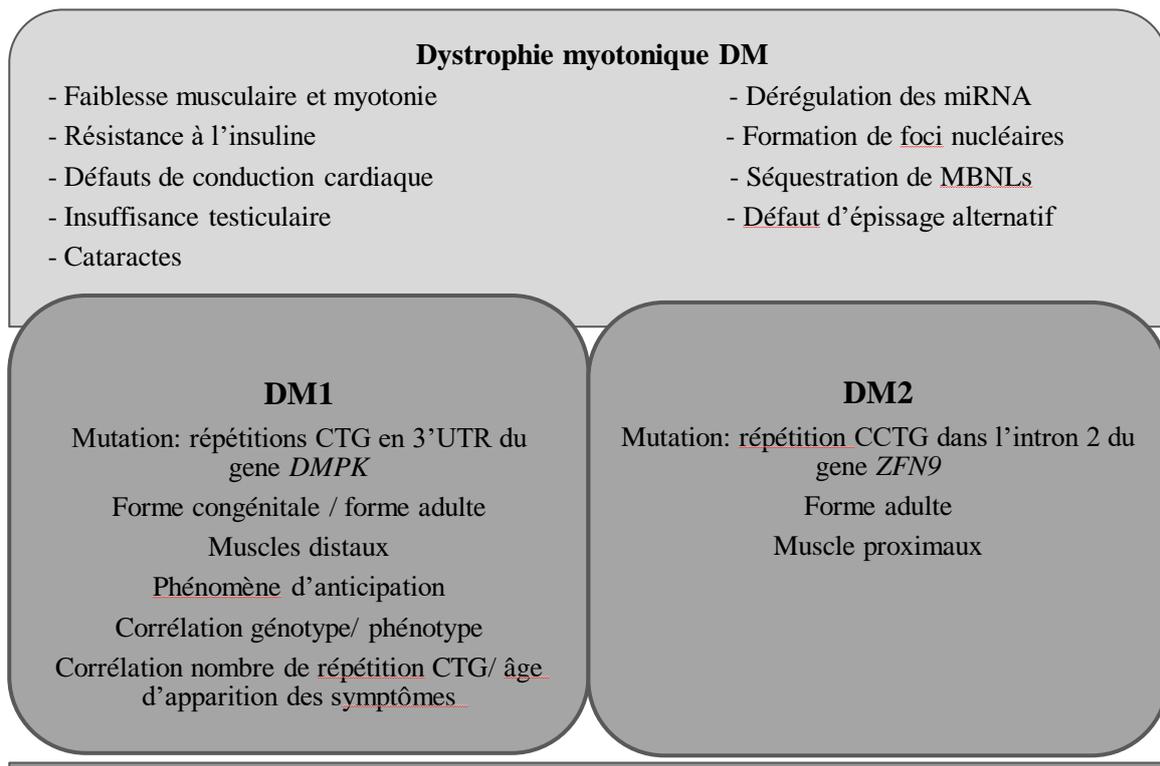
La DM1 est la dystrophie musculaire la plus fréquente chez l'adulte avec une prévalence estimée de 1 naissance /8000 dans le monde (Meola and Cardani, 2015), mais cette prévalence reste variable en fonction des zones géographiques, par exemple, elle est rare en Afrique mais chez les canadiens français dans les régions de Charlevoix et du Saguenay Lac St-Jean (Québec, Canada), la DM1 atteint une prévalence de 1 naissance /550 (Yotova et al., 2005) en raison d'un phénomène de génétique des populations appelé « effet fondateur ». En fait, les patients DM1 de cette région descendaient d'un même couple immigré français installé au Canada au XVIIe siècle (Mathieu et al., 1990) et le taux de fécondité était par la suite particulièrement élevé chez cette population ce qui a créé une forte homogénéité génétique dans la population, responsable de l'amplification de la maladie dans cette région.

Dans ce chapitre j'aborderai dans un premier temps la description des différentes formes de la DM1, ensuite les symptômes des patients atteints de la DM1 en se focalisant sur deux principaux symptômes : musculaires et cardiaques, puis j'aborderai la mutation à l'origine de cette maladie ainsi que les principales caractéristiques de cette mutation.

## **2. Les différentes formes de la DM1 et symptômes associés**

Bien que la DM1 et la DM2 présentent de nombreuses similarités notamment au niveau de mécanisme pathogénique impliquant des expansions de répétition dans une région non codante (la DM1 est causée par des extensions CTG situées dans la région 3'UTR de gène *dystrophia myotonica protein kinase DMPK* situé sur le chromosome 19, et la DM2 par des extensions CCTG situées dans le premier intron du gène *cellular nucleic acid binding protein CNBP* précédemment connu sous le nom de *zinc finger 9 ZFN9* situé sur le chromosome 3), et au niveau de certains symptômes comme la faiblesse musculaire, la résistance à l'insuline, les troubles cardiaques, l'insuffisance testiculaire ainsi que les troubles oculaires tels que la cataracte ou la rétinopathie pigmentaire ; elles présentent également un certain nombre de caractéristiques très différentes, ce qui en fait des maladies clairement distinctes. Par exemple, la DM1 touche principalement les muscles distaux mains et pieds. Cette propriété la différencie de la DM2 qui affecte les muscles proximaux, cuisses et épaules. Ainsi, à l'inverse de la DM1, aucune forme congénitale de la DM2 n'a été décrite. De plus, contrairement à la DM1, la corrélation phénotype-génotype, la corrélation positive entre l'âge d'apparition de

symptômes et le nombre de répétition CTG ainsi que le phénotype d'anticipation n'ont jamais été observés chez les patients DM2 (Schoser, 2020). Enfin, les symptômes musculaires et les dysfonctionnements cardiaques sont plus importants et progressifs chez les patients DM1 en comparaison à ceux observés chez les patients DM2 (Schoser, 2020). Les caractéristiques cliniques et moléculaires de la DM1 et la DM2 sont résumées dans la Figure 1.



**Figure 1 : Caractéristiques cliniques et moléculaires de la dystrophie myotonique de type 1 (DM1) et 2 (DM2).**

Les patients atteints de la DM1 souffrent d'une grande variété de symptômes. Plusieurs études ont montré que l'âge d'apparition des symptômes chez les patients adultes est inversement corrélé à la longueur de répétitions CTG (Kahrizi et al., 2010; Kim et al., 2008) et globalement, plus le nombre de répétitions CTG est élevé, plus les manifestations de la maladie sont sévères et multiples, même si la corrélation n'est pas stricte. Concernant la forme congénitale de la DM1, cette corrélation génotype-phénotype est plutôt respectée. L'analyse d'une cohorte de 42 enfants atteints de la DM1 a montré une corrélation négative entre la taille des répétitions et la forme de la DM1 : plus le nombre d'expansion CTG augmente, plus la maladie apparaît précocement et plus les symptômes sont sévères (Kroksmark et al., 2005). Ainsi, il a été remarquable que les enfants malades présentaient des malformations des pieds et de la colonne vertébrale visiblement plus fréquentes au moment de l'investigation qu'à la naissance, ce qui suggère que les malformations des muscles squelettiques s'aggravent avec l'âge des malades (Kroksmark et al., 2005).

Cependant, cette prédiction phénotypique à partir de nombre de répétitions CTG reste limité par le fait que la corrélation génotype-phénotype n'est pas absolue pour les malades qui présentent un nombre de répétitions faible (Hamshere et al., 1999; Savić et al., 2002). L'analyse de 62 patients DM1 avec un âge moyen de 21 ans a montré que la taille des extensions CTG doit être inférieure à 400 CTG pour que cette corrélation soit respectée (Hamshere et al., 1999), mais dans une autre étude, le seuil est même plus faible et limité à 250 CTG (Savić et al., 2002).

Une étude de corrélation génotype-phénotype portée sur 26 patients DM1 d'origine iranienne, a aussi montré qu'il n'y avait pas de corrélation significative entre l'âge d'apparition de la maladie et la gravité des symptômes cliniques (Kahrizi et al., 2010). Les patients analysés présentaient un âge variable allant de 18 à 60 ans et aucune relation entre le niveau de la gravité de la maladie mesuré par « Muscular Disability Rating Scale (MDRS) » et « Sum of Symptoms Score (SSS) » et le nombre de répétitions CTG n'a été identifié cependant la longueur de ces répétitions était bien corrélée à l'hypogonadisme et aux troubles cognitifs (Kahrizi et al., 2010). Cette variabilité explique d'avoir des malades ayant le même nombre de répétitions CTG, mais qui présentent des symptômes différents et aussi rends la division des malades DM1 en sous-groupes difficile et confuse.

En fonction de la taille des expansions CTG, de la fréquence des symptômes et de l'âge de leur apparition, les patients DM1 ont été divisé en 4 catégories caractérisées par une grande variabilité d'expressions phénotypiques allant de la forme congénitale très sévère, dont les symptômes apparaissent dès la naissance, jusqu'à la forme légère/ asymptomatique, qui se produit beaucoup plus tardivement au cours de l'âge adulte.

### **A. Forme congénitale**

C'est la forme la plus grave avec un nombre de répétitions CTG  $>1000$ . Les signes de la maladie peuvent commencer dès la grossesse par un excès de liquide amniotique (hydramnios) ou des diminutions des mouvements du fœtus (Harper, 1975). A la naissance, les nouveau-nés présentent généralement une hypotonie infantile (bébé mou) et une détresse respiratoire entraînant dans plusieurs cas une mortalité néonatale. Dans 82 % des cas, ces bébés souffrent également d'une dysmorphie faciale (De Antonio et al., 2016). Plus tard, les enfants atteints de cette forme présentent des atteintes du système nerveux central qui sont la cause principale de trouble d'apprentissage et du retard sévère d'acquisition du langage. Les cliniciens ont constaté chez ces patients également des complications respiratoires importantes (66%), une faiblesse musculaire (49%), des défauts de conduction cardiaque (32%), des cataractes (48%) et une myotonie sévère (36%) (De Antonio et al., 2016).

### **B. Forme infantile**

Cette forme apparait dans la première décennie de la vie avec un nombre de répétitions CTG très variable allant de 10 à 1000 CTG. La myotonie représente le premier symptôme important chez les patients de forme infantile suivie d'une fatigue, une hypersomnie, des défauts de conduction (45%) et certaines atteintes du système nerveux central, entraînant un retard du langage. La dysmorphie faciale et les cataractes sont très fréquents dans ce groupe avec une prévalence de 61% et 56% respectivement (De Antonio et al., 2016).

### **C. Forme adulte**

C'est la forme la plus fréquente avec une prévalence de 34% (De Antonio et al., 2016). Les patients DM1 adultes présentent un nombre très variable de répétitions CTG allant de 50 à 1000 répétitions, ce qui explique la grande variabilité des symptômes entre les différents patients appartenant à ce groupe. Dans la DM1 de forme adulte, des symptômes légers commencent à apparaître entre 20 et 25 ans mais généralement les malades ne sont diagnostiqués que plusieurs années plus tard lorsque les symptômes seront plus visibles et plus graves vers les 40 ans. Cette forme est caractérisée par une faiblesse musculaire (45%), une myotonie, des défauts de conduction (50%), une résistance à l'insuline, des défauts respiratoires (32%) et des cataractes (72%). Les troubles endocriniens sont également prédominants dans ce groupe (De Antonio et al., 2016).

### **D. Forme tardive ou asymptomatique**

Les symptômes apparaissent après l'âge de 40 ans et dans la majorité des cas les patients ne s'aperçoivent pas des symptômes car ils sont très légers comme une myotonie légère et des cataractes. Cette forme apparaît chez des personnes ayant un nombre de répétitions très faible de 50 à 100 répétitions CTG.

En fonction des caractéristiques cliniques présentées dans chacune des formes citées, l'espérance de vie varie d'un patient à un autre. Une étude menée sur 367 patients DM1 a montré que l'espérance de vie est considérablement réduite chez les patients DM1 souffrants de diabète, ceux qui sont atteints de la maladie à un âge précoce et ceux qui présentent une atteinte musculaire proximale. L'âge moyen du décès était de 44 ans pour les patients avec un phénotype infantile, de 47 ans pour les patients jeunes adultes, de 55 ans pour les patients adultes et de 63 ans pour les patients avec des phénotypes légers (Mathieu et al., 1999).

Les symptômes musculaires et cardiaques sont les mieux décrits et étudiés chez les patients DM1 et seront détaillés dans le chapitre suivant.

### 3. Exemple de deux atteintes de la DM1 : le muscle squelettique et cardiaque

#### A. Altérations musculaires dans la DM1

Une des principales manifestations de la DM1 est l'atteinte des muscles squelettiques et en particulier les muscles distaux (muscles des mains et des avant-bras pour les membres supérieurs, muscles des pieds et des jambes pour les membres inférieurs). La sévérité des atteintes musculaires est corrélée positivement avec l'âge et la taille des répétitions CTG (Groh et al., 2002).

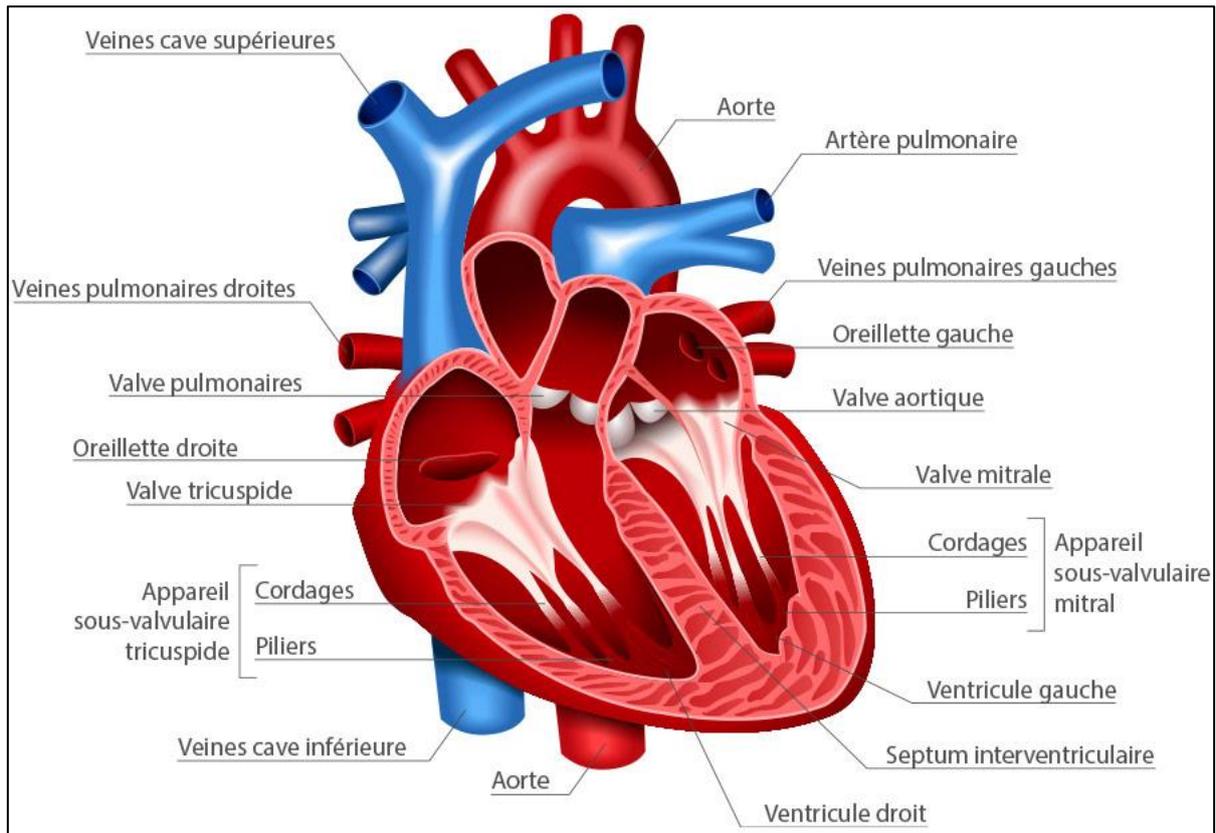
L'atteinte musculaire chez les patients DM1 est caractérisée par une dégénérescence musculaire progressive entraînant une atrophie des muscles distaux et des fibres de type I (lentes), associée à une faiblesse musculaire généralisée (la dystrophie) et une hypercontractibilité et une lenteur anormale et indolore de la décontraction des muscles (la myotonie).

Des altérations histologiques importantes de muscle squelettique ont été observées chez les patients DM1 notamment une division des fibres musculaires « splitting », une variabilité de la taille des fibres, de grosses fibres de type II ou une atrophie des fibres de type I et une centralisation de leurs noyaux (Grimby et al., 1988). L'analyse de biopsies musculaires chez les patients DM1 a mis en évidence une augmentation du nombre de cellules satellites dans les muscles distaux alors que la régénération du tissu musculaire est très peu observée. Les cellules satellites représentent la seule source chez l'adulte qui assurent l'entretien, la réparation et la régénération musculaire cependant cette fonction dépend non seulement du nombre de cellules satellites présentes dans le muscle, mais aussi de leur capacité proliférative qui est très faible chez les patients DM1, ce qui réduit la capacité de régénération du tissu musculaire chez les patients causant une atrophie (Thornell et al., 2009).

L'analyse de myoblastes issus de fœtus DM1 a montré dans un premier temps que le processus de prolifération de myoblastes n'était pas affecté. Cependant leur maturation a été affectée et cela était lié à une diminution de l'expression de l'isoforme de myosine lente ce qui traduirait un défaut de maturation des fibres et pourrait être corrélé avec l'atrophie musculaire observée chez ces patients (Furling et al., 2001b).

Une autre analyse *in vitro* de myoblastes issus de fœtus atteints de la DM1 (avec 1000 à 3000 CTG) a montré également que la capacité proliférative des cellules satellites des patients DM1 de forme congénitale a été réduite et que ces cellules présentent un retard dans la fusion,

la différenciation et la maturation suggérant que les cellules satellites sont probablement impliquées dans le retard de maturation et l'atrophie musculaire décrits chez les fœtus DM1 (Furling et al., 2001a).



**Figure 2 : Structure anatomique du cœur humain.** Le cœur humain est composé principalement de 3 couches : l'endocarde, le myocarde et le péricarde. Il est divisé en 4 cavités : 2 cavités supérieures appelées les oreillettes (droite et gauche) séparées par le septum interauriculaire et 2 cavités inférieures appelées les ventricules (droit et gauche) séparés par le septum interventriculaire (adapté du site internet : sante-sur-le-net.com).

## **B. Altérations cardiaques des patients DM1**

### **a) Généralités sur les propriétés cardiaques**

#### **i. La structure cardiaque**

Le cœur est un organe musculaire creux comparable à une pompe assurant la circulation du sang dans les veines et les artères. Il est connecté au reste de l'organisme par le biais des deux veines caves (inférieure et supérieure), les artères pulmonaires, et l'artère aorte. Le cœur est composé de 4 cavités : deux cavités supérieures appelées « les oreillettes » séparées par le septum inter auriculaire et deux cavités inférieures « les ventricules » séparées par le septum inter ventriculaire. Les oreillettes communiquent aux ventricules par les orifices auriculo-ventriculaires (Figure 2).

Le cœur est donc divisé en deux par une cloison musculaire épaisse, le septum auriculo-ventriculaire, empêchant le sang de passer du cœur droit dit veineux au cœur gauche dit artériel. Le cœur droit constitué d'une oreillette et d'un ventricule droits communiquant par un orifice tricuspide et le cœur gauche constitué d'une oreillette et d'un ventricule gauches communiquant par un orifice mitral.

Le cœur droit propulse dans le système pulmonaire le sang pauvre en oxygène et assure la circulation pulmonaire. Le cœur gauche renferme du sang riche en oxygène, et le propulse par le filtre pulmonaire en direction du réseau artériel périphérique. L'expulsion du sang à l'ensemble du corps ou les poumons se fait respectivement grâce aux valves aortique et pulmonaire. Le sang revient ensuite désoxygéné et chargé de déchets dans l'oreillette droite par l'intermédiaire des veines caves qui le transfert au ventricule droit au travers la valve tricuspide.

Le cœur est composé du myocarde qui constitue les parois du cœur composé de cellules musculaires contractiles appelées les cardiomyocytes. Le myocarde est tapissé à l'intérieur par une mince membrane endothéliale appelée l'endocarde et à l'extérieur par une membrane séreuse de tissu conjonctif appelée le péricarde.

## ii. La fonction cardiaque

Le fonctionnement du cœur est une activité cyclique et discontinue. Lors d'une activité cardiaque normale, au repos, le cœur bat de 60 à 80 battements par minute chez un adulte. Cette fréquence varie en fonction de l'âge. En effet elle est plus élevée chez les nourrissons et basse chez les sujets âgés. Les battements du cœur sont générés et contrôlés par le système de conduction cardiaque. Chaque battement cardiaque entraîne une séquence d'événements mécaniques et électriques collectivement appelés le cycle cardiaque.

### La composante mécanique du cycle cardiaque regroupe 3 phases :

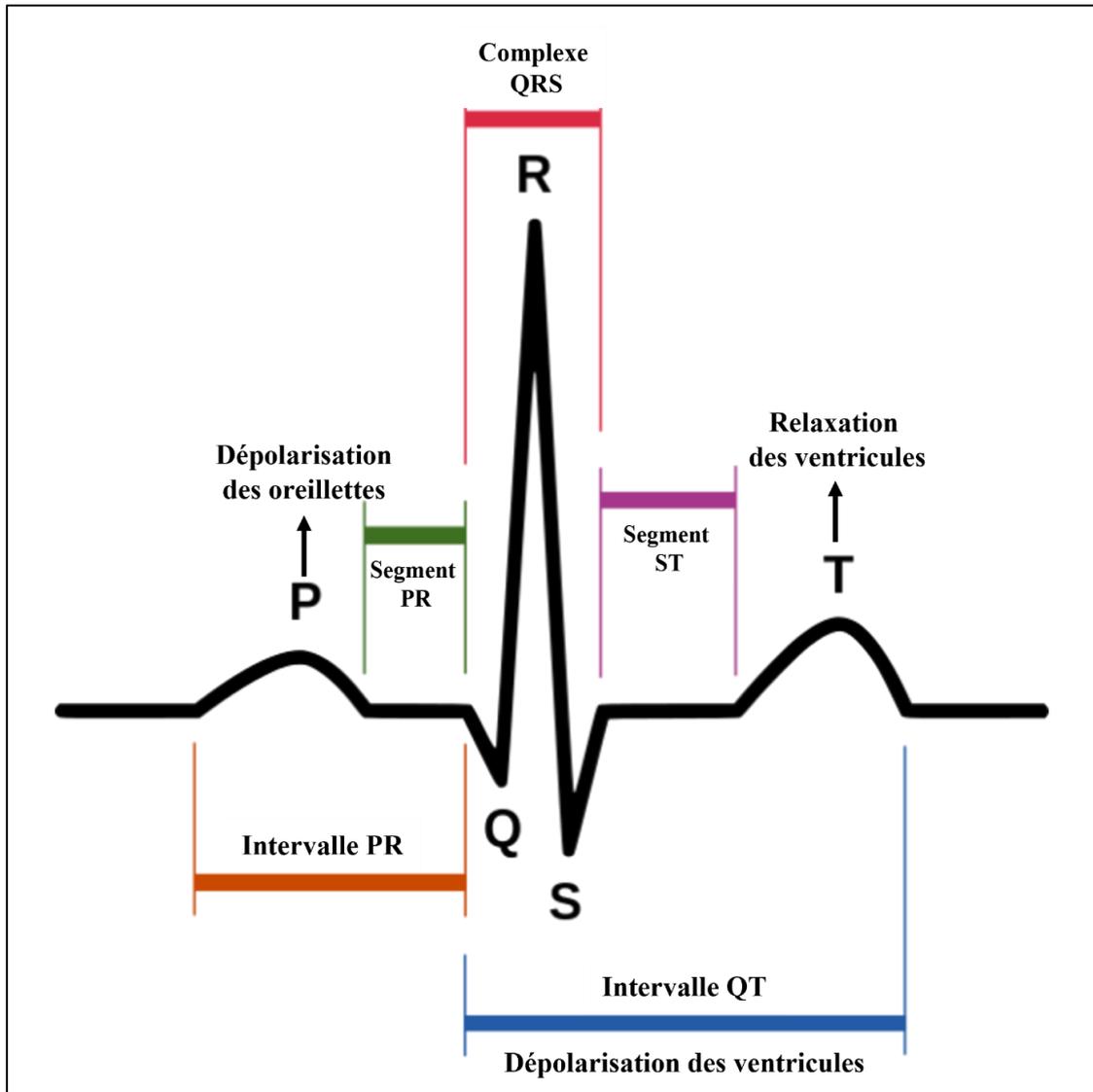
- La systole auriculaire correspond à la contraction des oreillettes pendant que les ventricules se relâchent ce qui permettrait de propulser le sang vers les ventricules. Une fois le sang expulsé des oreillettes, les valvules auriculo-ventriculaires entre les oreillettes et les ventricules se ferment pour éviter un reflux du sang vers les oreillettes.
- La systole ventriculaire implique la contraction des ventricules. Pendant que les oreillettes se relâchent, les ventricules remplis de sang se contractent et expulsent le sang riche en oxygène vers le système circulatoire et donc le reste du corps. Une fois le sang expulsé, les deux valvules sigmoïdes - la valvule pulmonaire à droite et la valvule aortique à gauche se ferment.
- La diastole : pendant cette phase, le myocarde ventriculaire se relaxe permettant le remplissage passif des ventricules et l'arrivée de nouveau sang pauvre en oxygène.

La composante électrique du cycle cardiaque est directement responsable de la phase mécanique et elle est assurée par le tissu nodal, capable de produire de manière automatique, répétitive et spontanée des impulsions électriques régulières responsables des contractions rythmiques du muscle cardiaque. Ces impulsions électriques peuvent être enregistrées grâce à une électrocardiographie et analysées sur l'électrocardiogramme (ECG). L'ECG est une représentation graphique de l'activité électrique du myocarde à chaque contraction. Chaque cycle de dépolarisation/repolarisation du cœur est représenté par un enregistrement toujours dans le même ordre de différentes ondes : P, Q, R, S, et T (Figure 3).

- L'onde P correspond à la contraction des oreillettes droite et gauche (OD, OG), c'est à dire à la dépolarisation de la membrane des cardiomyocytes composant les oreillettes depuis le nœud sinusal vers le nœud auriculo-ventriculaire. C'est une onde de petite amplitude, arrondie, parfois diphasique. L'onde P se caractérise par une bande spectrale

de basse fréquence et de faible amplitude : ses composantes fréquentielles sont entre 0.5 Hz et 10 Hz et sa durée est comprise entre 0.08 et 0.10 seconde.

- L'intervalle PR (ou P-Q) est le temps nécessaire entre la dépolarisation de l'oreillette et celle du ventricule pour la transmission de l'influx électrique des oreillettes aux ventricules. Sur un électrocardiogramme, l'intervalle PR commence au début de l'onde P et s'arrête au démarrage de l'onde QRS. Sa durée varie entre 0.12 et 0.20 seconde.
- Le complexe QRS correspond à la contraction des ventricules droit et gauche (VD, VG), c'est-à-dire, à la dépolarisation de la membrane des cardiomyocytes composant les ventricules. Il est composé des ondes Q, R et S. Le complexe QRS possède un contenu fréquentiel plus important que les autres ondes de l'ECG. Ses composantes fréquentielles sont entre 10 Hz et 15 Hz. Sa durée normale est inférieure à 0.08 seconde.
- L'onde T reflète la repolarisation des ventricules. Elle se caractérise par une bande spectrale analogue à celle de l'onde P entre 0.5 Hz et 10 Hz. La durée de l'onde T est comprise entre 0.18 et 0.22 seconde.
- L'intervalle QT correspond à la contraction et la relaxation ventriculaires (dépolarisation et repolarisation ventriculaire) mesurée entre le début du complexe QRS et la fin de l'onde T et sa durée varie en fonction de la fréquence cardiaque.



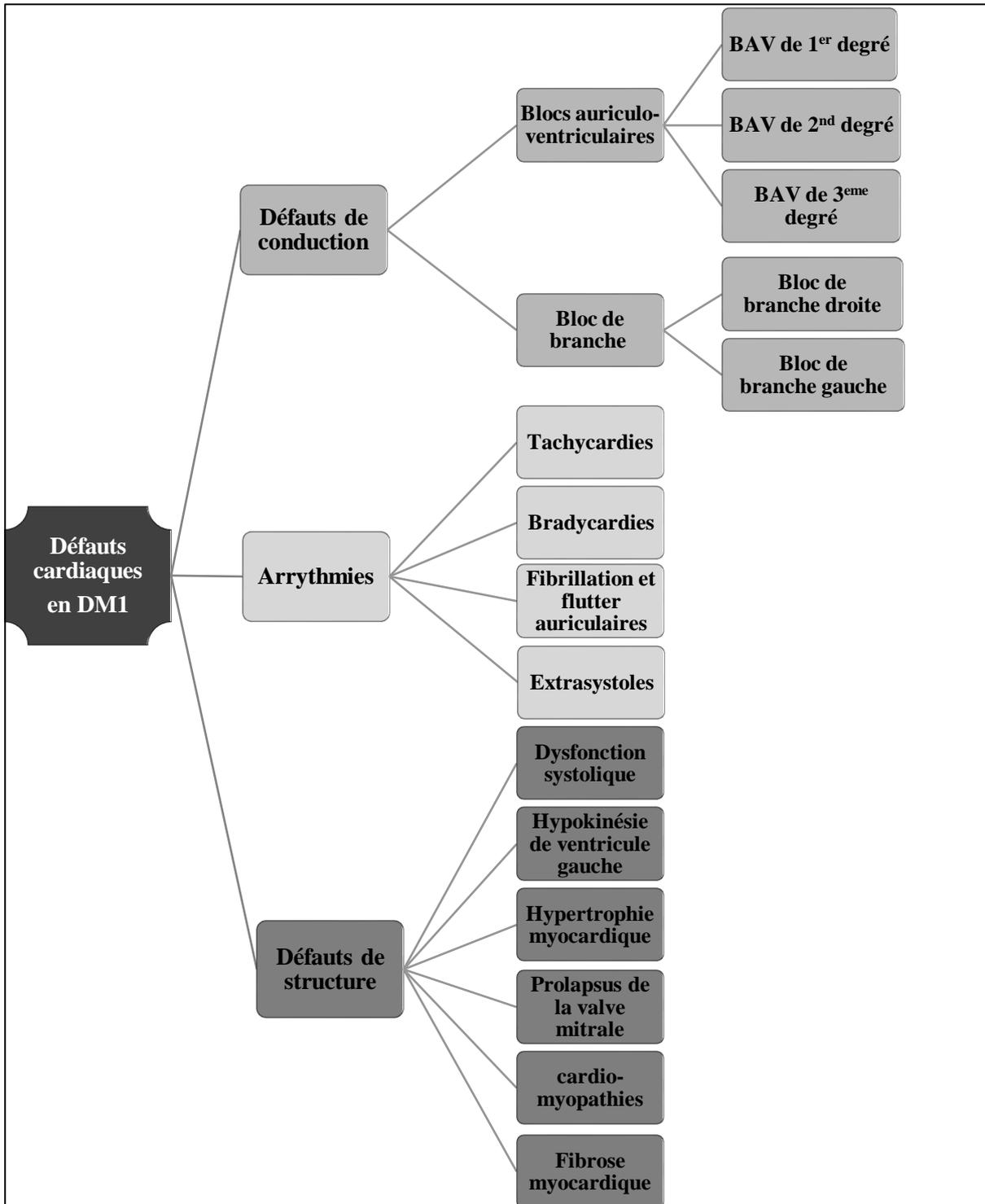
**Figure 3 : Schéma d'un électrocardiogramme normal.** L'ECG enregistre l'activité électrique du cœur sous forme d'ondes. Chaque cycle cardiaque est composé de l'onde P correspondant à la contraction des oreillettes, le complexe QRS correspondant à l'activation des ventricules, l'onde T correspondant à la repolarisation des ventricules et donc à la fin de leur contraction. L'intervalle PR est le temps nécessaire à la transmission de l'influx électrique des oreillettes aux ventricules (adapté du site internet : [entraide-esi-ide.com](http://entraide-esi-ide.com)).

**b) Anomalies du cœur des patients DM1**

Les défauts cardiaques constituent la seconde cause de mortalité (20%) après les défauts respiratoires (43%) chez les patients de la DM1, avec un âge moyen du décès de 53 ans sans différence de sexe : 20 % des décès est dus à des maladies cardiovasculaires et 10.7 % à une mort subite, soit environ 25 ans plutôt que prévu dans une population normale (Mathieu et al., 1999). Au niveau cardiaque, les défauts de conduction et les arythmies cardiaques semblent responsables de la diminution de l'espérance de vie chez ces patients (Wahbi et al., 2013).

Une analyse rétrospective basée sur les données d'une période allant de 1977 à 2011 et menée sur une cohorte de 1186 patients DM1 a montré que plus de 80% des patients DM1 présentent des symptômes cardiaques (Lund et al., 2014). Les défauts cardiaques apparaissent généralement plusieurs années après le début des symptômes neuromusculaires. Cependant, chez certains patients, les défauts cardiaques ont été observés au début de la maladie et peuvent même présenter la première manifestation de diagnostic de la DM1. Ces manifestations sont variables incluant les troubles de conduction, les arythmies, les défauts de fonctionnement diastoliques et/ou systoliques et les cardiomyopathies (Bhakta et al., 2004; Lund et al., 2014; Paunic et al., 2017, 2017) (Figure 4). Une ancienne étude d'une cohorte de 38 patients DM1 a révélé le lien entre la sévérité de la maladie et les atteintes cardiaques. La prévalence des ECG anormaux était de 31, 50 et 100 % des patients atteints d'une forme légère, modérée et sévère de la maladie, respectivement (Forsberg et al., 1988).

Ainsi, une autre étude menée sur 406 patients DM1 a montré que la sévérité des anomalies cardiaques chez ces patients est corrélée à l'âge du patient, les symptômes de muscle squelettique sévères, et le nombre élevé de répétitions CTG (Groh et al., 2008).



**Figure 4 : Défauts cardiaques observés chez les patients DM1.** Les défauts cardiaques observés chez les patients DM1 peuvent être classés en trois catégories principales : les défauts de la conduction cardiaque, les arythmies et les défauts de structure.

## **i. Troubles de la conduction cardiaque**

- **La conduction cardiaque chez les personnes saines**

Le système de conduction cardiaque est l'ensemble de structures responsables de la génération et de la transmission de l'influx électrique permettant la contraction du cœur. Ce système se compose du nœud sinusal, le nœud atrio-ventriculaire, le faisceau de His et les fibres de Purkinje.

Le signal électrique cardiaque commence dans le nœud sinusal (nœud de Keith et Flack) qui est un amas cellulaire situé dans la paroi atriale droite à proximité de l'abouchement de la veine cave supérieure. Le nœud sinusal a pour fonction d'assurer la fréquence cardiaque et de la moduler en permanence en fonction des besoins de l'organisme et il représente le « pacemaker naturel du cœur ». Spontanément, le nœud sinusal produit des décharges électriques, environ 100 décharges par minute. Là le nerf pneumogastrique appelé aussi nerf vagal est chargé de les ralentir. L'influx est stabilisé autour de 70 décharges par minute (au repos).

Après sa naissance dans le nœud sinusal, l'influx traverse les deux oreillettes, puis arrive jusqu'au nœud d'Atchoff Tawara (encore appelé nœud auriculo-ventriculaire) situé au niveau du plancher de l'oreillette droite dans le septum atrioventriculaire, qui permet le relai de l'influx entre les oreillettes et les ventricules. L'activité électrique se propage dans les ventricules le long du tronc du faisceau de His. Celui-ci se divise en deux branches l'une allant dans le ventricule droit (branche droite) et l'autre dans le ventricule gauche (branche gauche). Les deux branches droite et gauche terminent leur parcours dans les fibres de Purkinje. Dès que l'influx les parcourt, les ventricules vont se contracter permettant le pompage du sang vers les poumons et le corps.

Les troubles de la conduction sont essentiellement les blocages de la conduction ou au contraire leur exagération due à une propagation anormale des influx électriques au sein du cœur et peuvent être classés en fonction de leur localisation et de leur degré de sévérité.

Le problème cardiaque majeur qui peut survenir dans la DM1 vient des troubles de conduction qui touchent 40% (Facenda-Lorenzo et al., 2013) à 58% (Hermans et al., 2012) des patients atteints de la DM1 et dans 20% des cas, cela nécessite l'implantation d'un pacemaker afin de prévenir le risque de mort subite (Facenda-Lorenzo et al., 2013).

Les blocs de conduction sont les principaux défauts observés chez les patients DM1 et peuvent être classés en deux groupes :

- **Les blocs auriculo-ventriculaires (BAV)**

Ce sont les plus fréquents et prennent également plusieurs formes :

- BAV de 1<sup>er</sup> degré lié au retard de la propagation de l'influx électrique le long du système de conduction associé à une élongation de l'intervalle PR ( $PR > 220$  ms) touchant 28.2% d'un groupe de 1828 patients DM1 (Petri et al., 2012) et 31% dans une autre étude portée sur 81 patients (Facenda-Lorenzo et al., 2013), ou un défaut de la dépolarisation des ventricules se traduisant par un élargissement du complexe QRS ( $QRS > 120$  ms) touchant 19.9% d'un groupe de 1828 patients DM1, ou une élongation de l'intervalle QT ( $QT > 440$  ms) touchant 22% de 1828 patients DM1 (Petri et al., 2012). Généralement les patients avec BAV1 sont asymptomatiques ou présentent des symptômes légers comme un rythme cardiaque lent, des palpitations, ou une fatigue. Cependant BAV1 s'est avéré associé à un risque accru de fibrillation auriculaire, d'implantation de pacemaker et de mortalité (Petri et al., 2012).
- BAV de 2<sup>nd</sup> degré lié au passage de l'influx pour une partie des battements à cause d'un défaut du rythme de dépolarisation entre les oreillettes et les ventricules conduisant à une onde P irrégulière. Ce type de bloc est aussi observé chez 8% des patients DM1 (Forsberg et al., 1988).
- BAV de 3<sup>eme</sup> degré lié au blocage complet de l'influx due à une dissociation complète entre les oreillettes et les ventricules (absence de l'onde P). BAV3 était aussi observé chez les patients DM1 mais avec une prévalence faible (Groh et al., 2008).

- **Le bloc de branche (BB)**

C'est un blocage de flux électrique qui touche l'une des branches du faisceau de His, et se manifeste par une arythmie due au asynchronisme de la contraction de ventricules qui n'est généralement pas ressentie. Nous distinguant les blocs de branche droite (BBD) ou gauche (BBG) qui interviennent chez 4.4% et 5.7% des patients DM1, respectivement (Petri et al., 2012).

Enfin, les anomalies de conduction cardiaque semblent associées positivement avec le nombre de répétitions CTG et les symptômes neuromusculaires et aussi progresser avec l'âge du patient et le sexe masculin (Groh et al., 2002; Hermans et al., 2012; Petri et al., 2012).

Le diagnostic permettant d'identifier le type de trouble de conduction chez les patients est effectué par ECG, Le Holter (enregistrement de 24 heures du rythme cardiaque), ou par exploration électrophysiologique.

## ii. Troubles du rythme cardiaque

Au repos, le cœur bat au rythme de 60 à 100 battements par minute chez les adultes et les enfants, et de 90 à 120 battements par minute chez un nourrisson. Ce rythme varie en réponse à l'exercice et à différents stimuli (peur, café).

Les troubles du rythme cardiaques appelés « arythmies » correspondent à l'existence de battements irréguliers, trop lents ou trop rapides, sans raison apparente. Les arythmies représentent le deuxième type de défauts cardiaques le plus fréquent chez les patients DM1 (56%) après les défauts de conduction (Groh et al., 2002) et sont souvent retrouvées chez les jeunes patients, y compris les adolescents ayant des antécédents de DM1 congénital (Bassez et al., 2004; Igarashi et al., 1998) et semblent corrélées positivement avec l'âge du patient et le nombre élevé des répétitions CTG (Groh et al., 2002).

Les arythmies sont classées selon leur effet sur les battements du cœur : accélération (tachycardie), ralentissement (bradycardie) ou irrégularité (extrasystole, la fibrillation et le flutter auriculaires).

- **Tachycardies**

Elles se traduisent par une augmentation de la fréquence des battements du cœur (ou d'une partie du cœur) au-dessus de 100 battements par minute au repos. Les tachycardies sont classées selon leur origine anatomique en 2 groupes :

- Les tachycardies dites « ventriculaires » qui naissent des ventricules et se traduisent par des battements anormalement rapides : entre 120 et 250 par minute et qui sont fréquentes et plus au moins sévères chez les patients DM1 (Merino et al., 1998; Nikhanj et al., 2019).
- Les tachycardies dites « supraventriculaires » se traduisent par un pouls situé entre 160 et 200 battements par minute pendant quelques minutes, voire quelques heures et proviennent-elles d'au-dessus des ventricules : soit des oreillettes (exemple : tachycardie

atriale, fibrillation atriale, flutter atrial). Soit de la jonction entre les oreillettes et les ventricules (tachycardie jonctionnelle). Une étude portée sur 51 patients DM1 a révélé une prévalence de 3.8% de tachycardies supraventriculaires (Bienias et al., 2016).

- **Bradycardies**

La bradycardie est définie par un rythme cardiaque anormalement lent avec une fréquence cardiaque inférieure à 50 battements par minute. Les cliniciens décrivent la présence de bradycardie chez les patients DM1 mais avec une prévalence variable d'un groupe d'étude à un autre allant de 27% (Paunic et al., 2017), à 48.8% (Facenda-Lorenzo et al., 2013) ou même à 58% (Forsberg et al., 1988).

- **Extrasystoles**

Ce sont des battements prématurés ventriculaires, irréguliers survenus occasionnellement en dehors des battements normaux, le plus souvent suivis d'une période de repos un peu plus longue que la normale. 14.6 % des patients DM1 présentent ce type d'arythmie (Petri et al., 2012).

- **La fibrillation et le flutter auriculaires**

La fibrillation et le flutter auriculaires sont des formes de décharges électriques très rapides qui entraînent une accélération importante du rythme de contraction des oreillettes : de 300 à 500 battements par minute ; quelques-unes de ces impulsions électriques parviennent à se transmettre aux ventricules et les font parfois se contracter avec plus de rapidité compris entre 40 et 200 pulsations par minute et une moindre efficacité que la normale, souvent de manière irrégulière.

La fibrillation et le flutter auriculaires sont souvent observés chez les patients DM1 avec une fréquence très variable allant de 8% à 32% des cas. Dans une étude menée sur 38 patients DM1 adultes, la fibrillation et le flutter auriculaires étaient présents chez 8 % des patients tous avec une forme DM1 sévère (Forsberg et al., 1988). Des résultats similaires ont été observés dans une revue de la littérature récente couvrant la période de 2002 à 2020 qui a rapporté une incidence d'environ 10.9 % dans un groupe de 3677 patient DM1 (Russo et al., 2021). Cette

prévalence était plus importante dans une autre étude menée sur 161 patients DM1 (la plupart étaient asymptomatiques), et augmentée à environ 17 % dans l'étude de Brembilla-Perrot (Brembilla-Perrot et al., 2014). La prévalence la plus élevée de la fibrillation et le flutter auriculaires était décrite dans deux études : une revue de la littérature sur les myopathies, couvrant la période de 1966 à 1987, a décrit une incidence supérieure à 30 % (Finsterer and Stöllberger, 2008) et une étude dans une petite cohorte de 25 patients DM1 a décrit une prévalence de 32% (Benhayon et al., 2015).

Le sexe masculin, les défauts de conduction, les résultats d'ECG montrant un retard électromécanique auriculaire semblent être fortement associés à la fibrillation auriculaire (Benhayon et al., 2015; Russo et al., 2021). Plusieurs études ont montré que la fibrillation et le flutter auriculaires présentent un facteur prédictif de mort subite dans la DM1 (Brembilla-Perrot et al., 2014; Groh et al., 2008) et que les patients DM1 qui développent la fibrillation et le flutter auriculaires présentent un risque plus élevé de décès allant jusqu'à 16% (Benhayon et al., 2015; Russo et al., 2021).

### iii. Mort subite

Les patients DM1 ont un risque accru de mort subite (Groh et al., 2008). Une étude nationale danoise chez les patients DM1 a révélé un taux d'incidence de 2.8 pour 100 000 ce qui reflète un taux d'incidence de mort subite 3 fois plus élevé que la population générale (Petri et al., 2012). Au cours d'une étude portée sur 406 patients DM1 pour une durée de 5 ans, 20 % des malades sont décédés dont 33.3 % des décès étaient soudains (Groh et al., 2008). Dans une étude plus récente menée sur 1296 patients DM1, ce pourcentage était plus élevé arrivant à 43% (Wahbi et al., 2018).

La mort subite peut survenir chez les patients DM1 à la suite d'une fibrose myocardique, une dégénérescence du système de conduction cardiaque (Phillips and Harper, 1997), une asystole ventriculaire, une dégénérescence de la tachycardie ventriculaire, une fibrillation ventriculaire ou une dissociation électromécanique (Pelargonio et al., 2002).

Plusieurs études ont également trouvé des corrélations positives entre la taille des répétitions CTG (dans le sang) et la gravité/ou la présence de défauts de conduction cardiaque, et le risque de mort subite chez les patients DM1 (Chong-Nguyen et al., 2017; Petri et al., 2012) tandis que d'autres n'ont pas trouvé une telle corrélation (Merlevede et al., 2002). Une

étude menée par Groh a permis de mettre en évidence des prédicteurs de la mort subite avec une sensibilité de 81.5 %. Ces prédicteurs incluent la présence d'une anomalie sévère de l'ECG et une tachyarythmie atriale. Enfin, l'implantation d'un défibrillateur ou d'un pacemaker reste le moyen le plus adapté pour prévenir la mort subite chez les patients (Groh et al., 2008).

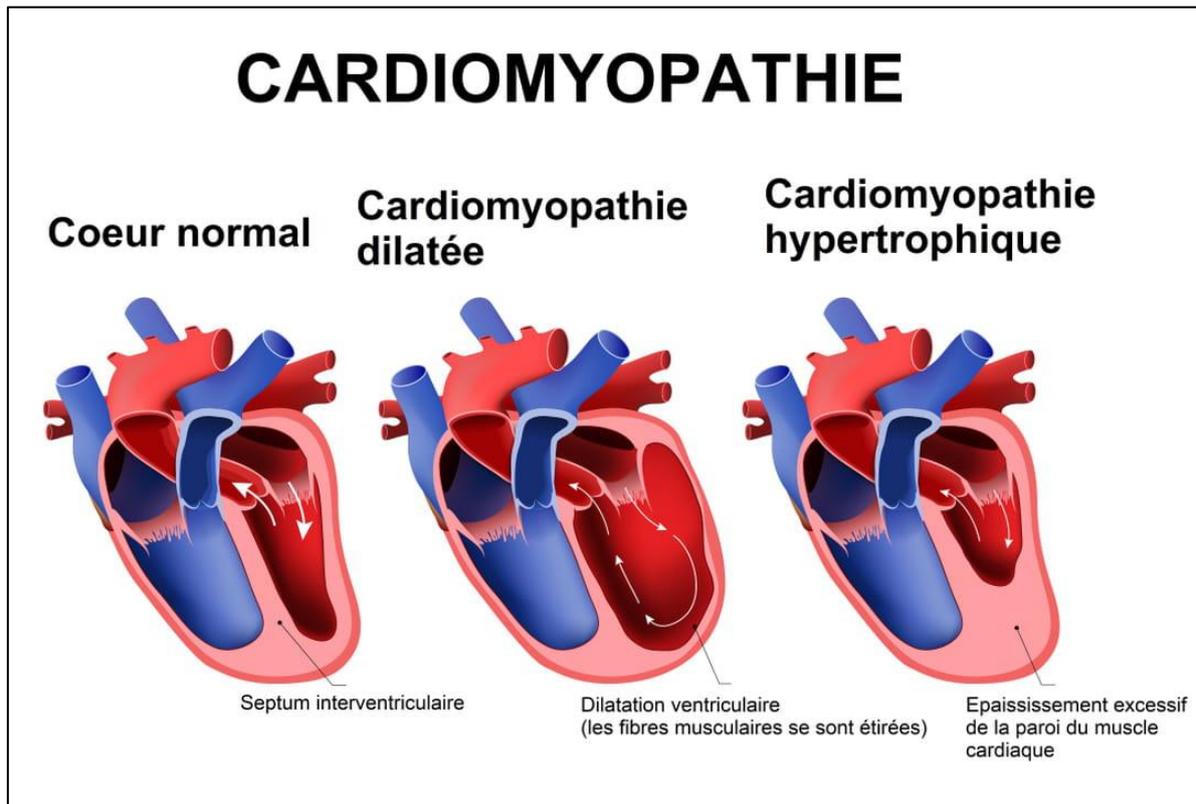
#### **iv. Autres manifestations cardiaques**

En plus des défauts de conduction et des arythmies qui sont généralement diagnostiqués par l'ECG, les patients DM1 souffrent d'autres défauts cardiaques non visibles par l'ECG et leur diagnostic nécessite une imagerie par résonance magnétique cardiovasculaire. Ceux sont des défauts de structure (Bhakta et al., 2004). Une étude sur une cohorte de 80 patients DM1 a montré que 39% des patients DM1 présentaient un ECG normal, dont 16% présentaient des altérations myocardiques détectées par résonance magnétique cardiovasculaire. Ces altérations regroupent une dysfonction systolique de ventricule gauche, une hypokinésie de ventricule gauche, une hypertrophie myocardique (Hermans et al., 2012), un prolapsus de la valve mitrale et une anomalie régionale du mouvement de la paroi (Bhakta et al., 2004). Plus rarement, les patients DM1 présentent aussi une insuffisance cardiaque (Lund et al., 2014; Papa et al., 2018). Une étude menée sur 30 patients DM1, a également révélé la présence de fibrose myocardique chez 40% des patients DM1 (Petri et al., 2014).

Les cardiomyopathies sont aussi observées chez les patients DM1 avec une prévalence de 10% (Schilling et al., 2013). Les cardiomyopathies sont décrites comme des maladies du myocarde dans lesquelles la structure et la fonction cardiaque sont anormales. Elles sont détectées principalement par les techniques d'imagerie, telles que l'échocardiographie et la résonance magnétique cardiovasculaire permettant de visualiser les dimensions et la fonction des ventricules. Chez les patients DM1, deux types de cardiomyopathies ont été observés :

La cardiomyopathie dilatée (CMD) qui se caractérise par une dilatation de la cavité cardiaque généralement le ventricule gauche, ainsi que l'apparition d'un dysfonctionnement contractile (Figure 5). Elle est rare chez les patients DM1 mais généralement grave et nécessitant une implantation du cœur, solution qui semble difficile notamment pour trouver des donateurs (Hermans et al., 2012; Isrie et al., 2019; Lin et al., 1989; Harold H. Nguyen et al., 1988; Papa et al., 2018; Premawardhana and Thirunavakarasu, 1992; Schilling et al., 2013). Un autre type de cardiomyopathie qui a été observé chez les patients DM1 est la cardiomyopathie

hypertrophique (Pelargonio et al., 2002) qui se caractérise par une hypertrophie cardiaque asymétrique (Figure 5).



**Figure 5 : Schéma montrant la cardiomyopathie dilatée et hypertrophique chez l'Homme.** Dans la cardiomyopathie dilatée la cavité cardiaque se dilate induisant un affaiblissement du muscle du ventricule gauche (ou droit) et une diminution de l'efficacité de contraction du muscle cardiaque. Dans la cardiomyopathie hypertrophique, le muscle cardiaque devient épais ce qui provoque un blocage à la sortie du cœur (adapté du site internet : [journaldesfemmes.fr](http://journaldesfemmes.fr)).

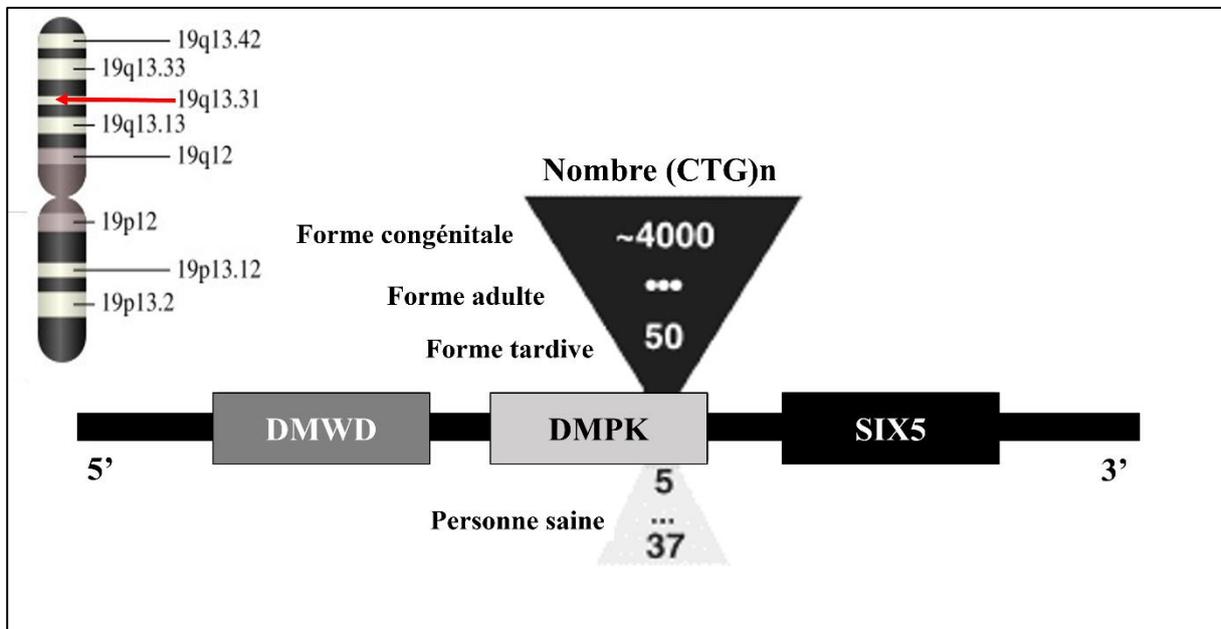
En fin, la DM1 est une maladie multi-systémique qui présente non seulement des défauts musculaires et cardiaques, mais aussi une atteinte du cerveau et du système nerveux (possible déficience mentale, somnolence diurne excessive, lésions nerveuses dans les pieds et les mains), une atteinte des muscles lisses (troubles digestifs, dysphagie, constipation), une insuffisance respiratoire (faiblesse des muscles du diaphragme), des troubles du système reproductif (ménopause précoce, faible numération de spermatozoïdes, faible niveau de testostérone), des troubles du système endocrinien (résistance à l'insuline, calvitie précoce chez l'homme, hyperparathyroïdie), des atteintes ophtalmologiques (cataracte, lésions sur la rétine) et des défauts du système immunitaire (hypogammaglobulinémie).

#### 4. Identification de la mutation responsable de la DM1

Comme décrit précédemment, la DM1 a été décrite la première fois en 1909 par le médecin Hans Steinert. Il a fallu près de 90 ans pour que la mutation à l'origine de la DM1 soit identifiée. L'anomalie génétique mise en évidence par PCR est une expansion de triple-nucléotides CTG dans la région non traduite 3' UTR de l'exon 15 du gène *Dmpk* localisé sur le chromosome 19 (locus q13.3) (Buxton et al., 1992) (Figure 6). Le nombre de ces répétitions est polymorphique. Il varie entre 5 et 37 répétitions chez les personnes saines. Cependant, les patients DM1 présentent en général plus de 50 triplets CTG (Brook et al., 1992) et cela peut aller jusqu'au 4000 (150-12.000 pb) dans les formes les plus graves (Meola and Cardani, 2015).

La *DMPK* code pour la myotonine, une Sérine/Thréonine kinase possédant des homologies avec les kinases MRCK et ROCK/rho-kinases. La DMPK est impliquée dans divers processus biologiques comme : (1) le maintien de l'intégrité de l'enveloppe nucléaire en interagissant avec la lamin-A/C au niveau de la membrane nucléaire (Harmon et al., 2011). (2) la régulation de l'épissage en modulant la localisation nucléaire des protéines de liaison aux répétitions CUG (CUG-BP) par leur phosphorylation (Roberts et al., 1997). (3) la modulation des courants Cl<sup>-</sup> par la phosphorylation du phospholemman dans le cœur et les muscles squelettiques (Mounsey et al., 2000). (4) la régulation de l'homéostasie intracellulaire du Ca<sup>2+</sup> dans le muscle squelettique (Benders et al., 1997) et aussi dans les cardiomyocytes murins en phosphorylant l'inhibiteur de SERCA2a appelé « Phospholamban » (Kaliman et al., 2005). (5) le réarrangement cytosquelettique et le contrôle de la qualité des protéines du cytosquelette en phosphorylant la myosine-phosphatase induisant l'inhibition de son activité phosphatase et

l'augmentation de la phosphorylation de la chaîne légère de myosine (Murányi et al., 2005). (6) la protection des cellules du stress oxydatif et de la mort cellulaire par la formation d'un complexe multimérique avec hexokinase II (HK II) et la tyrosine kinase Src sur la membrane mitochondriale externe pour maintenir des niveaux faibles de ROS mitochondriaux (Pantic et al., 2013). (7) la différenciation des myocytes et la formation de myotube chez l'embryon de souris et de poulet (Harmon et al., 2008).



**Figure 6 : Mutation en cause dans la Dystrophie myotonique de type 1 (DM1).** Le gène *Dmpk* porteur de la mutation responsable de la DM1 se situe au niveau du locus 19q13.3. Il est localisé entre le gène *DMWD* (en amont) et *SIX5* (en aval). Chez les personnes saines, le nombre de répétitions CTG dans la partie 3'UTR du gène *DMPK* est inférieur à 37 alors que les patients DM1 peuvent posséder de 50 jusqu'à 4000 répétitions CTG. Les expansions entre 50 et 100 répétitions entraînent une forme légère et tardive de DM1; les expansions entre 100 et 500 répétitions conduisent à la forme adulte multisystémique de DM1; et les expansions entre 500 et 4000 répétitions entraînent souvent la DM1 congénitale (Gomes-Pereira et al., 2011).

Chez l'Homme, Le gène codant la protéine DMPK possède 15 exons donnant naissance, après épissage alternatif à 7 isoformes possédants une variabilité au niveau de la taille, le niveau d'expression, les tissus d'expression et la fonction. Certaines études ont décrit que la DMPK est exprimée d'une manière ubiquitaire (Brook et al., 1992; Buxton et al., 1992), et d'autres ont observé une tissu spécificité pour certaines isoformes. En fait, une analyse portée sur différents tissus humains a montré que le cœur exprime deux isoformes longues 80 kDa et 71 kDa et aucune isoforme courte n'a été détectée dans le tissu cardiaque (Lam et al., 2000; Maeda et al., 1995; Whiting et al., 1995). Dans une autre étude, les chercheurs ont pu déterminer avec précision la localisation d'expression de DMPK dans le cœur et ils ont constaté que l'expression de DMPK est limitée aux cardiomyocytes du ventricule et de l'oreillette, et elle n'est pas exprimée ni dans l'épicarde ni dans l'endocarde (Kaliman et al., 2005). Concernant les muscles squelettiques l'isoforme la plus abondante de DMPK est l'isoforme de 80 kDa cependant l'isoforme de 71 kDa est très faiblement exprimée (Lam et al., 2000; Maeda et al., 1995; Whiting et al., 1995). Chez les embryons de souris, la DMPK a été également exprimée dans les poumons et l'intestin (Kaliman et al., 2005).

### A. Mécanisme d'instabilité des répétitions CTG

Chez un individu sain, la région 3' non codante de *DMPK* contient entre 5 et 37 répétitions CTG. Chez les patients DM1, la mutation entraîne une amplification anormale de ces expansions de 50 à plusieurs milliers. Cette mutation est dynamique et instable. En effet, le nombre de répétition est variable d'un patient à un autre présentant la même forme de la maladie, d'une génération à l'autre dans une même famille et aussi d'un tissu à un autre au sein de même patient tant au niveau des cellules somatiques qu'au niveau des cellules germinales (Seznec et al., 2000). Ainsi, ce nombre continue à augmenter au cours du temps chez les patients DM1 d'une manière dépendante de la taille initiale des extensions CTG (Martorell et al., 1997, 1995).

Cette instabilité des répétitions CTG commence précocement au stade embryonnaire et continue jusqu'à la naissance (Martorell et al., 1997; Temmerman et al., 2004a) et elle est à l'origine du mosaïsme. En fonction du type de cellules, le mosaïsme peut être somatique ou germinale.

Depuis des années, les répétitions CTG semblaient être une séquence pure et continue de triplets CTG. Cependant, l'analyse du gène *DMPK*, a montré l'existence des insertions de

motifs d'interruption « non CTG » (CCG ou GGC le plus souvent), chez certains patients de manière tissu spécifique impliquant le cortex cérébral et les muscles squelettiques (Axford et al., 2011).

Des études génétiques récentes menées sur 250 patients DM1 a montré que 8.4% des malades présentaient des insertions de motifs d'interruption « non CTG » et que ces variations auraient tendance à stabiliser la taille des expansions CTG au cours du temps au niveau des cellules somatiques (Pešović et al., 2018). En plus, les patients qui présentent des interruptions de répétitions CTG par ces motifs développent la maladie plus tardivement avec des symptômes moins sévères , en particulier au niveau cardiaque, respiratoire et de mobilité (Wenninger et al., 2021).

#### a) Mosaïsme somatique

L'instabilité somatique de répétitions CTG au gène *DMPK* chez les patients DM1 a été documentée depuis plusieurs années dans plusieurs études. D'abord, les analyses génomiques menée sur 258 patients DM1 a permis d'observer des fragments d'allèle du gène *DMPK* avec des expansions CTG de longueur hétérogène (Mahadevan et al., 1992). Cette différence a été observée également chez certains jumeaux DM1 identiques (López de Munain et al., 1994) et semble commencer durant l'embryogenèse et continue à l'âge adulte. En fait, l'analyse des échantillons provenant de fœtus et de nouveau-nés DM1 a montré une instabilité des répétitions CTG observée à partir du deuxième et troisième trimestres de grossesse et qui continue à augmenter chez le nouveau-né (Martorell et al., 1997). Cette instabilité continue tout au long de la vie du patient puisque la longueur de répétition dans les cellules sanguines des patients DM1 adultes augmente au cours du temps (Martorell et al., 1995). Il a été aussi démontré que les extensions avec un nombre élevé de répétitions CTG présentent un mosaïsme somatique plus élevé (Martorell et al., 1995).

Concernant le mosaïsme inter-tissulaire, peu d'études ont analysé la taille des répétitions CTG entre les différents tissus chez le même individu malade à cause de l'inaccessibilité des tissus humains. Une ancienne étude a décrit un polymorphisme des extensions CTG dans les échantillons d'ADN provenant de divers tissus du même patient montrant une taille plus importante de ces extensions dans le muscle squelettique, le myocarde, le cerveau, les testicules et les reins et une taille plus réduite dans les lymphocytes circulants et les autres organes (Thornton et al., 1994). Des résultats similaires ont été observés chez les patients

DM1 de la forme congénitale où le nombre de répétitions CTG était très élevé dans le tissu cardiaque par rapport aux autres organes (Martorell et al., 1997). En plus du mosaïsme inter-tissulaire au sein du même individu, un mosaïsme intra-tissulaire, impliquant un polymorphisme de la taille des répétitions CTG au sein de même organe, a été également observé notamment au niveau du cerveau (Kenji et al., 2013).

En fin le mosaïsme somatique rend la corrélation génotype-phénotype difficile à établir notamment parce que dans le sang le nombre de répétitions CTG dans le gène *DMPK* est plus faible que dans les tissus affectés par la maladie. Mais le test génétique à partir des échantillons du sang reste très important pour confirmer le diagnostic. Une étude récente a mis en évidence aussi la fiabilité des tests génétiques à partir des échantillons de salive comme une bonne source d'échantillons d'ADN accessible et non invasive pour effectuer des tests génétiques dans la DM1 (Corrales et al., 2019).

#### **b) Mosaïsme gonadique**

En plus du mosaïsme somatique, les patients DM1 présentent également un polymorphisme des extensions CTG au niveau des gamètes. En fait, une analyse portée sur des ovocytes et des spermatozoïdes ainsi que sur des embryons provenant des patients DM1 a montré une augmentation significative de nombre de répétitions CTG dans les embryons provenant des patientes DM1 de sexe féminin (mère malade). Ces longues extensions ont été aussi détectées dans leurs ovocytes immatures et matures. Cependant, le nombre de répétitions CTG a été plus faible dans les embryons provenant des patients DM1 de sexe masculin (père malade) ainsi que dans leurs spermatozoïdes (Temmerman et al., 2004). Les variabilités des extensions CTG dans les spermatozoïdes et les ovocytes immatures suggèrent que l'instabilité des répétitions CTG se produit principalement lors des divisions cellulaires germinales et/ou des réparations de l'ADN (Temmerman et al., 2004).

Le nombre élevé des répétitions CTG dans les ovocytes explique pourquoi la forme congénitale est presque exclusivement à transmission maternelle. En fait, la dynamique de l'instabilité intergénérationnelle dépend du sexe et de la taille des répétitions CTG chez le parent transmetteur : les courtes expansions CTG sont transmises par le père, tandis que les longues expansions responsables de la forme congénitale DM1 sont préférentiellement transmises par la mère c'est pourquoi les enfants nés de mères affectées sont plus gravement touchés que ceux nés d'un père atteint (Harper and Dyken, 1972; Harper, 1975).

L'absence de grandes tailles de répétitions CTG dans le spermatozoïde peut être expliquée par l'existence d'une sélection naturelle contre les spermatozoïdes avec des expansions CTG trop longues dans la DM1 (Jansen et al., 1994).

Le mosaïsme gonadique est le mécanisme responsable de l'anticipation génétique. Il s'agit de l'aggravation des symptômes et de la forme de la DM1 au sein d'une même famille à travers les générations, donc la gravité de la maladie augmente et l'âge d'apparition des symptômes diminue d'une génération à une autre au sein de la même famille (Morales et al., 2012).

Cependant, ces expansions peuvent aussi se contracter et entraîner une forme moins sévère dans la descendance. Une large analyse généalogique a estimé que le phénomène de contraction est généralement observé dans 6 à 7% des transmissions mais plus fréquemment lorsque la transmission se fait par le père atteint de la maladie (10% des transmissions) que par la mère (3% des transmissions) (Ashizawa et al., 1994). Dans une étude plus récente portée sur des échantillons de patients DM1, le taux de contraction le plus élevé était observé dans les spermatozoïdes, avec une fréquence de 14.3 % mais dans cette étude ce phénomène n'a pas été détecté dans les ovocytes (Temmerman et al., 2004).

Ce chapitre a permis de décrire la complexité de la DM1 à l'échelle clinique et moléculaire. Cette maladie est caractérisée par des atteintes musculaires et cardiaques importantes. Les défauts cardiaques représentent la deuxième cause de mortalité chez les patients DM1 et incluent les défauts de la conduction cardiaque, les arythmies, les cardiomyopathies et d'autres dysfonctionnements qui peuvent donner la mort subite chez les patients DM1.

## **II. Pathogenèse de la DM1 : Conséquences de la mutation**

Une fois la mutation en cause de la DM1 fut identifiée, la question sous-jacente qui restait c'est : Comment une mutation localisée dans une région non traduite du gène donnera autant de phénotypes ?

Le caractère multi-systémique de la DM1 rend complexe le dépistage des mécanismes expliquant les effets de la mutation mise en cause. En générale, trois mécanismes principaux ont été envisagés pour expliquer l'étiologie multi-systémique de la DM1 : **1)** Une diminution de la quantité de protéine DMPK causée par l'expansion CUG ce qui peut conduire à une

haploinsuffisance (Fu et al., 1993). **2)** Une désorganisation de la structure chromatinienne du locus *Dmpk* entraînant une répression de la transcription des gènes voisins (Klesert et al., 1997). **3)** Un mécanisme de gain de fonction toxique de l'ARN *Dmpk* muté (Mankodi et al., 2000).

## 1. EFFETS EN CIS DU GENE MUTE DE LA DMPK

### A. Haplo-insuffisance de la protéine DMPK

Dans la DM1, la quantité de la protéine DMPK est significativement diminuée dans les muscles squelettiques et cardiaque provenant des patients DM1 (Maeda et al., 1995; Salvatori et al., 2005). Deux hypothèses ont été suggérées pour expliquer cette diminution. Un premier mécanisme impliquant la rétention du transcrit *DMPK* dans le noyau empêchant son transport vers le cytoplasme pour être traduit. En fait, lors de la transcription du gène *DMPK*, l'ARNm muté avec un nombre anormal de répétitions CUG forme une structure secondaire de type épingle à cheveux due aux interactions GC/CG (Michalowski et al., 1999). Ensuite, différentes protéines (CUG-BP) vont se fixer à ces ARN doubles brins dans le noyau sous forme d'agrégats appelées « foci nucléaires » (Michalowski et al., 1999). Ces foci ont été observés dans les cellules en cultures (Davis et al., 1997) et aussi dans les cellules de biopsies musculaires des patients DM1 (Taneja et al., 1995). La séquestration des ARN *DMPK* mutés dans les foci nucléaires empêche leur transport vers le cytoplasme pour être traduit entraînant un appauvrissement protéique de la DMPK à la moitié. Ce mécanisme s'appelle « haplo-insuffisance ». En fait, seuls les transcrits provenant de l'allèle normal hérité d'un parent sain peuvent être exportés et traduits en protéines fonctionnelles.

Le deuxième mécanisme implique une altération de la transcription du gène *DMPK*. Cette hypothèse a été aussi retenue pour expliquer le niveau faible de la protéine DMPK chez les patients DM1 dans certaines études par le fait que le niveau des transcrits *DMPK* a été également diminué dans les tissus affectés chez les patients DM1 adultes en concordance avec une diminution de la quantité de la protéine et cela d'une manière corrélée inversement à la longueur de répétitions CTG (Fu et al., 1993). Cette hypothèse a été rejetée dans d'autres études qui observaient un niveau de transcription de l'allèle muté complètement normal relativement à l'allèle sauvage (Krahe et al., 1995).

Afin de mieux comprendre l'implication du mécanisme d'haploinsuffisance dans les symptômes observés dans la DM1, des souris dont le gène *DMPK* a été invalidé ont été

généérées et analysées par plusieurs laboratoires. D'abord dans les années 1990, des chercheurs ont observé très peu de symptômes DM1 dans ces mutants impliquant une myopathie modérée associée à une faiblesse musculaire et une fibrose des fibres musculaires mais qui n'apparaissent que tardivement chez les mutants de souris adultes (Jansen et al., 1996; Reddy et al., 1996). Plusieurs années plus tard, les mêmes mutants ont été analysés et les chercheurs ont observé d'autres phénotypes importants associés à la DM1 notamment au niveau cardiaque. En fait, les souris *DMPK* *-/-* souffrent de défauts de conduction cardiaque notamment des blocs atrio-ventriculaires de premier et troisième degré similaire à ce qui a été observé chez les patients DM1 (Kaliman et al., 2005), ainsi que des défauts de capture du calcium dans le réticulum sarcoplasmique provoquant un dysfonctionnement ventriculaire (Kaliman et al., 2005). Enfin, l'inactivation du gène *DMPK* chez ces souris induit des défauts d'assimilation des sucres après un régime alimentaire riche en graisse associés à un défaut de translocation membranaire du récepteur à l'insuline dans les tissus musculaires (Llagostera et al., 2007).

Bien que ce modèle reproduit certains phénotypes qui sont observés chez les patients DM1 les symptômes typiques de la pathologie, comme la myotonie et les cataractes n'ont jamais été décrits dans ces mutants, suggérant que l'haploinsuffisance de la *DMPK* ne peut entièrement expliquer le phénotype multi-systémique de la DM1 et que d'autres mécanismes pourraient être mis en jeu.

## B. Répression des gènes adjacents à la *DMPK*

Etant donnée que l'haploinsuffisance de la *DMPK* n'était pas le mécanisme responsable des symptômes multi-systémiques de la DM1, une hypothèse impliquant l'altération des gènes voisins de la *DMPK* a été suggérée notamment puisque le locus *DMPK* est constitué de trois gènes très proches entre eux : *DMWD* (*Dystrophia Myotonica containing WD repeat motif*) en amont et *SIX5* (*Sine oculis homeobox homolog 5*) en aval. En fait, la région 3' non traduite du gène *DMWD* chevauche avec le promoteur du gène *DMPK* et les répétitions CTG situées dans la région 3' non traduite du gène *DMPK* interrompent le début du promoteur du gène *SIX5* (Kumari and Usdin, 2009).

L'altération des gènes voisins de *DMPK* aurait pu être liée au fait que les répétitions de trinuécléotides CTG au niveau du 3'UTR du gène *DMPK* forment des structures stables sous forme d'épingle à cheveux (Michalowski et al., 1999) induisant la perturbation de la structure

chromatinienne du locus *DMPK*. En fait, une analyse *in vitro* a permis de visualiser des nucléosomes qui ont tendance à se rassembler au niveau de la séquence d'ADN contenant des triplets CTG répétés d'une manière dépendante de nombre de répétitions CTG. Cet assemblage induit la condensation de la chromatine et donc une perturbation de la transcription du gène *DMPK* et des gènes adjacents *DMWD* et *SIX5* (Wang et al., 1994). Ces résultats *in vitro* ont été confirmés très peu plus tard en analysant l'expression des gènes du locus *DMPK* dans des échantillons de patients DM1. D'abord, une première étude a montré la diminution de l'expression du gène *SIX5* situé en aval de *DMPK* (Klesert et al., 1997).

*SIX5* code pour un facteur de transcription à homéodomaine et c'est l'homologue de gène *sine oculis (so)* impliqué dans le développement des yeux chez la Drosophile (Winchester et al., 1999). Chez l'Homme, *SIX5* s'exprime dans les muscles squelettiques, le cœur, le système nerveux central (Boucher et al., 1995) et les yeux (Winchester et al., 1999).

Afin de confirmer la contribution de la répression de *SIX5* à la pathogenèse de la DM1, des modèles de souris mutantes pour le gène *SIX5* ont été créés (*SIX5*<sup>-/-</sup> et *SIX5*<sup>+/-</sup>). Les souris mutantes développent une fertilité réduite chez les mâles avec une atrophie progressive de la masse testiculaire qui s'aggrave avec l'âge (Sarkar et al., 2004), des défauts de la conduction cardiaque caractérisés principalement par une élévation du complexe QRS (Wakimoto et al., 2002) et aussi des cataractes avec une sévérité inversement liée au taux de la protéine *SIX5* mais qui ne présentent pas d'opacités iridescentes ni de localisation postérieure comme décrit chez les patients DM1 (Klesert et al., 2000; Sarkar et al., 2000). Cependant ces souris ne présentent aucune altération du muscle squelettique (Klesert et al., 2000; Sarkar et al., 2000) ce qui suggère que la diminution de *SIX5* contribue à la pathogenèse de la DM1 mais elle n'explique non plus le caractère multi-systémique de la pathologie.

Dans un deuxième temps, une étude a montré la diminution des niveaux des transcrits *DMWD* de 20 à 50% dans le contexte DM1 (Alwazzan et al., 1999). Cependant, l'implication de ce gène dans la DM1 est encore inconnue. Par le fait que la *DMWD* est exprimée d'une manière ubiquitaire dans tous les tissus mais majoritairement dans les testicules et le cerveau chez l'Homme et la souris (Westerlaken et al., 2003), sa diminution en DM1 pourrait être impliquée dans l'infertilité masculine et dans l'atteinte de système nerveux chez les patients DM1 (Westerlaken et al., 2003).

**Tableau 1** : Modèles de souris transgéniques impliquant le rôle pathologique des répétitions CUG

Lignée	Promoteur	Répétitions	Tissu affecté	Symptômes	Référence
<b>HSA<sup>LR</sup></b>	HAS (human skeletal actin)	250 CTG non interrompues	Muscles squelettiques adultes	Formation de foci nucléaires, myopathie, myotonie, défauts d'épissage	(Mankodi et al., 2000)
<b>EpA960</b>	CMV-Dox	960 CTG interrompues CTCGA tous les 20 CTG	Cœur ou muscles squelettiques (expression CRE tissu spécifique)	Surexpression de CELF1, formation de foci nucléaires, cardiomyopathie, arythmies, dysfonctionnement systolique et diastolique, légère myopathie, défauts d'épissage, dystrophie musculaire	(Wang et al., 2007) (Orengo et al., 2008)
<b>DM300</b>	DMPK humain	300	-Cœur -Muscles squelettiques -Cerveau	Formation de foci nucléaires, myotonie, mosaïsme somatique, mosaïsme germinale	(Seznec et al., 2000)
<b>DM550</b>	DMPK humain	550	-Cœur -Muscles squelettiques -Cerveau	Faiblesse musculaire progressive, réduction de la masse musculaire et de la taille des fibres musculaires	(Vignaud et al., 2010)
<b>DMXL</b>	DMPK humain	>700 1000	-Cœur -Muscles squelettiques -Cerveau	Formation de foci nucléaires, défauts d'épissage, mortalité élevée, défauts musculaires, taille réduite, trouble de comportement et de mémoire	(Huguet et al., 2012) (Gomes-Pereira et al., 2007)
<b>(CTG)<sup>5</sup> DMPK 3'UTR</b>	DMPK-tet (tétracycline inducible et réversible)	5 200	-Cœur -Muscles squelettiques	Surexpression de CLEF1 uniquement dans le muscle squelettique, myotonie, défauts de conduction cardiaque, défauts d'épissage, mort 3-4 semaines après induction du transgène	(Mahadevan et al., 2006)
<b><math>\alpha</math>-MHC-LacZ-CTG)400</b>	A-MHC (alpha myosin heavy chain)	400	Cœur adulte	Formation de foci cytoplasmiques au niveau des cellules cardiaques, défauts de conduction cardiaque légers	(Dansithong et al., 2008)

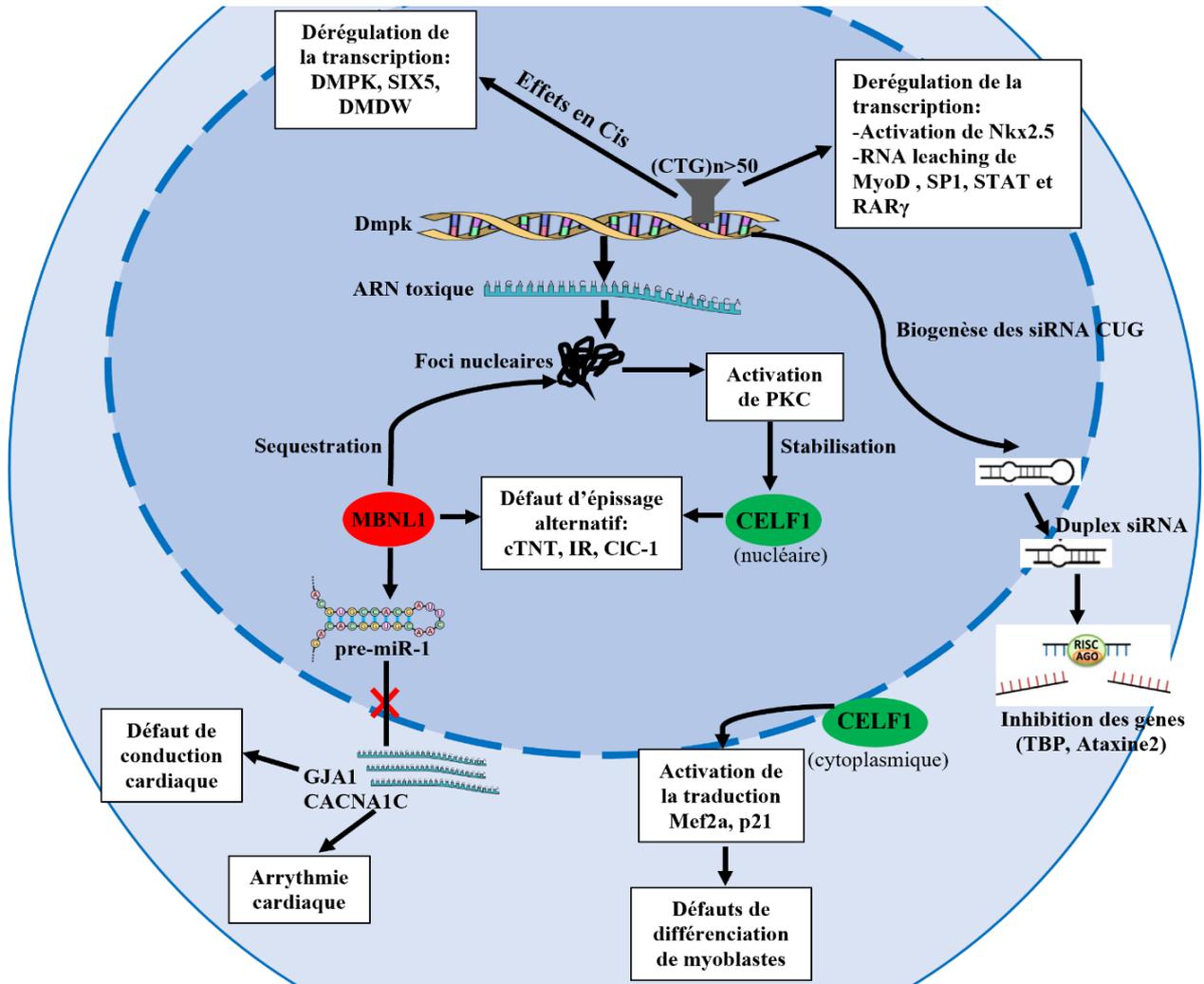
## 2. EFFETS EN TRANS DU TRANSCRIT MUTE *DMPK*

### A. Le gain de fonction toxique de l'ARN muté

Le mécanisme le plus répondu pour expliquer l'atteinte multi-systémique de la DM1 est de type gain de fonction toxique de l'ARN muté. La première étude confirmant l'implication de la toxicité de l'ARN muté dans la DM1 a été menée en culture cellulaire sur des myoblastes murins exprimant un gène rapporteur fusionné au 3'UTR du gène *DMPK* humain contenant 200 répétitions CTG. De manière intéressante, l'expression de ces transcrits mutants a inhibé la fusion des myoblastes en myotubes (Amack et al., 1999) ce qui a permis de suggérer un effet toxique des répétitions CTG.

Cette hypothèse a été ensuite confirmée par la création de plusieurs modèles de souris (Tableau 1). Un premier modèle de souris transgéniques exprimant l'alpha-actine humaine avec une partie 3'UTR contenant 250 répétitions CTG dans le muscle squelettique a permis de reproduire les mêmes symptômes musculaires observés chez les patients DM1 incluant une myotonie et une myopathie. Au niveau histologique, une centralisation des noyaux et une variabilité de la taille des fibres musculaires ont été aussi observés (Mankodi et al., 2000). Des phénotypes similaires ont été observés dans un autre modèle murin exprimant le gène *DMPK* humain avec 300 répétitions CTG. En plus du dysfonctionnement musculaire, ces mutants présentent un mosaïsme somatique et une formation de foci nucléaires (Seznec et al., 2001).

Le mécanisme de gain de fonction toxique de l'ARN muté repose sur la formation de structures secondaires en épingle à cheveux à partir des appariement CG/GC (Michalowski et al., 1999) qui seront retenus dans des foci nucléaires. Ces foci sont observés dans les cellules en culture (Davis et al., 1997) et dans les cellules de biopsies musculaires des patients DM1 (Taneja et al., 1995). Les conséquences de ces foci toxiques sont variables et incluent : (1) La séquestration de protéines de liaison aux CUG et en particulier les protéines de la famille Muscleblind-like (MBNL). (2) La stabilisation du facteur d'épissage alternatif CUGBP, Elav-Like Family (CELF1). (3) La perturbation des facteurs de transcription. (4) La dérégulation des miARN (Figure 7).



**Figure 7 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la physiopathologie de la DM1.** La DM1 est causée par des répétitions CTG dans la région 3'UTR du gène *DMPK*. Cette mutation agit en Cis en réduisant l'expression du gène *DMPK* muté conduisant à une haploinsuffisance, et en inhibant l'expression des gènes adjacents *DMDW* et *SIX5*. Les répétitions CUG induisent la dérégulation des facteurs de transcription par un phénomène d'ARN « leaching ». Les transcrits *DMPK* mutés forment des foci nucléaires qui séquestrent MBNL1 et qui active la PKC responsable de l'hyperphosphorylation de CELF1 conduisant à sa stabilisation. La séquestration de MBNL1 et la stabilisation de CELF1 conduit à des défauts d'épissage des pre-ARN (*cTNT*, *IR*, *CLC-1*). La stabilisation de CELF1 cytoplasmique induit l'activation de la traduction de Mef2a et p21 associés à des défauts de différenciations de myoblastes dans les muscles squelettiques des patients DM1. La séquestration de MBNL1 l'empêche d'assurer la maturation de *pre-miR-1* permettant la surexpression de ses gènes cibles *GJA1* et *CACNA1C* associés aux défauts de conduction et aux arythmies respectivement. Les répétitions CTG pourraient être transcrit dans les deux sens conduisant à la formation des complexes double brin CAG-CUG et à la formation de duplex siARN qui interagissent avec le complexe RISC pour inhiber l'expression des gènes contenant des répétitions CAG, telles que *ATXN2* et *TBP* (adapté de Souidi et al., 2018).

## a) Altération des protéines de liaison à l'ARN dans la DM1

### i. La famille des Muscleblind-like (MBNL)

Les protéines MBNL codent des protéines de liaisons à l'ARN à doigts de zinc, très conservées entre les espèces et impliquées dans la régulation de l'épissage alternatif des ARNm. Chez l'Homme et la souris il existe 3 protéines de la famille MBNL : MBNL1, MBNL2 et MBNL3 dont l'expression est tissu-spécifique et variable au cours du développement.

MBNL1 dont le gène est localisé sur le chromosome 3, est ubiquitaire mais plus fortement exprimée dans les muscles squelettiques, le cœur et le système nerveux. MBNL2, dont le gène est localisé sur le chromosome 13, est exprimée dans les mêmes tissus que MBNL1 et l'expression des deux protéines augmente au cours du développement (Fernandez-Costa Juan M. et al., 2011). MBNL3 dont le gène est localisé sur le chromosome X, est fortement exprimée dans le placenta et le foie et faiblement dans les muscles et le cœur et son expression diminue au cours du développement (Fardaei et al., 2001; Kanadia et al., 2003).

### ii. La perte de fonction de *MBNL1* dans la DM1

MBNL1 est un facteur d'épissage alternatif qui contrôle les transitions d'épissage alternatif des transcrits de la forme fœtale à la forme adulte au cours du développement chez les vertébrés (Kalsotra et al., 2008; Tran et al., 2011). *MBNL1* code pour une dizaine d'isoformes qui diffèrent entre eux dans l'exclusion ou l'inclusion des exons 3, 5 et 6 dont les régions codées par l'exons 5 et 6 sont toutes deux nécessaires pour la localisation nucléaire de MBNL1, et la région codée par l'exon 3 située entre les doigts de zinc Znf2 et Znf3, assure l'affinité de MBNL1 pour les pré-ARNm cibles, et l'exon 3 et 6 sont impliqués dans l'activité régulatrice de l'épissage (Tran et al., 2011).

Le gène *MBNL1* a été mis en évidence pour son homologie avec *mbf* chez la Drosophile, ce dernier est essentiel à la différenciation terminale des cellules musculaires et photoréceptrices. La perte de fonction de *mbf* est létale à l'âge embryonnaire au stade 17 ou au premier stade larvaire à cause d'une incapacité à différencier les bandes Z dans les sarcomères et la réduction de la matrice tendineuse extracellulaire au niveau des sites d'attache de muscle à l'épiderme ce qui provoque une paralysé partielle chez la larve (Artero et al., 1998; Begemann et al., 1997).

L'implication de MBNL1 dans la DM1 a été suggérée dans un premier temps par un criblage qui visait à identifier les protéines de liaisons à des ARNs contenant de longues répétitions CUG, où ils ont observé que MBNL1 se lie spécifiquement aux ARNs contenant de longues répétitions CUG (Miller et al., 2000). Cette fixation est assurée par quatre domaines à doigt de zinc très conservés contenant 3 cystéines et 1 histidine (CCCH), localisés dans la partie N-terminale de la protéine (Miller et al., 2000). Chacune de ces doigts de zinc reconnaît un motif de type UGC et par conséquent une protéine de MBNL1 peut reconnaître quatre répétitions UGC dans la région 3'UTR du transcrit *DMPK*. Enfin, la séquestration de MBNL1 dans les répétitions CUG dans le contexte de la DM1 a été confirmée par des expériences d'ARN-FISH couplées à une immunofluorescence au niveau des cellules des patients DM1 qui a permis de visualiser des foyers de l'ensemble des isoformes de MBNL1 qui co-localisent avec de longues répétitions CUG du transcrit *DMPK* muté en formant des foci nucléaires (Mankodi et al., 2001; Miller et al., 2000; Tran et al., 2011).

Afin de confirmer l'implication de la perte de fonction de *MBNL1* dans les phénotypes observés dans la DM1, des modèles de souris mutantes pour ce gène ont été générés par plusieurs laboratoires. Les souris *MBNL1*<sup>-/-</sup> présentent une myotonie et des défauts du tissu musculaire caractérisés par la centralisation des noyaux et une division des fibres (splitting). Ces souris présentent également des cataractes et des altérations d'épissage des transcrits musculaires (Kanadia et al., 2003) qui ont été restaurés par l'administration de la protéine recombinante MBNL1 (Kanadia et al., 2006). Récemment, des dysfonctionnements cardiaques ont été décrits chez un modèle de souris similaire âgé de 2 à 4 mois. Au début, les chercheurs ont révélé des défauts de la conduction cardiaque caractérisés principalement par une élongation du complexe QRS et de l'intervalle QT. Ces défauts cardiaques s'aggravent avec l'âge. Vers les 6 mois les souris mutantes développent encore d'autres phénotypes cardiaques comme une diminution des amplitudes des ondes R, un dysfonctionnement du nœud sinusal, une hypertrophie cardiaque et une fibrose interstitielle. La mort subite était très fréquente chez ces souris mutantes avec une prévalence de 67 % et 86 % chez les mâles et les femelles respectivement. Les souris mutantes présentent aussi des défauts d'épissage alternatif des gènes déjà connus comme mal épissés dans la DM1, caractérisés principalement par une persistance de transcrits fœtaux chez les souris adultes (Dixon et al., 2015). Ainsi, la surexpression de l'isoforme de *mbl* améliore partiellement l'atrophie musculaire dans un modèle de *Drosophile* DM1 (Bargiela et al., 2015).

La présence de ces phénotypes en invalidant *MBNL1* chez la souris suggère son implication dans une partie de défauts cardiaques et musculaires observés chez les patients DM1. Cependant l'absence de l'hypotonie et de la faiblesse musculaire chez les souris *MBNL1*<sup>-/-</sup> (Kanadia et al., 2003) avec une augmentation des niveaux de *MBNL2* dans le muscle squelettique de ces mutants (Lee et al., 2013) a permis de supposer que *MBNL2* pourrait compenser la perte de fonction de *MBNL1* chez ces mutants (*MBNL*<sup>-/-</sup>) c'est pourquoi des souris doubles mutantes pour *MBNL1* et *MBNL2* ont été générées. Comme chez la mouche, les souris *MBNL1*<sup>-/-</sup>; *MBNL2*<sup>-/-</sup> sont létales à l'âge embryonnaire. Cependant, les souris *MBNL1*<sup>-/-</sup>; *MBNL2*<sup>+/-</sup> sont viables mais développent des symptômes plus graves que les simples mutants *MBNL1*<sup>-/-</sup>, notamment une durée de vie réduite limitée à 23 semaines, des défauts de conduction cardiaque caractérisés par une élongation de l'intervalle PR et du complexe QRS et de l'intervalle QT, une dilatation auriculaire, une hypertrophie ventriculaire gauche, une myotonie sévère, des fibres atrophiés, une faiblesse progressive des muscles squelettiques et des problèmes de mobilité. Aussi il a été démontré que *MBNL2* peut assurer l'épissage des gènes cibles régulés par *MBNL1*. Ces observations renforcent l'hypothèse de compensation entre *MBNL1* et *MBNL2* (Lee et al., 2013). En revanche, cette compensation ne peut pas se reproduire chez les patients DM1, puisqu'il a été observé que les paralogues de *MBNL1* « *MBNL 2* et *3* » sont également séquestrés par les longues répétitions CUG au niveau des foci nucléaires (Mankodi et al., 2000; Miller et al., 2000).

### iii. La famille des CUGBP, Elav-Like Family (CELF)

Les protéines CELF, homologues de la protéine Bruno chez la Drosophile, sont capables de se lier aux ARNs grâce à leur domaine de liaison à l'ARN RRM « RNA Recognition Motifs ». Chaque protéine CELF contient trois domaines de liaison à l'ARN : deux à l'extrémité N-terminale et un à l'extrémité C-terminale (Good et al., 2000). Elles sont présentes à la fois dans le cytoplasme et le noyau (Dasgupta and Ladd, 2012) et participent à la régulation post-transcriptionnelle des ARNs à plusieurs niveaux : la deadénylation et dégradation des ARNs, la stabilité de l'ARN, la traduction, ainsi que l'épissage alternatif (Dasgupta and Ladd, 2012; Paillard et al., 2003; Timchenko et al., 2004; Vlasova et al., 2008). Elles jouent un rôle important dans le développement embryonnaire précoce, la fonction cardiaque et les fonctions de muscle squelettique ainsi que la transmission nerveuse (Dasgupta and Ladd, 2012; Timchenko et al., 1996).

Chez l'Homme et la souris nous distinguons six membres de la famille CELF présentant de fortes homologies de séquence mais une expression très variable selon le tissu et le stade de développement. Les CELF peuvent être divisés en deux sous-familles : CELF1-2 et CELF3-6. Les protéines du sous-groupe CELF1-2 sont fortement exprimées dans le cœur, les muscles squelettiques et le cerveau et faiblement exprimées dans les autres tissus au stades précoces de développement embryonnaire (Ladd et al., 2005).

Les protéines du sous-groupe CELF3-6 présentent une expression plus restreinte que CELF1-2 (Dasgupta and Ladd, 2012) dont CELF3 et CELF5 sont détectées principalement dans le système nerveux, alors que CELF6 est retrouvée dans le système nerveux, les reins et les testicules (Dasgupta and Ladd, 2012; Good et al., 2000; Ladd et al., 2004; Loria et al., 2003). Concernant CELF4, il existe plusieurs observations contradictoires par rapport à son tissu d'expression. Dans une étude menée par Ladd, les transcrits de *CELF4* ont été détectés dans la plupart des tissus humains et donc son expression est considérée comme ubiquitaire (Ladd et al., 2004), mais dans deux autres études, les transcrits de *CELF4* ont été détectés uniquement dans le système nerveux (Loria et al., 2003; Yang et al., 2007).

#### iv. Gain de fonction de CELF1 dans la DM1

CELF1 intervient dans le maintien du profil d'épissage foetal de plusieurs gènes impliqués dans le développement musculaire et cardiaque et son activité diminue à la naissance (Kalsotra et al., 2008). CELF1 est capable de se lier aux séquences CUG répétées de petite taille sous forme de structure simple brin *in vitro* (Michalowski et al., 1999; Timchenko et al., 1996) mais aucune interaction avec l'ARN CUG sous forme double-brin n'a été décrite (Michalowski et al., 1999; Timchenko et al., 1996). CELF1 possède plusieurs sites de phosphorylation suggérant que la régulation de son expression pourrait être dépendante de sa phosphorylation (Timchenko et al., 1996).

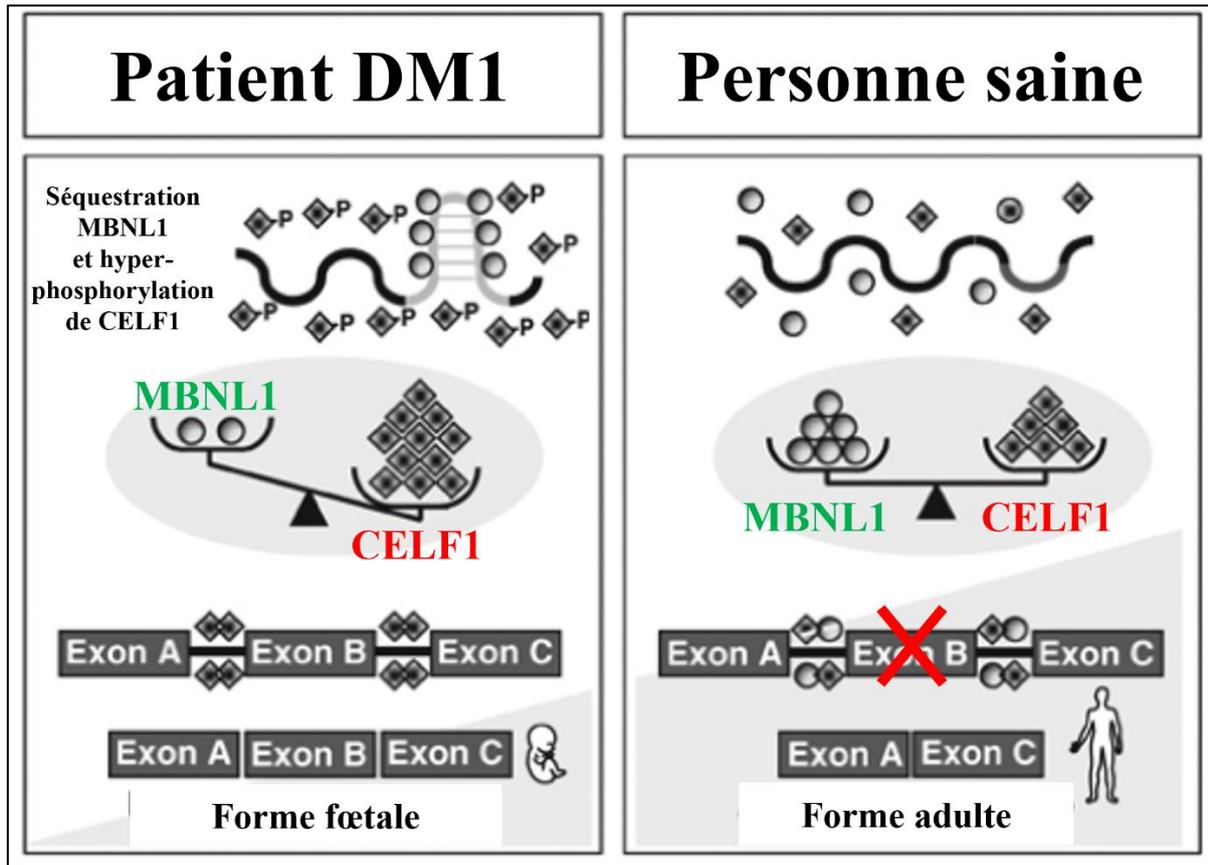
Dans le contexte de la DM1, le niveau de la protéine CELF1 est fortement augmenté dans les muscles squelettiques et le cœur (Timchenko et al., 2004) d'une manière corrélée positivement au nombre de répétitions CUG (Kim et al., 2014). Cette augmentation est expliquée par la stabilisation de la protéine assurée par sa phosphorylation. La protéine CELF1 est hyper-phosphorylée dans les échantillons cardiaques et musculaires provenant des patients DM1 et aussi dans le modèle de souris exprimant le gène *DMPK* avec de longues répétitions CUG (960 CUG). En fait, selon un mécanisme encore mal connu, les répétitions

CUG activent la protéine kinase C (PKC) qui phosphoryle la protéine CELF1 nucléaire conduisant à sa stabilisation, permettant ainsi l'augmentation de sa demi-vie nucléaire (Kuyumcu-Martinez et al., 2007).

Mais contrairement à MBNL1, CELF1 n'est pas séquestrée par les répétitions CUG dans les foci nucléaires (Michalowski et al., 1999; Timchenko et al., 1996). Par ce fait, l'hypothèse selon laquelle CELF1 serait séquestrée par les répétitions CUG a été rejetée et une nouvelle hypothèse impliquant une altération des cibles de CELF1 à la suite de son gain de fonction a été testée.

Afin de tester l'implication de gain de fonction de CELF1 dans les phénotypes musculaires observés dans la DM1, un premier modèle de souris surexprimant CELF1 spécifiquement dans les muscles squelettiques a été généré. Ces souris mutantes présentent un retard de développement dû à l'immaturation des fibres musculaires, une augmentation des fibres musculaires de type rapides et une diminution de fibres musculaires de type lentes et une dystrophie musculaire. De manière intéressante la sévérité de ces défauts musculaires a été corrélée positivement avec le niveau d'expression de la protéine CELF1 (Timchenko et al., 2004). Les souris mutantes avec un niveau très élevé de CELF1 (8 à 10 fois ) présentent une létalité prématurée et reproduisent les mêmes défauts musculaires observés dans la forme congénitale de la DM1 (Timchenko et al., 2004). Des défauts similaires ont été observés dans un modèle de souris exprimant CELF1 humaine dans les muscles squelettiques et cardiaque (Ho et al., 2005).

L'implication de CELF1 dans les défauts cardiaques a été ensuite analysée par l'équipe de Thomas Cooper en utilisant des souris surexprimant la protéine CELF1 humaine spécifiquement dans le cœur. Ces souris développent une cardiomyopathie dilatée, des défauts de conduction cardiaque caractérisés par une élongation du complexe QRS et de l'intervalle PR (Koshelev et al., 2010) et présentent une létalité élevée à partir de deux semaines d'induction de la surexpression de CELF1 (Koshelev et al., 2010). Les souris exprimant CELF1 dans les muscles squelettiques et dans le cœur présentent également des dérégulations d'épissage alternatif des transcrits similaires aux dérégulations observées chez les patients DM1. Cela inclue la *troponine T cardiaque (Tnnt2)*, le gène *1 lié à la myotubularine (Mtmr1)* et le *canal chlorure spécifique au muscle (Clcn1)* (Ho et al., 2005; Kalsotra et al., 2008; Ward et al., 2010).



**Figure 8 : Perturbation de l'équilibre de la balance MBNL1/CELF1 dans la DM1.** Dans le cas physiologique, la balance entre les deux facteurs d'épissage antagonistes : MBNL1 et CELF1 est équilibrée permettant un épissage alternatif des isoformes de la forme adulte. Dans le contexte DM1, les répétitions CUG forment une structure double brin induisant la séquestration de MBNL1 et l'hyperphosphorylation et la stabilisation de CELF1. Par conséquent, l'équilibre fonctionnel entre ces deux régulateurs d'épissage est perturbé favorisant un épissage alternatif des isoformes de la forme fœtale. L'expression anormale des isoformes fœtales dans les muscles squelettiques et le cœur de l'adulte contribue à l'apparition des symptômes de la DM1 (adapté de Gomes-Pereira et al., 2011).

En résumé, les travaux de l'équipe de Thomas Cooper ont permis de valider le gain de fonction de CELF1 comme facteur clé impliqué dans la pathogénicité de la DM1, c'est pourquoi un troisième modèle de souris double transgéniques exprimant l'ARN toxique et invalidé pour le gène *CELF1* a été généré afin de tester si la réduction de CELF1 dans un modèle de souris DM1 peut avoir des effets bénéfiques (Kim et al., 2014). De manière intéressante, lorsque CELF1 est diminuée chez les souris DM1, une amélioration des phénotypes musculaires est observée mais sans aucun effet bénéfique sur les défauts d'épissage (Kim et al., 2014). En fin, une expérience menée par l'équipe de Tomas Cooper a montré aussi que l'inhibition de la PKC est une cible clé pour améliorer les défauts cardiaques, les défauts d'épissage et l'espérance de vie chez les souris DM1 par le fait que CELF1 sera moins phosphorylée et donc moins stable que dans la DM1 (Wang et al., 2009).

### **b) Effets de dérégulation de la balance MBNL1/CELF1 sur l'épissage alternatif**

MBNL1 et CELF1 régulent l'épissage alternatif de transcrits soit indépendamment l'un de l'autre, ou de manière antagonistique au cours du développement en assurant la transition de différents transcrits de leur forme fœtale à la forme adulte (Figure 8). Au cours du développement, la protéine CELF1 permet l'inclusion d'exons fœtaux spécifiques dans les tissus embryonnaires et néonataux alors que l'expression de MBNL1 assure le saut d'exons fœtaux permettant l'expression d'isoformes de protéines adultes (Kino et al., 2009; Lee and Cooper, 2009). Pour assurer ces fonctions au cours du développement embryonnaire, l'expression de la protéine CELF1 est très élevée contrairement à celle de la protéine MBNL1 qui est réduite. Cette balance MBNL1/CELF1 change à la naissance induisant une reprogrammation de l'épissage alternatif régulé par ces deux facteurs (Kalsotra et al., 2008).

Pour la suite de ce chapitre, j'ai choisi de présenter quelques exemples des défauts d'épissage alternatif régulés par CELF1 et/ou MBNL1 et connus par leur implication dans les symptômes observés dans la DM1.

Le premier exemple c'est celui du transcrit de la *Troponine T cardiaque* (*cTNT* ou *TNNT2*) qui présente un défaut de l'épissage de l'exon 5 chez les patients DM1 et aussi dans le modèle de souris transgéniques surexprimant *CELF1* dans le muscle squelettique et cardiaque (Ho et al., 2005). Dans le tissu cardiaque des patients DM1, CELF1 se lie aux séquences CUG situées en aval de l'exon 5 de *cTNT* et augmente l'inclusion de cet exon fœtal induisant la

persistance de la forme fœtale de la protéine TNT cardiaque dans le cœur adulte qui contribue éventuellement aux défauts de la conduction cardiaque. Dans le contexte physiologique, l'exon 5 est présent dans le cœur fœtal et régule la sensibilité de la troponine T au calcium, mais il est exclu dans le cœur adulte (Philips et al., 1998).

La protéine MBNL1 semble aussi impliquée dans la régulation de l'épissage de *cTNT*. En fait il a été démontré que MBNL1 contrôle l'épissage de l'exon 5 dans le pré-ARNm de la *cTNT* en se fixant en amont de l'exon 5 ce qui empêche la fixation de facteur d'épissage U2AF65 à cette région. Lorsque la fixation de U2AF65 est inhibée, le snRNP U2 ne peut plus être recruté et l'exon 5 est alors exclue (Warf et al., 2009). Dans le contexte de la DM1, cette régulation est donc altérée, étant donné que MBNL1 est séquestrée dans les foci nucléaires riches en répétitions CUG. Par conséquent l'exon 5 fœtal est inclus dans l'ARNm, ce qui pourrait expliquer pourquoi dans un modèle de souris invalidée pour *MBNL1*, l'isoforme fœtale de *cTNT* est augmentée (Kanadia et al., 2003).

Le deuxième exemple c'est celui du récepteur de l'insuline *IR*. D'abord, la surexpression de CELF1 dans des myoblastes normales provoque une altération de l'épissage alternatif de *IR* (Dansithong et al., 2005). Deux études ont montré que CELF1 favorise l'épissage de l'isoforme embryonnaire de *IR* (Savkur et al., 2001; Sen et al., 2009). Dans les muscles squelettiques des patients DM1, l'épissage alternatif du pré-ARNm de *IR* est altéré avec une expression prédominante de l'isoforme non musculaire *IR-A* caractérisée par une faible réponse à l'insuline et donc un niveau de signalisation plus faible en comparaison à l'isoforme *IR-B*, qui est normalement prédominante à l'âge adulte. La surexpression de CELF1 induit le saut de l'exon 11 du *IR* en se liant à la fois à un activateur d'épissage exonique sur l'exon 11 et à un autre activateur d'épissage intronique sur l'intron en amont, conduisant à une diminution de l'inclusion de l'exon 11 et cela est suffisant pour induire la résistance à l'insuline observée chez les patients DM1 (Savkur et al., 2001; Sen et al., 2009).

Une expérience menée par Dansithong et ses collaborateurs a montré que l'inhibition de *MBNL1* dans des cellules de myoblastes saines induit une altération de l'épissage de *IR*. Les auteurs de cette étude ont mis en évidence la perte de fonction de MBNL1 comme facteur principale de l'épissage aberrant de *IR* et la surexpression de CELF1 comme un élément secondaire dans cette dérégulation (Dansithong et al., 2005). En fait, il a été démontré que dans le contexte physiologique, MBNL1 est capable de se fixer directement à l'ARN humain de *IR* et réguler l'inclusion de l'exon 11 et que l'expression de MBNL1 et MBNL2 corrige

l'épissage aberrant de *IR* dans les myoblastes des patients DM1 (Dansithong et al., 2005; Paul et al., 2006).

Le dernier exemple c'est celui d'un transporteur du chlore. Plusieurs études ont décrit l'altération de l'épissage du transcrite de transporteur du chlore le canal chlore muscle-spécifique *CLC-1* dans la DM1. En fait dans le contexte de la maladie, CELF1 favorise l'épissage de l'isoforme embryonnaire de *CLC-1* en augmentant l'inclusion l'exon 7A contenant des codons stop prématurés, ce qui entraîne la dégradation de l'ARN par le mécanisme de surveillance des ARNm « Nonsense Mediated Decay » et une absence de la protéine. L'absence de *CLC-1* induit une hypersensibilisation de la membrane musculaire aux potentiels d'action responsable de la myotonie dans la DM1 (Charlet-B. et al., 2002). Dans le cas physiologique, cet exon est normalement exclu par le facteur MBNL1 (Kino et al., 2009). Il est intéressant de noter que le défaut d'épissage du *CLC-1* ainsi que la myotonie associée ont été restaurés par la délivrance de MBNL1 à un modèle de souris DM1 (Kanadia et al., 2006).

Il existe plusieurs autres transcrits mal épissés dans la DM1 certains sont régulés par MBNL1 et sont impliqués dans différents processus biologiques : la régulation de courant de sodium et de calcium (*Scn5a, Junctin, Asph, Junctate, Atp2a1, Atp11a, Cacna1s, Ryr2*), le transport intra et intercellulaire (*Clta, Stx2, Tjp1*), la survie cellulaire (*Capn3, Sirt2, CsdA*), l'organisation et la fonction du sarcomère et du cytosquelette (*Trim55, Mapt, Pdlim3, Pdlim5, Sorbs1, Sorbs2, Fhod1, Spag9*); les composants structurels du sarcomère (*Tnnt2, Ldb3*) (Dixon et al., 2015; Lee et al., 2013). Et d'autres régulés par CELF1 : *c10orf97* qui est un gène suppresseur de tumeur, *Mfn2* qui code la mitofusine II qui est une protéine membranaire mitochondriale, *Capzb* impliqué dans la stabilisation de filaments d'actine et *Ppfibp1* qui code la liprine (Kalsotra et al., 2008; Ward et al., 2010). Le tableau 2 regroupe la liste des pre-ARN mal épissés chez les patients DM1.

**Tableau 2 :** Liste des principaux pre-ARNs dérégulés dans la DM1

Pre-ARN	Dérégulation	Référence
<b>IR</b>	Exclusion exon 11	(Savkur et al., 2001)
<b>CLCN1</b>	Inclusion intron 2 et 7	(Charlet-B. et al., 2002; Mankodi et al., 2002)
<b>TNNT3</b>	Inclusion exon fœtal	(Kanadia et al., 2003)
<b>TNNT2/cTNT</b>	Inclusion exon 5	(Ho et al., 2005).
<b>RyR</b>	Exclusion exon 70	(Kimura et al., 2005)
<b>SERCA1</b>	Exclusion exon 22	
<b>SERCA2</b>	Inclusion intron 19	
<b>LDB3/ZASP/Cypher</b>	Inclusion exon 11	(Lin et al., 2006)
<b>TTN</b>	Inclusion Zr4 et Zr5	
<b>NRAP</b>	Inclusion exon 12	
<b>CAPN3</b>	Exclusion exon 16	
<b>ATRNL1, ALP</b>	Inclusion exon 5a et 5b	
<b>FHOD1</b>	Exclusion exon 11a	
<b>GFPT1</b>	Exclusion exon 10	
<b>MBNL1</b>	Inclusion exon 7, 6 et 8	(Dhaenens et al., 2008)
<b>MBNL2</b>	Inclusion exon 7 et 8	(Nakamori et al., 2013; Yamashita et al., 2012)
<b>DMD</b>	Exclusion exon 71 ou 78	(Nakamori et al., 2013)
<b>SMYD1</b>	Inclusion exon 39	(Du et al., 2010)
<b>MTMR1</b>	Exclusion exon 2.1	(Ho et al., 2005)
<b>DTNA</b>	Inclusion exon 11a et 12	(Nakamori et al., 2008)
<b>CACNA1S/ DHPR<math>\alpha</math>S1</b>	Exclusion exon 29	(Tang et al., 2012)
<b>SCN5A</b>	Inclusion exon 6a et exclusion exon 6b	(Wahbi et al., 2013)
<b>MYH14</b>	Exclusion exon 6	(Rinaldi et al., 2012)
<b>MAPT</b>	Exclusion exon 2 et 3 et 10	(Sergeant et al., 2001)
<b>NMDAR1</b>	Inclusion exon 5	(Jiang et al., 2004)
<b>APP</b>	Exclusion exon 7	
<b>ATP5MC2</b>	Inclusion exon 1	(Yamashita et al., 2012)
<b>MEF2C</b>	Exclusion exon 4 et 5	(Vihola et al., 2010)
<b>BIN1</b>	Exclusion exon 11	(Fugier et al., 2011)
<b>TANC2</b>	Inclusion exon 22a	(Charizanis et al., 2012)
<b>CACNA1D</b>	Exclusion exon 12	
<b>CSNK1D</b>	Exclusion exon 9	
<b>KCNMA1</b>	Exclusion exon 25a	
<b>CLASP2</b>	Inclusion exons 23a 23b	
<b>RYR2</b>	Exclusion exons 4; 5	
<b>ADD1</b>	Inclusion exon 15	
<b>PPP1R12A</b>	Inclusion exon 16	
<b>ST3GAL3</b>	Inclusion exon 3	
<b>LIMCH1e</b>	Exclusion exon 10	
<b>ALPK3</b>	Inclusion exon 2	(Nakamori et al., 2013)
<b>ATP2A1</b>	Exclusion exon 22	(Kimura et al., 2005)

### c) La dérégulation traductionnelle dans la DM1

Concernant CELF1, en plus de son implication dans l'altération de l'épissage alternatif dans la DM1, le modèle de souris surexprimant CELF1 dans les muscles squelettiques développé par l'équipe de Timchenko a permis de mettre en évidence l'implication de CELF1 dans la régulation positive de la traduction d'ARNm de *Mef2a* (*Myocyte enhancer factor 2A*) et de *p21* (*Protein 21*), deux facteurs importants pour la régulation du cycle cellulaire et de la myogenèse, impliqués dans les défauts de différenciation des cellules musculaires (Timchenko et al., 2004). Cela pourrait expliquer la difficulté des myoblastes à se différencier chez les patients DM1 car ces deux protéines sont retrouvées surexprimées dans les muscles squelettiques des patients (Timchenko et al., 2004).

### d) La dérégulation des facteurs de transcription dans la DM1

Dans la DM1, certains facteurs de transcription tels que SP1 (Specificity Protein 1), STAT1 et STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription) et RAR $\gamma$  (Retinoic Acid Receptor) sont captés par le compartiment ribonucleoprotéique des foci nucléaires par un phénomène appelé « leaching », bloquant ainsi l'activation de la transcription de leur cibles notamment celle du gène *CLC-1* qui est retrouvé diminué en contexte DM1 (Ebraldize et al., 2004). Cependant, des résultats contradictoires ont été publiés par l'équipe de Charles Thornton qui n'a observé aucune colocalisation de ces facteurs de transcription dans le compartiment ribonucleoprotéique des foci nucléaires dans les neurones corticaux des patients DM1 (Jiang et al., 2004).

Une étude réalisée sur des myoblastes exprimant 3'UTR du gène *DMPK* avec 200 répétitions CUG suggère que MyoD, facteur nécessaire à la différenciation musculaire, interagit avec les longues répétitions CUG induisant sa séquestration. En conséquence, la quantité disponible de protéines MyoD fonctionnelle dans ces cellules est diminuée ce qui pourrait être impliqué dans l'altération de la différenciation de myoblastes en myotubes dans les muscles squelettiques des patients DM1 (Amack et al., 2002).

*Nkx2.5*, l'orthologue de *Tinman* chez la Drosophile, code pour un facteur de transcription cardiaque nécessaire pour le développement et le fonctionnement normal du cœur. *Nkx2.5* est surexprimée dans les muscles squelettiques des patients DM1. La surexpression de l'ARNm *DMPK* muté dans le muscle squelettique de la souris a également induit l'activation transcriptionnelle du gène *Nkx2-5* accompagnée d'une perturbation de l'expression de ses

cibles notamment une diminution de l'expression de la *connexine 43 (CX43)* qui a été suggérée comme associée aux défauts de conduction cardiaque (Yadava et al., 2008). Ces défauts d'expression de *Nkx2.5* et de ses cibles étaient spécifiques à la DM1 et aucune altération de ce type n'a été décrite dans les autres dystrophies musculaires (Yadava et al., 2008)

### e) La dérégulation des miARN dans la DM1

La maladie de la DM1 est une pathologie très complexe impliquant une mutation dans une région non traduite induisant des altérations à plusieurs niveaux. En plus, des défauts liés à l'épissage alternatif, la dérégulation transcriptionnelle et traductionnelle, des hypothèses suggérant l'implication des ARN non-codons dans la pathogénicité de la DM1 ont été exploitées. Ces hypothèses ont été renforcées par une étude qui a identifié 185 microARN dérégulés dans les muscles squelettiques et cardiaque dans dix maladies musculaires humaines dont certaines dérégulations de microARN étaient communes entre plusieurs maladies et d'autres étaient uniques et maladie-spécifique (Eisenberg et al., 2007).

Les microARN (miARN) sont de petites séquences d'ARN non codantes qui régulent la traduction de l'ARNm ou sa stabilité et, par conséquent, le dosage des protéines chez les eucaryotes (Inui et al., 2010). Les miARN interagissent avec leurs ARN cibles principalement par l'appariement de bases complémentaires en 3'UTR des ARNm du gène cible, entraînant une dégradation de l'ARN et / ou une inhibition de sa traduction (Bartel, 2009).

### i. Dérégulation des miRNA dans le muscle DM1

La DM1 étant une dystrophie musculaire dont les muscles squelettiques et le muscle cardiaque sont gravement touchés, naturellement, les premières études testant la dérégulation de miRNA dans la maladie ont été menées dans le muscle. Dans un premier temps, Gambardella et ses collaborateurs se sont intéressés à l'étude des miRNA impliqués dans le développement musculaire et cardiaque appelés aussi myo-miRs (*miR-1*, *miR-133a/b*, *miR-206*, *miR-181*) en plus de *miR-103* et *miR-107* fortement exprimés dans le cerveau, le cœur et le muscle et semblent se lier à l'ARN *DMKP*. Cette étude a permis de montrer que dans les tissus du muscle squelettique provenant de biopsies de patients DM1 *miR-206* est le seul miRNA dont son expression est élevée notamment dans les noyaux centralisés, les autres

miRNA analysés étaient faiblement exprimés (Gambardella et al., 2010). *miR-206* est un microARN à expression spécifique de muscle squelettique, impliqué dans la différenciation de myoblastes et donc la formation de myotube et retrouvé dérégulé dans la dystrophie musculaire de Duchenne et la sclérose latérale amyotrophique (Ma et al., 2015). La dérégulation de *miR-206* dans le muscle squelettique peut suggérer son implication dans l'atrophie musculaire observée chez les patients DM1 (Gambardella et al., 2010).

Une année plus tard, Perbellini et ses collaborateurs ont étudié la dérégulation des miARN sur des biopsies musculaires de 15 patients DM1. Ils ont analysé 24 miARN candidats et ils ont trouvé un niveau élevé de *miR-1* et *miR-335* et un niveau faible de *miR-29b/c* et *miR-33*. La dérégulation de niveau d'expression de *miR-1*, *miR-133b* et *miR-206* était accompagnée d'une altération de leur distribution cellulaire au niveau de muscle squelettique des patients DM1. Les cibles potentielles de certains de ces miRNA dérégulés ont été également analysées et retrouvées surexprimées. Citant par exemple les gènes impliqués dans les arythmies cardiaques (*KCNE1*, *KCNJ2*, *CALM2*), l'atrophie (*DAG1*, *DIABLO*, *RET*, *TRIM63*, *TGFB3*), et le développement musculaire (*MEF2a*, *MET*, *GATA6*, and *HAND2*) suggérant une implication de la dérégulation de ces miARN dans la pathogénicité de la DM1 (Perbellini et al., 2011).

Dans l'étude de Fernandez-Costa, l'expression des répétitions CUG dans les muscles somatiques de la *Drosophila* a induit la diminution de l'expression de dix-neuf miARN dont trois ont été également retrouvés faiblement exprimés dans les biopsies de muscles squelettiques des patients DM1. Ceux-ci incluent *miR-1*, *miR-7* et *miR-10* (Fernandez-Costa et al., 2013). Leurs cibles ont été également fortement exprimées : *SOD1* (*Superoxide Dismutase 1*), le régulateur transcriptionnel *SMARCA4* (*SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily A, member 4*), *NET1* (*nucleotide exchange factor Neuroepithelial Cell Transforming 1*) régulés par *miR-1* et *ATG4* (*autophagy regulator cysteine protease*), la sécrétase de la protéine précurseur de l'amyloïde *Cathepsin B*, la protéine du cytosquelette *vinculine VCL* régulés par *miR-7* et *UBE11* (*Ubiquitin-activating enzyme E1*) régulé par *miR-10* (Fernandez-Costa et al., 2013). La différence entre le niveau d'expression de *miR-1* dans l'étude de Perbellini et celle de Fernandez-Costa peut être expliquée par le type d'échantillon musculaire et la forme de la maladie chez les patients DM1 analysés.

## ii. Dérégulation de miARN dans le cœur en DM1

Très peu d'études ont été effectuées pour analyser la dérégulation de miARN dans le cœur à cause de l'inaccessibilité aux échantillons cardiaques des patients DM1. D'abord, l'équipe de Kalsotra a étudié le profil d'expression de 500 miARN dans le cœur dans le contexte DM1 et a montré que l'expression de longues répétitions CUG spécifiquement dans le cœur de la souris induit la dérégulation de l'expression de 54 miARN dont 22 ont été validés dans les biopsies cardiaques des patients DM1. Parmi ces miARN, nous retrouvons *miR-21* qui est retrouvé élevé chez ces patients (Kalsotra et al., 2014). *miR-21* est connu pour son activation de la voie de signalisation de la kinase ERK par l'inhibition de *SPRY1* (*Sprouty RTK Signaling Antagonist 1*) dans les fibroblastes cardiaques ce qui impacte la structure et la fonction cardiaque en régulant la survie des fibroblastes et la sécrétion de facteur de croissance, contrôlant le niveau de fibrose interstitielle et de l'hypertrophie cardiaque (Thum et al., 2008). Au contraire, les membres de la famille *miR-29*, *miR-30* et *miR-133* sont retrouvés faiblement exprimés et leur perte de fonction peut être également impliquée dans la fibrose interstitielle chez les patients DM1 (Kalsotra et al., 2014).

Deux autres miARN très intéressants ont été retrouvés faiblement exprimés dans le tissu cardiaque des patients DM1 : *miR-23a/b* et *miR-1*. En fait, parmi les cibles de *miR-23a/b* nous retrouvons CELF1, suggérant que la perte de fonction de *miR-23a/b* participe à la pathogénicité de la DM1 en favorisant encore plus la surexpression de CELF1 (Kalsotra et al., 2014). L'étude des voies de signalisation associées à ces miARN dérégulés dans le cœur a permis de mettre en évidence une implication de la perte de fonction de facteur de transcription Mef2 entraînant une reprogrammation globale du transcriptome cardiaque dans le contexte de la DM1 (Kalsotra et al., 2014).

Concernant la dérégulation de *miR-1* observée dans l'étude de Kalsotra, cela confirme ce qui a été déjà prouvé dans l'étude de Rau en 2011 (Rau et al., 2011). En fait, il a été démontré que dans le tissu cardiaque sain, MBNL1 régule la maturation de *pre-miR-1*, et que sa séquestration dans les foci nucléaires en DM1 l'empêche d'assurer sa fonction induisant une réduction de la forme mature de *miR-1* et une accumulation de *pre-miR-1* ainsi qu'une surexpression de ses cibles. Parmi les cibles de *miR-1* nous retrouvons *GJA1* (*Gap Junction Protein Alpha 1*) et *CACNA1C* (*alpha-1 subunit of a voltage-dependent calcium channel*) mis en évidence pour leurs implications dans les défauts de la conduction cardiaque et les arythmies respectivement (Rau et al., 2011).

L'ensemble des exemples cités montrent l'implication de la dérégulation des miARN dans la pathogénicité de la DM1 et par ce fait plusieurs miARN peuvent représenter des biomarqueurs clés capables de prédire la progression de la maladie, offrant la possibilité de mettre en œuvre des mesures préventives avant l'apparition des symptômes graves.

Dans ce chapitre nous avons décrit les mécanismes moléculaires mis en jeu pour expliquer les phénotypes observés dans la DM1. Nous avons vu plusieurs niveaux de dérégulation induits par l'ARN *DMPK* toxique. Cela implique la dérégulation des protéines de liaison aux CUG notamment les deux facteurs d'épissage alternatif MBNL1 et CELF1, la dérégulation transcriptionnelle et traductionnelle et la dérégulation des miARN.

### III. La Drosophile comme modèle d'étude de la DM1

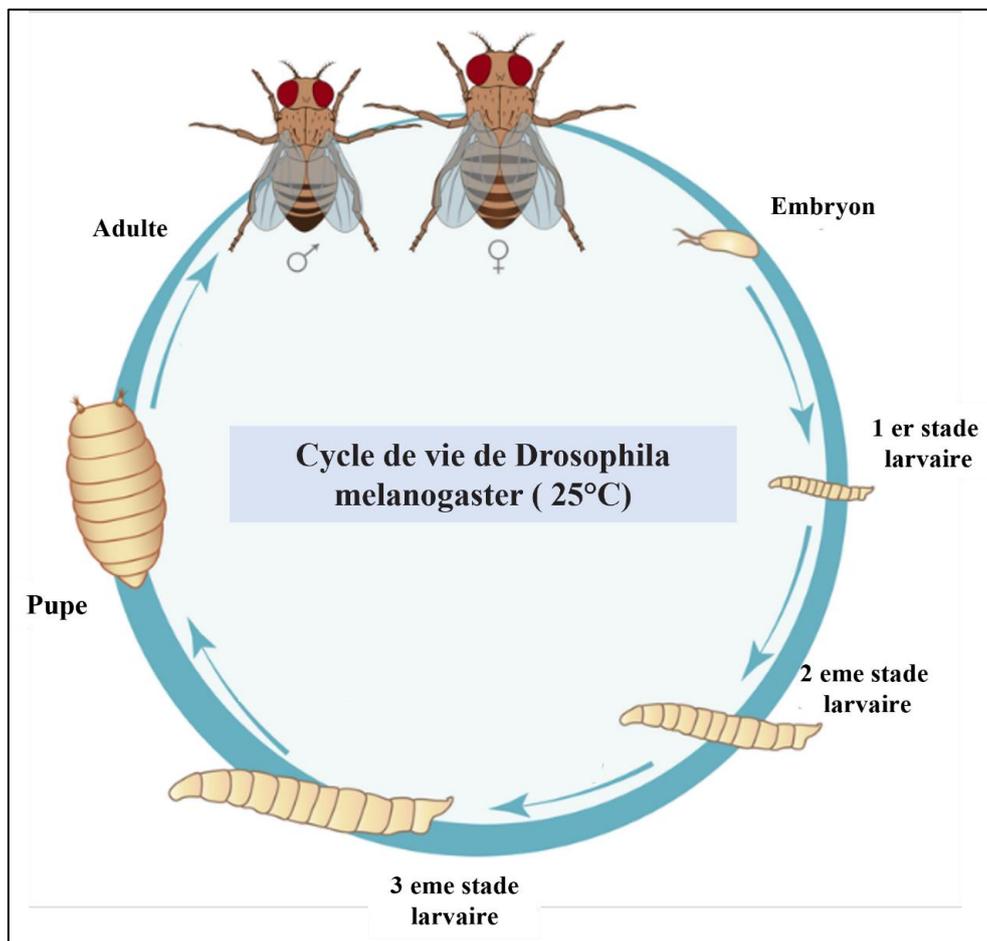
Pour étudier la physiopathologie et les mécanismes moléculaires impliqués dans les symptômes observés chez les patients de la DM1, plusieurs modèles animaux ont été créés. Parmi les modèles les plus utilisés en DM1 nous retrouvons le modèle de souris (Huguet et al., 2012; Kim et al., 2014; Orengo et al., 2008; Rinaldi et al., 2012; Seznec et al., 2000; Wang et al., 2007) et de Drosophile (Auxerre-Plantié et al., 2019; de Haro et al., 2006; Garcia-Lopez et al., 2008; Houseley et al., 2005; Picchio et al., 2013). Dans ce chapitre je décrirais les modèles de Drosophile DM1 qui ont été générés par différents laboratoires au cours du temps, puis je me focaliserais plus particulièrement sur le système cardiaque de la Drosophile et sa conservation avec le cœur humain/ mammifères qui a fait l'objet de mon étude qui consiste à analyser les mécanismes impliqués dans les défauts cardiaques associés à la DM1.

#### 1. Une brève présentation de la Drosophile

*Drosophila melanogaster* communément appelée mouche de vinaigre, un insecte holometabole donc à métamorphose complète, son développement comprend un stade embryonnaire, trois stades larvaires mobiles, un stade pupal, qui donne après éclosion la mouche adulte (Figure 9). Chacun de ces stades a fourni une plateforme pour la recherche sur le développement normal et pathologique.

La *Drosophila* est un organisme modèle très puissant pour comprendre une multitude de processus de développement ainsi que les mécanismes moléculaires des maladies humaines car les bases moléculaires, cellulaires et génétiques du développement sont hautement conservées entre les mammifères et *D. melanogaster*.

En effet, dans les années 2000, le génome de la *Drosophila* a été complètement séquencé et annoté et près de 77% des gènes causants des maladies humaines ayant un orthologue chez la *Drosophila*, parmi lesquels 26 ont été identifiés comme associés à des maladies cardiovasculaires (Bier, 2005; Reiter et al., 2001).



**Figure 9 : Le cycle de développement de la *Drosophila* à 25°C.** Le cycle de développement de la *Drosophila* dure environ 10 jours à 25°C. Il est constitué de différents stades : le stade embryonnaire d'une durée de 22 heures, pendant lequel se forment les muscles embryonnaires durant la myogenèse. Le stade larvaire est composé de trois phases (L1, L2 et L3) et il dure environ 4 à 5 jours. Ensuite, le stade pupal d'une durée de 3.5 jours, pendant lequel se développe la mouche adulte (adapté du site internet : bcgdevelop.fr).

La Drosophile a été introduite comme modèle animal pour la recherche depuis les années 1900. L'étude des variations phénotypiques de Drosophile a permis à Thomas Hunt Morgan de mettre en évidence les principes de la reproduction sexuée « l'hérédité à travers les chromosomes » qui a valu le prix Nobel de Médecine et de Physiologie en 1933 (Morgan et al., 1915). Cependant, la notion du rôle des chromosomes X et Y dans la détermination sexuelle a été découverte en premier par Nettie Stevens en 1905, dont Thomas Hunt Morgan fut l'un des mentors. Plusieurs années plus tard, un second prix Nobel a été attribué à Eric Wieschaus et Christiane Nüsslein-Volhard en 1995 pour leurs travaux sur le contrôle génétique du développement embryonnaire précoce chez la Drosophile promouvant d'avantage l'utilisation de cette espèce dans différents domaines de la recherche. On se pose la question pourquoi un tel succès auprès des scientifiques ?

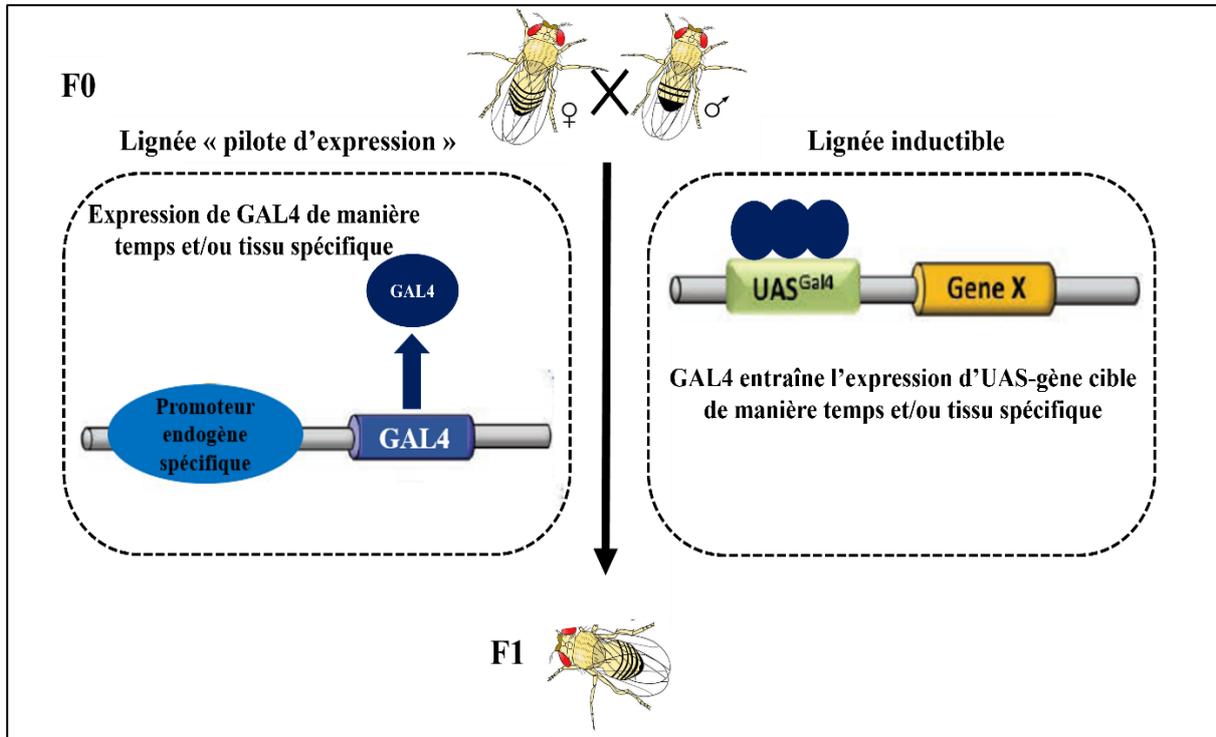
En fait, ce modèle présente de nombreux avantages comme la facilité et le coût réduit des conditions d'élevage en comparaison avec les souris, le temps de génération rapide (10 jours à 25°C) permettant de suivre un grand nombre de générations et le grand nombre de descendants (chaque femelle peut pondre plus de 2000 œufs durant sa vie) permettant d'étudier facilement les étapes du développement embryonnaire.

D'un point de vue génétique, la facilité de créer des mutations de gènes et d'effectuer des criblages génétiques à grande échelle a fait de la Drosophile un modèle de choix.

Un autre avantage de ce modèle est que le génome de la Drosophile code pour un peu plus de 14 000 gènes (Adams et al., 2000) contre environ 30 000 chez l'Homme, ce qui signifie moins de redondance des gènes, facilitant ainsi les études fonctionnelles et la compréhension de fonctions de gènes.

De nombreux outils sont disponibles chez la Drosophile pour étudier les fonctions des gènes et leurs implications dans les processus cellulaires et moléculaires. Parmi ces outils, i) le système binaire GAL4/UAS (pour *Upstream Activating Sequence*) (Figure 10), système d'activation de transcription issu de la levure, qui permet de contrôler l'expression de transgènes d'intérêt de façon tissu et/ou temps spécifique (Brand and Perrimon, 1993) et ii) le système d'édition du génome via le système CRISPR/Cas9 particulièrement performant chez la Drosophile (Gratz et al., 2015; Housden et al., 2016; Port et al., 2020).

A cela s'ajoute l'accès aux larges collections des lignées mutantes et/ou transgéniques mais également aux outils moléculaires disponibles via les centres tels que Bloomington, VDRC ou DGRC (Venken and Bellen, 2005).



**Figure 10 : Principe du système UAS/GAL4.** Le système UAS/GAL4 repose sur l'utilisation de deux lignées transgéniques de *Drosophila* : une lignée appelée « pilote d'expression », contenant les séquences qui codent l'activateur de transcription GAL4 contrôlé par la région promotrice d'un gène ayant un profil d'expression spatio-temporelle bien caractérisée. La seconde lignée appelée « lignée inducible » porte les séquences UAS placées en amont du gène d'intérêt. Grâce à l'activation de séquences UAS par GAL4, la descendance (F1) issue du croisement de ces deux lignées exprimera le transgène d'intérêt d'une manière dépendante de la protéine GAL4 (tissu et/ ou temps spécifique).

## 2. Modèles de *Drosophile* pour l'étude de la DM1

Plusieurs modèles de *Drosophile* de DM1 ont été générés pour comprendre les mécanismes impliqués dans la toxicité de l'ARN *DMPK* muté. Le premier modèle consistait à exprimer des répétitions pures de triplets CTG de taille variable 11, 48, 56 ou 162 flanquées d'environ 100 pb de la région 3'URT du gène *DMPK* humain, et clonées dans la partie 3'UTR d'un gène rapporteur codant pour la GFP. Les foci nucléaires de mbl qui co-localise avec les répétitions CUG ont été détectés uniquement dans les cellules musculaires exprimant 162 CTG. par contre, les mouches DM1 ne présentait aucun défaut de l'activité locomotrice, ni des défauts musculaires et leur durée de vie était pratiquement normale (Houseley et al., 2005) suggérant que l'expansion de 162 répétitions CTG était insuffisante pour reproduire les phénotypes de la DM1.

Ce modèle DM1 généré par Houseley donnait des résultats similaires au modèle DM1 de Le Mée (Mée et al., 2008) qui a créé des mouches transgéniques qui expriment des répétitions inductibles de différents types (CUG ou CAG) et longueurs (16, 240, 480 répétitions) et seules les mouches exprimant 240 et 480 CTG qui ont formé des foci nucléaires lorsque ces répétitions sont exprimées dans le muscle larvaire, les glandes salivaires et les ovaires. Ainsi, une seule lignée (CTG<sub>240.4</sub>) qui a donné une toxicité importante de l'ARN lorsque les répétitions ont été exprimées d'une manière ubiquitaire. Cette lignée présente une dégénérescence grave dans l'œil et une forte létalité en comparaison au control (Mée et al., 2008). En résumé, le modèle DM1 de *Drosophile* généré par Houseley et par Mée n'ont pas reproduit les phénotypes typiques de la DM1.

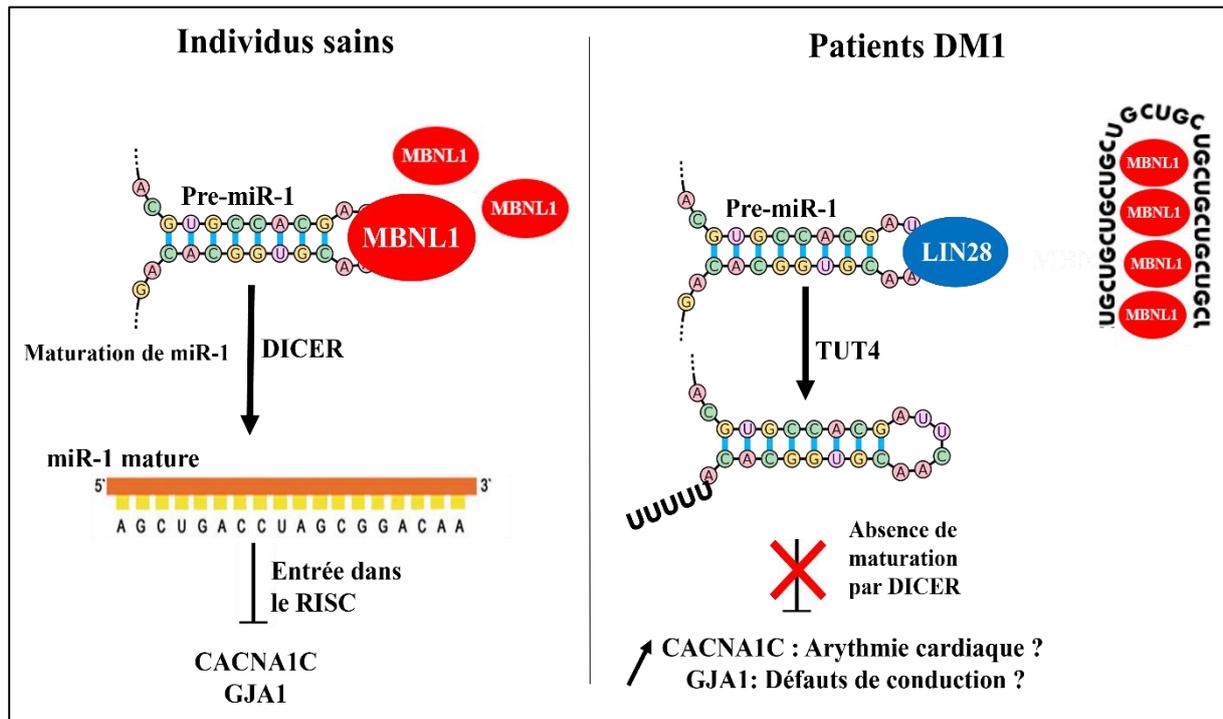
Cependant, un nouveau modèle généré par l'équipe de Juan Botas a reproduit des phénotypes DM1 évidents permettant de mieux comprendre la pathogenèse de cette maladie. Ce modèle consistait à exprimer 480 répétitions CTG interrompues dans les muscles adultes ou l'œil. Ces mouches ont développé des phénotypes de dégénérescence des tissus musculaires et oculaires qui s'aggrave avec l'âge. La dégénérescence des muscles de vol a induit une perte de la capacité à voler pour les mouches adultes. Ce défaut, a été restauré par l'expression de MBNL1 humaine dans le muscle. De plus, la surexpression de CELF1 humaine dans le muscle et l'œil des mouches DM1 avec 480 CTG aggrave la dégénérescence des tissus musculaires et oculaires. L'expression de longues répétitions dans les mouches induit également une accumulation de foci nucléaires contenant les transcrits avec 480 CTG qui co-localisent avec mbl dans les muscles larvaires et adultes (de Haro et al., 2006).

Deux ans plus tard, des mouches transgéniques similaires, exprimant 480 CUG non codantes et interrompues ont été générées par Garcia-Lopez et ses collègues. Ces mouches présentent une durée de vie réduite, des phénotypes dégénératifs des muscles de vol et des yeux dépendants de la longueur de répétitions CUG ainsi que des altérations du système nerveux central. L'analyse des transcrits a identifié des défauts de l'épissage alternatif de gènes déjà mal épissés chez les patients DM1 comme la *Troponine T*. En se basant sur le phénotype des yeux, un crible a été réalisé pour identifier les modificateurs génétiques de la toxicité induite par les répétitions CUG. Cela a permis d'identifier le facteur d'exportation d'ARNm Aly, l'inhibiteur de l'apoptose Thread, le facteur de remodelage de la chromatine Nurf-38 et le composant structurel de la matrice extracellulaire Viking (Garcia-Lopez et al., 2008). Ce modèle a été aussi utilisé pour cribler les modificateurs chimiques qui peuvent améliorer le phénotype observé dans le système nerveux. Ce criblage a conduit à la sélection de dix produits chimiques agissant comme suppresseurs de la toxicité neuronale médiée par les répétitions CUG. La plupart de ces substances sont des inhibiteurs d'excitation neuronale, d'absorption de monoamine ou de substances qui affectent le métabolisme du sodium et du calcium (Garcia-Lopez et al., 2008).

Un autre crible a été réalisé sur ce modèle afin de développer une stratégie thérapeutique réduisant la formation d'épingle à cheveux de l'ARN muté et d'améliorer le phénotype toxique observé dans le cerveau. Cela a permis d'identifier l'hexapeptide d'acide aminé D (ABP1) comme composé capable de se lier aux répétitions CUG pour bloquer leur interaction avec les protéines de liaison à l'ARN dont mbl. Cela a supprimé la létalité induite par les répétitions CUG toxiques et a amélioré les phénotypes musculaires. Une analyse *in vitro* a démontré que ABP1 se lie aux répétitions CUG avec une haute affinité et transforme l'ARN CUG double brin à une conformation simple brin, réduisant ainsi la séquestration de mbl. Cet effet bénéfique de l'ABP1 a été validé chez la souris. En fait, le traitement par ABP1 de modèle de souris DM1 exprimant 250 CTG dans le muscle restaure en partie les défauts d'épissage alternatif de *Serca1* et *Tnnt3* et améliore l'histopathologie musculaire (García-López et al., 2011).

Ce modèle a aussi permis d'investiguer l'implication des miARN dans certains phénotypes DM1. Une analyse menée par Garcia-Lopez a identifié une dérégulation de nombreux miARN, conservés entre la Drosophile et l'Homme. Ceux-ci incluent *miR-1*, *miR-7* et *miR-10* qui sont trouvés faiblement exprimés dans le modèle de Drosophile exprimant 480 CTG et

chez les patients DM1. La réduction de *miR-1* est dépendante de la fonction de mbl (Fernandez-Costa et al., 2013).



**Figure 11 : Implication de *miR-1* dans les symptômes cardiaques associés à la DM1.** Chez les individus sains, MBNL1 se lie à la structure en tige boucle du *pré-miR-1* pour assurer sa maturation en permettant la fixation et la dégradation par Dicer de cette structure secondaire. Le *miR-1* mature peut alors entrer dans le complexe de « silencing » RISC et inhiber ses cibles telles que *CACNA1C* et *GJA1*. Dans le contexte DM1, MBNL1 est séquestrée par les répétitions CUG dans les foci nucléaires. Donc la protéine de compétition à MBNL1, LIN28 se lie à la structure secondaire de *pre miR-1* et empêche DICER d’agir. Le *pré-miR-1* reste immature et ne peut inhiber ses cibles. *CACNA1C* et *GJA1*, par exemple, sont surexprimés dans le cœur des patients DM1 et sont supposés associés aux arythmies et aux défauts de conduction cardiaques chez ces malades ( adapté de Rau et al., 2011).

La dérégulation de *miR-1* dans le contexte DM1 a été bien étudiée et mis en jeu une altération de la régulation de maturation de *pre-miR-1* par MBNL1 (Figure 11). En fait, dans le contexte physiologique, MBNL1 rentre en compétition avec LIN28 pour la liaison au motif UGC situé dans la boucle de *pre-miR-1* et donc empêche LIN28 de se fixer. Cependant, dans le contexte DM1, MBNL1 est séquestrée par les répétitions CUG dans les foci nucléaires, cela permet à LIN28 de se lier au *pre-miR-1* induisant l'uridylation de *pre-miR-1* par terminal l'uridylyltransférase 4 (TUT4) ce qui bloque son traitement par Dicer. En conséquence, la réduction des niveaux de *miR-1* conduit à une augmentation de l'expression de ses cibles impliquées dans certains phénotypes cardiaques observés dans la DM1 (Rau et al., 2011).

Une autre série de modèles de mouches a été générée exprimant des expansions répétées CTG non interrompues de taille variable 19, 130, 200, 230, 250 et 270 clonées dans la région 3'UTR du gène *DsRed*. La toxicité de ces répétitions CTG a été détectée uniquement chez les mouches exprimant des répétitions longues (200 répétitions ou plus) caractérisée par des défauts d'épissage alternatif, une accumulation de foci nucléaires, des défauts oculaires et une létalité élevée lorsque les répétitions sont exprimées de manière ubiquitaire. Ce modèle a permis de mettre en évidence une information supplémentaire, que la co-expression de CTG avec des transcrits répétés CAG conduit à la génération de siARN qui accentuent la toxicité des répétitions CTG. Ces siARN ciblent l'expression des gènes contenant des répétitions CAG, tels que *l'ataxine-2 (ATXN2)* et la *protéine de liaison TATA (TBP)*, qui portent de longues répétitions CAG conservées entre la Drosophile et l'Homme (Yu et al., 2011).

Afin d'étudier les mécanismes moléculaires conduisant à la dégénérescence de tissu musculaire adulte dans la DM1, l'équipe d'Artero a généré un nouveau modèle de Drosophile permettant d'induire l'expression de 480 répétitions CTG par un choc thermique uniquement chez les mouches adultes. Ce modèle a permis de mettre en évidence l'implication de l'augmentation de l'autophagie et de l'apoptose dans l'atrophie musculaire observée dans le contexte DM1. Ainsi, l'inhibition de la voie de l'apoptose ou de l'autophagie médiée par la surexpression de DIAP1, mTOR ou mbl, ou par l'inhibition des gènes régulateurs de l'autophagie, a permis de restaurer le phénotype musculaire chez les mouches DM1. Ces résultats ont été validés dans des biopsies musculaires des patients DM1 dans lesquelles les gènes répresseurs d'autophagie et d'apoptose sont retrouvés faiblement exprimés (Bargiela et al., 2015).

En fin, la même équipe a réalisé une analyse de la fonction cardiaque dans un nouveau modèle de mouches DM1 surexprimant 250 répétitions CUG pures spécifiquement dans le

tissu cardiaque. Ces mouches présentaient des arythmies et une diminution de l'espérance de vie. Ces phénotypes sont améliorés par le traitement à la pentamidine, une molécule qui libère mbl des foci nucléaires dans les cardiomyocytes DM1 (Chakraborty et al., 2015).

En 2013, notre équipe a généré une série de *Drosophiles* transgéniques inductibles porteuses de répétitions CTG interrompues d'une taille variable (240, 480, 600, 960). L'effet de l'expression de ces répétitions a été analysé dans les muscles somatiques larvaires. En plus de la formation de foci nucléaires et de la séquestration de mbl, les muscles larvaires DM1 ont récapitulé les principaux symptômes de la DM1 d'une manière dépendante de la taille des répétitions CTG, comme l'hypercontraction musculaire, la division des fibres musculaires, la taille réduite des fibres et des défauts de fusion de myoblastes (Picchio et al., 2013).

Des travaux récents de notre équipe ont appliqué le modèle de *Drosophile* pour comprendre les mécanismes moléculaires associés aux défauts cardiaques chez les patients DM1 (Auxerre-Plantié et al., 2019). Cette étude a révélé que le modèle de *Drosophile* surexprimant Bru3, orthologue de CELF1, spécifiquement dans le cœur souffre des défauts de la conduction cardiaque, qui sont similaires à ceux qui sont observés chez les patients DM1. Afin d'identifier les gènes impliqués dans les défauts de conduction associés à la DM1, les transcrits ont été isolés spécifiquement à partir de tissu cardiaque de mouches adultes surexprimant Bru3 en utilisant la technique de TU-tagging, suivie d'un séquençage d'ARN. Cela a montré que l'expression de *straightjacket (stj)/Calcium Voltage-Gated Channel Auxiliary Subunit Alpha 2 delta 3 (CACNA2D3)/ $\alpha 2\delta 3$*  qui est normalement impliqué dans la contraction cardiaque, était significativement augmentée dans les cellules cardiaques de mouches DM1. Conformément à cette observation, une analyse de gain de fonction de *stj* a été testée, et les résultats montrent que la surexpression de *stj* spécifiquement dans le cœur de la *Drosophile* induit des défauts de conduction cardiaque et son atténuation en utilisant des ARNi dans les mouches DM1 restaure ce phénotype cardiaque. Le rôle important de *stj/ $\alpha 2\delta 3$*  dans la régulation du rythme cardiaque a été en outre confirmé chez l'Homme par le fait que  $\alpha 2\delta 3$  est retrouvé surexprimé dans les ventricule des patients DM1 présentant des défauts de conduction cardiaque (Auxerre-Plantié et al., 2019). Dans la même étude, deux autres lignées modèles ont été analysées : une lignée surexprimant 960 répétitions CTG et une lignée atténuée pour *mbl* par ARNi spécifiquement dans le cœur. Ces deux lignées présentent des arythmies, une augmentation de la période cardiaque et des défauts de contractilité qui sont des symptômes observés chez les patients DM1 (Auxerre-Plantié et al., 2019; Souidi and Jagla, 2021).

En fait, ces travaux ont permis de valider la *Drosophile* comme un très bon modèle pour comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans les défauts cardiaques observés dans la DM1 notamment que le développement et la fonction cardiaques de la mouche sont conservés et similaires aux mammifères/ Homme.

### **3. Cardiogenèse chez la *Drosophile***

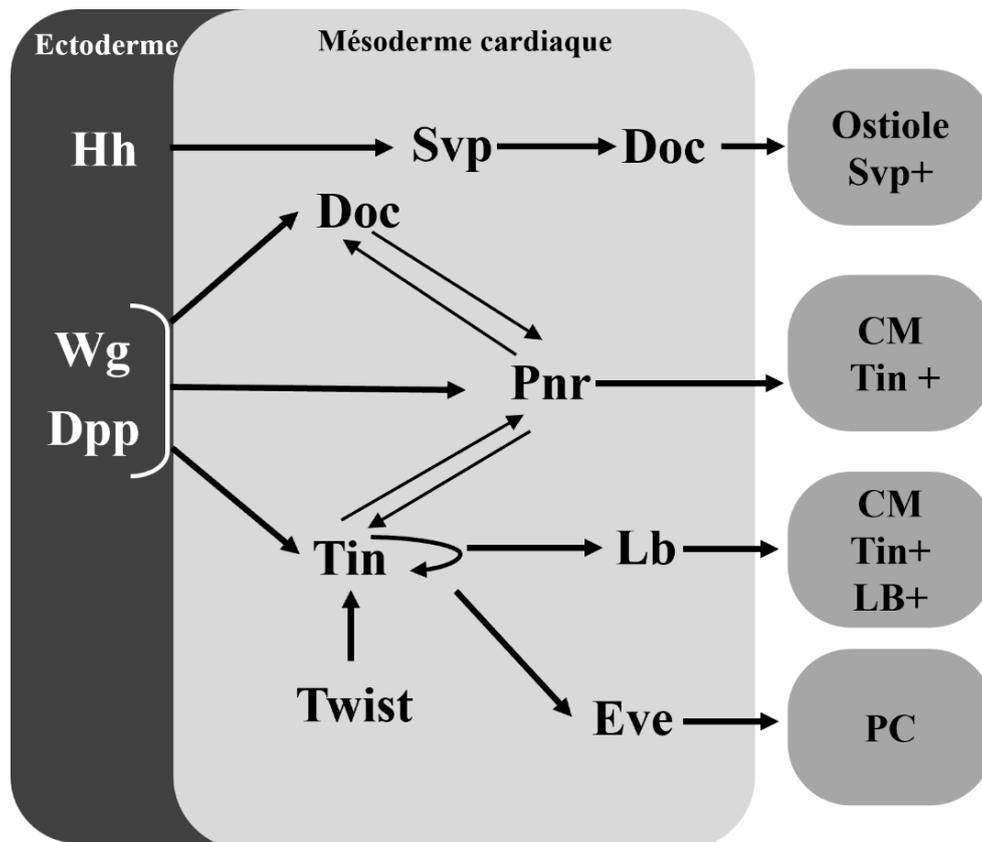
Chez la *Drosophile*, le tube cardiaque (ou vaisseau dorsal) est mis en place dès les stades précoces de l'embryogénèse à partir du mésoderme cardiaque. C'est une structure tubulaire contractile, à activité musculaire autonome, positionné le long de l'axe antéro-postérieur en position dorsale (Harvey and Rosenthal, 1999). Il est constitué de cellules musculaires contractiles « les cardioblastes » flanquées de part et d'autre de cellules non musculaires « cellules péricardiaques » qui assurent le rôle de support structural ainsi que de la filtration de l'hémolymphe (Rugendorff et al., 1994; Wu et al., 1995). L'hémolymphe est un liquide circulatoire, l'équivalent du sang chez l'Homme, qui assure l'apport des nutriments, des cellules et des peptides immunitaires ainsi que des messagers chimiques tel que les hormones, mais il n'intervient pas dans l'oxygénation des organes comme chez l'Homme car la *Drosophile* possède un système d'apport d'oxygène différent via les trachées qui connectent directement les organes avec le milieu extérieur.

Le tube cardiaque possède une polarité antéro-postérieure. Il est composé de l'aorte en antérieur, et la partie postérieure avec une lumière plus importante formant le cœur où l'hémolymphe entre par les ostioles (des cellules contenant des ouvertures) lors de la dilatation (diastole) (Rugendorff et al., 1994). Lors de la contraction (systole), les ostioles se ferment et l'hémolymphe est éjecté vers la partie antérieure du corps de la larve ou l'adulte via l'aorte (Zmojdzian et al., 2008).

#### **A. Formation du cœur embryonnaire**

Au stade embryonnaire de blastoderme, une cascade de régulation faisant intervenir les gènes maternels induit l'expression de facteur de transcription zygotique Twist qui est nécessaire pour la spécification des cellules primordiales du mésoderme. Les cellules exprimant Twist s'invaginent le long de la ligne médiane ventrale à l'intérieur de l'embryon, puis au stade embryonnaire 9 elles se propagent latéralement et dorsalement en une

monocouche de cellules opposées à l'ectoderme (Wu et al., 1995). La spécification du mésoderme cardiaque commence au stade 10 sous l'influence de signaux externes provenant de l'ectoderme impliquant les facteurs de croissance, Decapentaplegic (Dpp/BMP, voie du TGF $\beta$ ) et Wingless (Wg/WNT, voie WNT) (Figure 12).



**Figure 12 : Réseau de régulation cardiaque de diversification cellulaire chez la *Drosophile*.** La spécification des cardioblastes (CM) est régulée par les signaux Hedgehog (Hh), Decapentaplegic (Dpp) Wingless (Wg) provenant de l'ectoderme et du signal mésodermique Twist (Twi). L'activation de Tin, Doc et Pnr conduit à la spécification des différentes populations de cardiomyocytes (les ostioles Svp+, les cardiomyocytes Tin+, les cardiomyocytes Tin+ Lb+) et la population de cellules péricardiaques (PC).

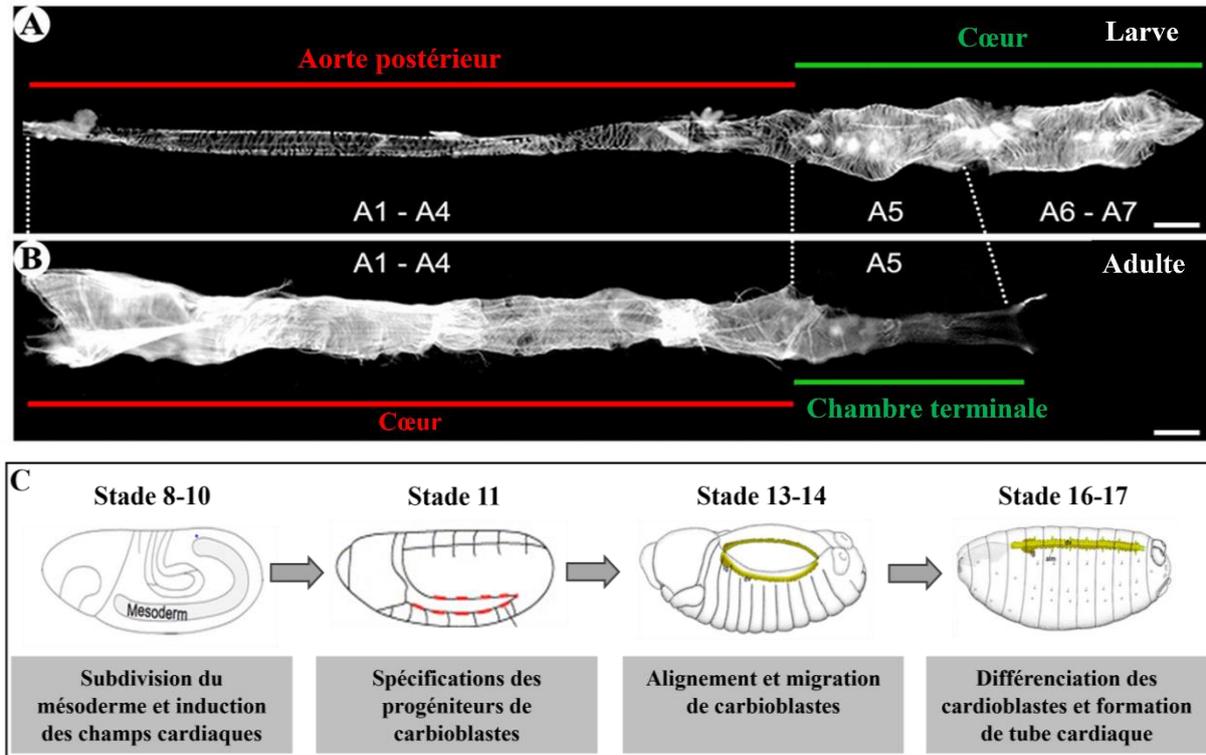
Wg est exprimée en bandes continues (Lockwood and Bodmer, 2002; Wu et al., 1995) et Dpp est exprimée dans une large bande dorsale (Lockwood and Bodmer, 2002). Le gradient de Dpp est nécessaire pour la subdivision du mésoderme en mésoderme dorsal et ventral. Wg et Dpp activent ensemble l'expression de deux facteurs : Tinman (*Tin*) et Dorsocross (*Doc/TBX6*). *Tin* code pour un facteur de transcription mésodermique à homéodomaine nécessaire pour la spécification cardiaque chez la Drosophile et les vertébrés. L'activité de *Doc* est aussi nécessaire à la formation de tous les types de cellules myocardiques et péricardiques chez la Drosophile (Reim and Frasch, 2005).

Au début du stade embryonnaire 11, Dpp et Wg induisent, en passant par l'activation de l'expression de *Tin* et *Doc*, l'expression du facteur *GATA Pannier (Pnr)* dans le mésoderme cardiaque présumé et assurent en parallèle l'expression restreinte de *Tin* (Klinedinst and Bodmer, 2003; Lockwood and Bodmer, 2002). *Pnr* maintient à son tour l'expression de *Tin* et *Doc*. Finalement, c'est l'expression de ces trois facteurs *Tin*, *Doc* et *Pnr* qui permettra la spécification du mésoderme cardiaque. A partir du stade 12, les cardioblastes commencent à s'aligner sur un rang de chaque côté de l'embryon et migrent dorsalement l'une vers l'autre pour finir par fusionner au stade 16 (Haack et al., 2014) (Figure 13). Au stade 17 le tube cardiaque est bien formé et s'étend en segments répétés sur deux segments thoraciques et sept segments abdominaux dont l'organisation est stéréotypée et reproductible d'un hémisegment à l'autre.

En fin d'embryogenèse, le cœur mature subdivisé en cœur propre (postérieur) et aorte (antérieure) est composé de 52 paires de cellules cardiaques organisées de manière segmentée. Chaque segment du cœur propre est composé de six paires de cardioblastes : quatre paires de cardioblastes (CB) exprimant *Tin* et deux paires de CB exprimant *Seven-up (Svp)*. Les CB *Tin*-positifs formeront les cardiomyocytes contractiles. Deux cardioblastes *Tin*-positifs sur quatre expriment également le gène *Ladybird (lb)* (Jagla et al., 1997). *Svp* qui code pour un récepteur orphelin aux hormones stéroïdes possède la capacité à réprimer *Tin*. Ces cardioblastes *Svp*-positifs formeront les ostioles qui seront localisés dans les segments A5-A7 du cœur embryonnaire puis dans les segments A1-A4 du cœur adulte et qui permettront l'entrée de l'hémolymphe dans la cavité cardiaque (Wu et al., 1995). Les CB *Svp*-positifs expriment également le facteur *Doc*.

Les deux rangés de cardioblastes sont entourés de cellules non contractiles « les cellules péricardiaques » exprimant la péricardine ainsi que le facteur de transcription *Zfh-1*. Ce

dernier a été considéré comme un facteur indispensable à la spécification des différentes sous populations de cellules pericardiaques (Su et al., 1999).



**Figure 13 : Développement cardiaque chez la *Drosophile*.** Tube cardiaque de la larve (A) et de la mouche adulte (B), marqués par la phalloïdine actine polymérisée (F-actine). A) Le tube cardiaque embryonnaire et larvaire de la *Drosophile* est composé de l'aorte en antérieur (segments A1-A4) et du cœur à proprement parler (segments A5-A7). B) Le tube cardiaque adulte est plus court (segments A1-A5) et composé en antérieur d'une chambre conique (segment T3 non représenté), du cœur avec une lumière large (segments A1 - A4) et d'une chambre terminale en segment A5. C) Représentation schématique du développement cardiaque chez l'embryon de *Drosophile* qui commence au stade 8 par la subdivision du mésoderme et la spécification des champs cardiaques et se termine au stade 17 par la formation de tube cardiaque contractile (adapté de Monier et al., 2005).

## B. Formation du cœur adulte

Comme décrit précédemment, le tube cardiaque est divisé en « cœur proprement dit » et en « aorte » situé antérieurement (Figure 14). Dans l'embryon en développement, la détermination de la polarité antéro-postérieure du vaisseau dorsal est contrôlée par les gènes homéotiques (*HOX*) du complexe *Bithorax* et du complexe *Antennapedia* (Monier et al., 2005) (Figure 14).

*Ultrabithorax (Ubx)* est exprimé dans différentes parties de l'aorte et détermine l'identité des cardioblastes de l'aorte, tandis que *abdominal A (abdA)* est exprimé dans les segments cardiaques A5 à A7 et est nécessaire et suffisant pour la spécification et la différenciation du cœur (Perrin et al., 2004; Ryan et al., 2005). L'expression d'*abdominal B (abdB)* est en corrélation avec l'extrémité postérieure du cœur. Des expériences de gain de fonction et de perte de fonction des gènes *Hox* ont démontré que l'expression spécifique des gènes *Hox* le long du tube cardiaque était nécessaire à sa polarité antéro-postérieure et à la bonne différenciation des cardiomyocytes (Perrin et al., 2004; Ryan et al., 2005).

Le cœur larvaire de la *Drosophile* subit de profondes transformations morphologiques pendant la métamorphose induisant la reprogrammation de cardiomyocytes larvaires différenciés et fonctionnels, sans prolifération cellulaire. Le remodelage cardiaque implique la régulation de l'expression et de la fonction des gènes *Hox* piloté par l'ecdysone, une hormone stéroïde (Monier et al., 2005). L'ecdysone module l'activité d'*Ubx* dans les cellules exprimant *Svp* et favorise le développement des ostioles adultes. La modulation de l'expression d'*Ubx* induit le remodelage des myocytes de l'aorte larvaire en un cœur adulte fonctionnel tandis que *abdA* intervient dans la transformation des myocytes cardiaques contractiles larvaires en chambre terminale adulte (Monier et al., 2005).

Le cœur adulte est remodelé à partir du vaisseau dorsal larvaire de la manière suivante :

- 1) L'aorte larvaire (segments A1 à A4) subit un remodelage complet permettant aux cardiomyocytes larvaires d'engager un nouveau programme de différenciation pour former un cœur adulte avec une formation d'une chambre conique au niveau des segments A1 et A2. En même temps, le cœur larvaire (segments abdominaux A5-A7) est éliminé par la mort cellulaire programmée (apoptose).
- 2) En A1-A4, les cardioblastes exprimant *Tin* acquièrent une activité contractile. Les ostioles larvaires sont détruites et *Ubx* transforme les cellules *Svp*-positives de l'aorte larvaire en

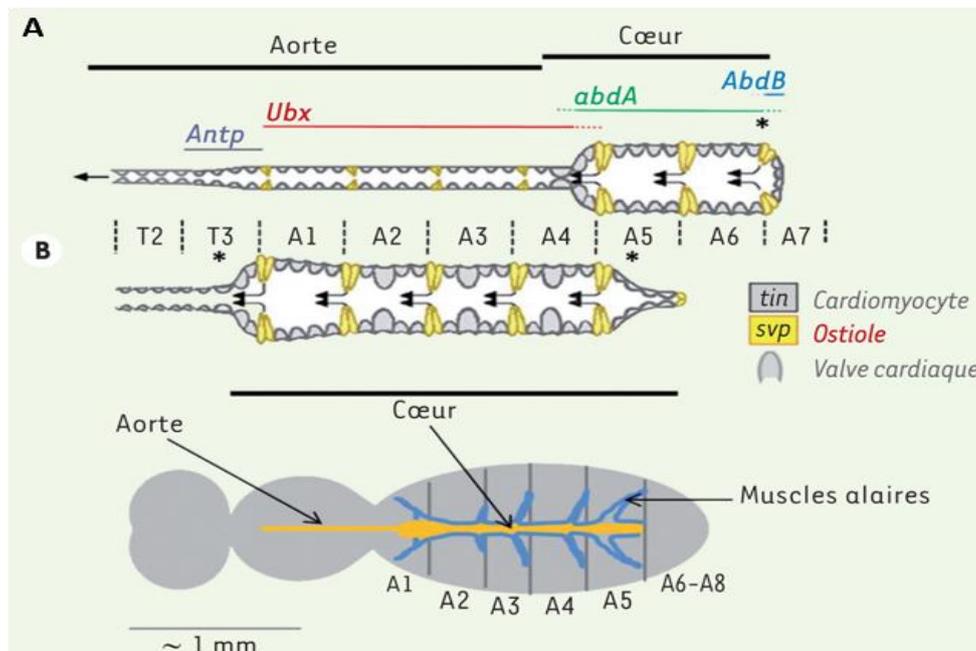
ostioles fonctionnels, et à la fin on aura quatre paires d'ostioles situés dans l'abdomen adulte (Lovato et al., 2002; Monier et al., 2005; Shah et al., 2011).

3) Trois paires antérieures de muscles alaires se trans-différencient en un réseau de fibres longitudinales, appelé muscle longitudinal ventral (VLM). Le VLM est formé sur la surface ventrale du cœur adulte et est séparé du cœur par une lame basale (Curtis et al., 1999; Frasch, 2016; Shah et al., 2011).

4) Trois paires de cellules de type valves sont formées dans les segments A2, A3 et A4 (Curtis et al., 1999; Frasch, 2016).

5) Les cardiomyocytes du segment A5 subissent un processus de trans-différenciation ; ils perdent leur activité contractile et acquièrent des innervations spécifiques pour former la chambre terminale (Monier et al., 2005).

6) Le nombre de cellules péricardiaques entourant le cœur adulte est finalement réduit, très probablement via la mort cellulaire programmée (Frasch, 2016).



**Figure 14 : Le cœur larvaire et adulte de la Drosophile.** Représentation schématique de la morphologie du tube cardiaque embryonnaire et larvaire de la Drosophile (B) avec la localisation des profils d'expression des gènes homéotiques (A) *Antp*, *Ubx*, *abdA* et *AbdB* au long de l'axe antéro-postérieur. Chaque segment adulte est composé de 4 paires de cellules cardiaques contractiles exprimant Tin (en gris) responsables de l'activité rythmique autonome du cœur, de deux paires d'ostioles exprimant Svp (en jaune) permettant l'entrée de l'hémolymphe dans la cavité cardiaque. Le segment A2,A3 et A4 présentent en plus 2 paires de valves (Perrin and Röder, 2016).

#### 4. Cardiogenèse chez les vertébrés

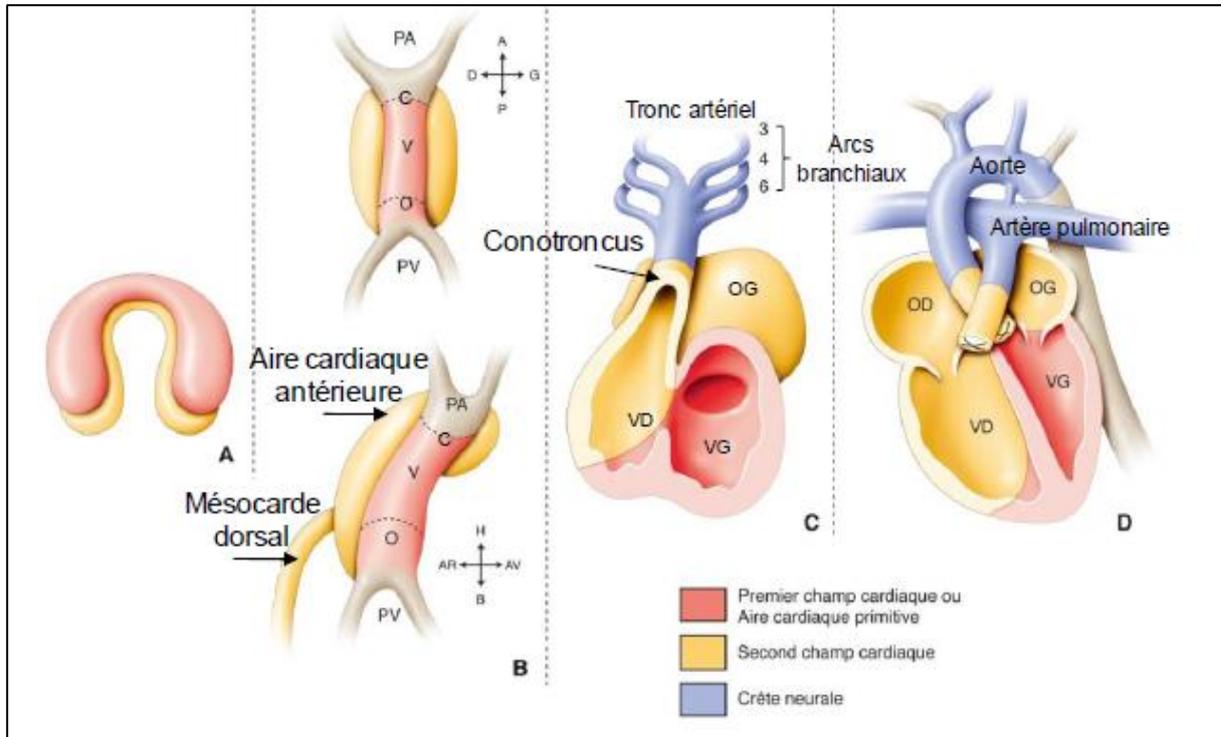
Chez les vertébrés, le cœur est le premier organe fonctionnel formé durant le développement embryonnaire (Bulatovic et al., 2016). C'est un muscle strié reposant sur le diaphragme, dérivé de la partie antérieure du mésoderme de la plaque latérale et initialement formé comme un simple vaisseau contractile appelé "tube cardiaque", puis transformé en suivant un ensemble d'évènement (allongement, formation d'une boucle et remodelage morphologique) en un organe complexe compartimenté en quatre chambres qui propulse le sang oxygéné à haute pression via les vaisseaux sanguins au reste du corps (Moorman et al., 2003).

La formation du cœur chez l'Homme est le résultat d'une morphogenèse très complexe dans le temps et l'espace qui commence au début du 15ème jour de vie intra-utérine par la formation du tube cardiaque primitif, qui commence ses premiers battements vers le 22ème jour, et se termine vers la 7ème semaine de vie intra-utérine où il aura acquis sa forme définitive avec ses quatre cavités (2 oreillettes et 2 ventricules).

La morphogenèse cardiaque se déroule en quatre étapes : (1) Détermination et spécification des cardiomyocytes. (2) Formation du tube cardiaque. (3) Formation d'une boucle (loop) cardiaque et formation de chambres. (4) Formation de valves et du septum (Figure 15).

La première étape a lieu lors de la gastrulation. Elle commence par la spécification des cellules progénitrices cardiaques dans le mésoderme splanchnique antérieur qui est adjacent à l'endoderme et au sac vitellin. Le destin des précurseurs mésodermiques en cellules progénitrices cardiaques implique l'activation des voies de signalisation induite de l'endoderme et de l'ectoderme adjacents, y compris les voies Wg, FGF et TGF- $\beta$  (Bulatovic et al., 2016).

Après spécification, les cellules progénitrices cardiaques migrent vers la partie encéphalique de l'embryon et se rejoignent à l'avant de la plaque neurale pour développer des champs cardiaques spécifiques sous forme de croissant appelé la plaque cardiogénique en forme de fer à cheval. Les champs cardiaques bilatéraux de la plaque cardiogénique commencent alors à exprimer spécifiquement des marqueurs cardiaques comme *Nkx2.5* et *Isl1*. Les deux parties du croissant cardiaque s'invaginent puis fusionnent pour former les tubes cardiaques primitifs, repoussés en position thoracique de l'embryon.



**Figure 15 : Etapes du développement du cœur primitif pour donner le cœur à quatre cavités chez l'Homme.** A) 15 jours de vie intra-utérine : formation de croissant cardiaque composé du premier et du second champ cardiaque. B) 21 jours de vie intra-utérine : formation du tube cardiaque primitif composé de cinq compartiments PA (pôle artériel ou troncus), C (conus ou bulbe artériel), V (ventricule), O (oreillette) et PV (pôle veineux), et migration des cellules du second champ cardiaque vers les extrémités craniale et caudale du tube pour former le ventricule droit, le conotruncus et les oreillettes. C) 28 jours de vie intra-utérine : formation de la boucle à convexité droite (D-loop) avec les ventricules en avant et les oreillettes en arrière. D) 50 jours de vie intra-utérine : fin de la septation, et formation du cœur définitif compartimenté en quatre chambres cardiaques OD (oreillette droite), OG (oreillette gauche), VD (ventricule droit) et VG (ventricule gauche). A (antérieur), B (bas), D (droite), G (gauche), H (haut), P (postérieur) (adapté du site internet : [hebee.fr/fr/embryologie-avec-le-dr-lucile-houyel.php](http://hebee.fr/fr/embryologie-avec-le-dr-lucile-houyel.php)).

A partir du 22<sup>ème</sup> jour de vie intra-utérine les tubes cardiaques primitifs formés à partir de la plaque cardiogénique vont se rapprocher et fusionner formant ainsi le tube cardiaque primitif composé de cinq compartiments : le pôle artériel ou troncus, le conus ou bulbe artériel, le ventricule primitif, l'oreillette primitive et le pôle veineux (Figure 15). À ce moment, vers le 22<sup>ème</sup> jour embryonnaire chez l'Homme, le tube cardiaque primitif commence à se contracter et à pomper le sang, entraîné par l'activité du stimulateur cardiaque dans le pôle veineux (Bulatovic et al., 2016; Moorman et al., 2003).

Durant le 23<sup>ème</sup> jour de vie intra-utérine, le tube cardiaque rectiligne et symétrique s'infléchit selon une courbe à convexité droite pour former une structure asymétrique appelée boucle à convexité « D looping ». Cette étape est caractérisée par une expansion et un allongement rapide suivi d'un processus de pliage et de torsion. L'élongation commence par une addition graduelle de cardiomyocytes nouvellement différenciés. Ces cellules proviennent du mésoderme splanchnique dorsal, prolifèrent rapidement, migrent et pénètrent dans le tube cardiaque. Cette population cellulaire est appelée « champ cardiaque antérieur » (AHF) ou « second champ cardiaque » (SHF) par opposition au « premier champ cardiaque » (FHF) à partir duquel le tube cardiaque initial a été formé.

Les cellules du premier champ cardiaque contribuent à la formation de la paroi ventriculaire gauche, à une partie du septum ventriculaire et à une partie des oreillettes, tandis que les cellules du second champ cardiaque forment principalement la voie d'éjection, une partie des oreillettes et contribuent également à la formation du ventricule droit.

Les cellules cardiaques se différencient en plusieurs lignées : les myocytes auriculaires, ventriculaires et de tissu de conduction ainsi que les cellules de l'endocarde. Cette différenciation est assurée par cinq facteurs de transcription hautement conservés entre les espèces : Nkx2.5, MEF2, GATA, Tbx et Hand (Tableau 3).

**Tableau 3 :** Liste des gènes conservés dans la cardiogénèse entre la *Drosophile* et les vertébrés

<b>Drosophile</b>	<b>Vertébrés</b>
<b>Molécules de signale</b>	
Dpp	BMP
Hh	Shh
Wg	Wnt
<b>Facteurs de transcription</b>	
Doc1/2/3	Tbx6/ Tbx2/3/5
dHand	Hand1/2
Lbe/ Lbl	Lbx1/2/3
pnr	Gata4/5/6
dmef2	Mef2
Tin	Nkx2-5
Tup	Isl1
Zfh1	S1P1
Svp-up	COUP-TF II
<b>Genès de différenciation</b>	
Sur	Sur1/2

Après la formation de la boucle cardiaque, le tube cardiaque primitif subit une division en quatre chambres bien définies : oreillette droite, oreillette gauche, ventricule droit et ventricule gauche. Ceci est suivi d'une séptation et d'un remodelage du cœur, qui devient connecté à des circulations systémiques et pulmonaires cloisonnées (Lamers and Moorman, 2002).

### 5. Conservation des mécanismes de cardiogénèse entre *Drosophile* et vertébrés

Bien que la structure cardiaque chez la *Drosophile* soit différente de celle de l'Homme/vertébrés, les voies de régulation et de signalisation pour le développement cardiaque, la fonction et le vieillissement sont hautement conservés entre les deux espèces (Bodmer, 1995). En effet, plusieurs facteurs nécessaires au développement cardiaque chez l'Homme possèdent un orthologue assurant la même fonction chez la *Drosophile* (Tableau 3).

## A. Conservation de la structure et de la fonction cardiaque

Chez les vertébrés, le cœur est localisé en position ventrale cependant, chez la *Drosophile*, le tube cardiaque est positionné en position dorsale, mais ceci reflète l'inversion complète du corps des insectes par rapport à celui des vertébrés (Bodmer, 1995).

Fonctionnellement, le cœur des vertébrés fait partie d'un système circulatoire fermé. En pompant le sang riche en nutriments et aussi de l'oxygène vers tous les organes. Ces échanges sont assurés via les vaisseaux et les capillaires. En revanche, le cœur de la *Drosophile* pompe l'hémolymphe dans un système circulatoire ouvert. L'hémolymphe est envoyé dans tout le corps et baigne les organes. Contrairement aux vertébrés, l'hémolymphe est nécessaire au transport des nutriments mais pas de l'oxygène ce qui fait que le cœur est un organe vitale chez les vertébrés mais il n'est pas indispensable à la survie de la *Drosophile* car l'apport de l'oxygène se fait via les trachées (Bodmer, 1995; Bodmer and Venkatesh, 1998; Rotstein and Paululat, 2016). Cela représente un avantage majeur dans l'étude de mutations affectant le cœur qui sont létales chez l'Homme et les autres modèles animaux de vertébrés et souvent viables chez la *Drosophile*.

Le cœur adulte des mammifères est composé de quatre chambres (deux ventricules et deux oreillettes) avec de nombreux types de cellules spécialisées (les cardiomyocytes contractiles, les cellules pacemaker), et il est relié à un système circulatoire. Cependant, le tube cardiaque de la *Drosophile* est également compartimenté mais de manière différente. En fait nous distinguons trois paires de cellules appelées « valves » qui séparent cette structure linéaire en quatre chambres /segments. Ainsi, le tube cardiaque est composé d'un seul type de cellules « les cardiomyocytes contractiles » flanquées par des cellules péricardiaques. Les cardiomyocytes de la *Drosophile* présentent une similarité à celles des vertébrés. En fait, dans les deux cas, ce sont des cellules striées, ne possédant qu'un seul noyau et possédant une activité contractile autonome. D'un point de vue fonctionnel, chez l'Homme et la *Drosophile*, les cellules pacemaker induisent la génération des battements cardiaques et chaque cycle cardiaque est composé d'une contraction (systole) et une relaxation/ dilatation (diastole).

Enfin, comme chez l'Homme, les performances cardiaques sont affaiblies avec l'âge de la mouche avec une fréquence cardiaque plus faible et une fibrillation accrue (Fleg et al., 1995; Paternostro et al., 2001), ce qui fait de la *Drosophile* un organisme modèle intéressant pour étudier les bases physiologiques, génétiques et épigénétiques du vieillissement cardiaque (Blice-Baum et al., 2019; Souidi and Jagla, 2021).

## **B. Conservation des voies de signalisation impliquées dans le développement cardiaques**

Malgré des différences morphologiques évidentes, il existe de nombreuses similitudes entre le tube cardiaque de la Drosophile et le cœur des vertébrés. Sur le plan du développement, la Drosophile et les vertébrés ont des progéniteurs cardiaques d'origine similaire. Dans les deux cas, les précurseurs cardiaques sont dérivés des rangées bilatérales de cellules mésodermiques qui migrent vers la ligne médiane et fusionnent pour former un tube cardiaque primitif. Ce tube cardiaque simple acquiert une polarité antéro-postérieure et pompe l'hémolymphe chez la Drosophile et le sang chez les vertébrés de la partie inférieure/postérieure à la partie supérieure/antérieure (Bodmer, 1995; Bodmer and Venkatesh, 1998), mais contrairement au cœur des vertébrés qui forme une boucle, le tube cardiaque de la Drosophile reste un simple tube linéaire.

Chez la Drosophile et les vertébrés, la formation de la voie d'éjection cardiaque nécessite des cellules provenant du mésoderme pharyngé. Ce sont les progéniteurs de deux muscles d'éjection cardiaque dans le cœur de la mouche (Zikova et al., 2003; Zmojdzian et al., 2008) et les cellules du second champ cardiaque chez les vertébrés.

Remarquablement, la spécification du mésoderme cardiaque dans les deux systèmes nécessite les mêmes signaux inductibles Dpp/TGF- $\beta$  et Wg/Wnt secrétés par la couche ectodermique chez la mouche et endodermique chez les vertébrés. Dpp et Wg activent des facteurs clés impliqués dans le développement cardiaque qui sont conservés entre l'Homme et la Drosophile tels que Tin/Nkx2.5, Dmef2/Mef2C, Panier (Pnr)/GATA et dHand/HAND ce qui implique des voies de signalisation similaires (Tableau 3).

En raison de la complexité de la morphologie et de la physiologie du cœur des vertébrés, la comparaison de la cardiogenèse entre la Drosophile et les vertébrés est limitée à la détermination des précurseurs cardiaques, la différenciation des cellules cardiaques et aux événements initiaux de la formation du tube cardiaque.

Je décrirais dans le paragraphe suivant quelques exemples des facteurs de transcription et des voies de signalisation impliqués dans la cardiogenèse et qui sont conservés entre la Drosophile et les vertébrés.

## i. Conservation des facteurs de transcription

### • Tinman

Tin est un facteur de transcription à homéodomaine. Aux stades précoces du développement, *Tin* est exprimé d'une manière uniforme dans le mésoderme présumé. Après la gastrulation son expression est limitée à la partie dorsale du mésoderme et plus tard au cours du développement il s'exprime d'une manière transitoire dans le mésoderme viscéral et de manière permanente dans le cœur (dans les cardioblastes et les cellules péricardiaques) (Bodmer, 1995; Bodmer and Venkatesh, 1998). Les embryons de *Drosophila* mutants pour *Tin* présentent une absence de mésoderme viscéral et cardiaque ainsi que des défauts dans le développement de mésoderme somatique. La formation de cellules cardiaques et de mésoderme viscéral est partiellement restaurée par l'expression de *Tin* de manière ubiquitaire dans les embryons mutants (Bodmer, 1995, 1993).

En parallèle, *Nkx2-5*, orthologue de *Tin* chez les mammifères est initialement exprimé dans les progéniteurs cardiaques et dans une partie de l'endoderme pharyngé (Bodmer, 1995, 1993). Les souris mutantes pour *Nkx2-5*, présentent une absence de l'expression du gène *2V* de la chaîne légère de la myosine spécifique au ventricule *MLC2V* qui est un marqueur de la différenciation de ventricule. Ainsi qu'une difficulté de tube cardiaque à former une boucle lors de la cardiogenèse (Lyons et al., 1995). Cela suggère que *Tin/Nkx2-5* est nécessaire pour la différenciation cardiaque chez la mouche et chez les mammifères.

### • Mef2

Chez la *Drosophila*, un seul gène *mef2* semble exister : *Dmef2*. Il est exprimé dans les précurseurs des lignées myogéniques et leurs descendants (Bodmer and Venkatesh, 1998). Les embryons mutants pour *Dmef2* présentent des défauts de la différenciation des cellules musculaires somatiques, cardiaques et viscérales (Lilly et al., 1995). Chez la souris il existe quatre gènes *MEF2* qui sont tous exprimés dans les précurseurs des lignées de muscle cardiaque, squelettique et lisse. Les souris mutantes pour *MEF2C* présentent des défauts dans la formation de la boucle cardiaque (Bodmer and Venkatesh, 1998).

- **HAND**

Le facteur *dHand*, est exprimé chez la Drosophile au niveau du cœur, les ganglions lymphatiques, la musculature viscérale circulaire et un sous-ensemble de cellules du système nerveux centrale. L'inactivation de *dHand* chez l'embryon induit l'absence de ganglions lymphatiques, mais chez l'adulte cela provoque une structure myofibrillaire désorganisée, un diamètre systolique et diastolique réduit, des contractions cardiaques anormales, un intestin moyen fortement déformé et une létalité prématurée (Lo et al., 2007). Chez les mammifères, il existe plusieurs membres de la famille Hand, dont *Hand2/3* qui sont exprimés dans les dérivés de la crête neurale cardiaque (Firulli et al., 1998). Les mutants de *Hand2/3* présentent des défauts de l'aorte ainsi que des anomalies de la formation de la boucle cardiaque (Firulli et al., 1998).

## ii. Conservation des voies de signalisation

- **Wg et Dpp**

Comme décrit précédant, la spécification de mésoderme cardiaque est induite par Wg et Dpp secrétés par l'ectoderme. Wg est exprimé dans l'ectoderme adjacent au mésoderme cardiaque (Lawrence et al., 1996) et sa mutation induit la perte de l'expression en cluster de cellules even-skipped au niveau du mésoderme (Lawrence et al., 1996) ainsi qu'une perte de précurseurs cardiaques (Wu et al., 1995). Chez les vertébrés, il existe plusieurs membres de la famille WNT tous impliqués dans plusieurs processus biologiques y compris la prolifération, la différenciation, la migration cellulaire et la polarité cellulaire. Parmi lesquels nous retrouvons *Wnt5a* et *Wnt11* exprimés dans le second champ cardiaque (Tian et al., 2010). L'inhibition de la voie de signalisation WNT chez l'embryon de souris induit des défauts de développement du ventricule droit (Ai et al., 2007).

Dpp est un facteur de la superfamille TGF $\beta$ , sécrété par l'ectoderme dorsal et impliqué dans l'activation de l'expression de *Tin* dans le mésoderme dorsale. Les mouches mutantes pour *Dpp* présentent une absence du cœur et de mésoderme viscéral (Bodmer and Venkatesh, 1998). Chez les vertébrés, *BMP2*, *BMP4* et *BMP7*, orthologues de *Dpp*, sont exprimés dans l'endoderme et l'ectoderme et dont la mutation induit des défauts de développement cardiaque et une perte de l'expression de *Nkx2-5* (Shi et al., 2000).

Ce chapitre a permis de décrire l'ensemble des modèles de Drosophile DM1 qui ont été générés pour disséquer la pathogénicité de la DM1. Nous avons vu également le

développement cardiaque chez la Drosophile et chez les vertébrés/ Homme en mettant en avant la conservation des gènes et des voies de signalisation contrôlant la cardiogenèse ainsi que la structure et la fonction cardiaque entre la Drosophile et l'Homme. La reproduction des phénotypes cardiaques de la DM1 chez la mouche fait de la Drosophile un modèle attractif pour étudier les dérégulations génétiques associées aux défauts cardiaques observés chez les patients DM1.

# Objectifs du travail

Les complications cardiaques sont la seconde cause de décès dans la dystrophie myotonique de type 1 (DM1). Cette maladie autosomique dominante est due à une expansion de triplets CTG dans la région 3' non traduite du gène *DMPK* mettant en jeu un mécanisme de « gain de fonction » de l'ARN toxique. La pathogénicité de la DM1 est complexe impliquant la dérégulation de plusieurs facteurs nécessaires au bon fonctionnement de la cellule musculaire et cardiaque. Nous avons vu dans l'introduction les principales dérégulations affectées par les répétitions CUG toxiques. Après plusieurs années d'études sur la DM1, les défauts d'épissage alternatif restent le mécanisme le plus étudié pour expliquer les phénotypes cardiaques et musculaires observés chez les patients DM1, cependant cette dérégulation n'explique pas l'ensemble des symptômes DM1 et en particulier les symptômes cardiaques.

Lors de mon arrivée au laboratoire en 2018, le transcriptome cardiaque de modèle de Drosophile DM1 étaient établis puis analysé par Emilie Plantié. Cette étude transcriptomique a été réalisée sur des ARNs extraits spécifiquement des cellules cardiaques de trois modèles de Drosophile DM1 : une lignée *UAS-960CTG* générée dans notre équipe par Lucie Picchio, une lignée gain de fonction *UAS-Bru3* qui mime la stabilisation de CELF1 et une lignée atténuée pour *mbl* par un ARN interférence (*UAS-mblRNAi*) qui mime la séquestration de MBNL1. Après séquençage, les gènes différentiellement exprimés ont été identifiés chez les mouches DM1 jeunes adultes âgées d'une semaine et les mouches âgées de 5 semaines, puis soumis à une large analyse bio-informatique. Cette analyse effectuée dans notre laboratoire a révélé une présence de sites de fixation potentiels de *mbl* et de *Bru3* dans les régions 3'UTR de plusieurs gènes dérégulés étant en appui de résultats de ChIPseq chez l'Homme où CELF1 et MBNL1 ont été retrouvés fixés préférentiellement sur les régions 3'UTR de leurs transcrits cibles par rapport aux autres régions géniques (Masuda et al., 2012). En parallèle, les acteurs majeurs de régulation de l'expression de gènes via les régions 3'UTR, les miARN, ont été trouvés fortement dérégulés chez les patients et les modèles animaux DM1. L'ensemble de ces observations suggère, qu'en plus de l'épissage, la dérégulation de la stabilité des transcrits et/ou de leur traduction via 3'UTR pourrait être impliquée dans la pathogenèse de la DM1.

Mon projet de thèse a eu pour objectif d'étudier l'impact de la dérégulation génique via 3'UTR dans la DM1 en se focalisant sur *miR-1*, un miARN à expression musculaire et cardiaque, conservé entre la Drosophile et l'Homme. J'ai utilisé des modèles de Drosophile DM1 créés au laboratoire pour relier la dérégulation de *miR-1* avec les phénotypes DM1 en se

focalisant sur les symptômes cardiaques. J'ai également analysé les données transcriptomiques de nos modèles DM1 pour identifier les cibles potentielles de *miR-1* et parmi ces cibles j'ai identifié la *Multiplexin* comme cible directe de miR-1 dérégulée dans la DM1.

# Résultats et discussion

## I. La dérégulation de *miR-1* et de sa cible *Multiplexin* favorise la cardiomyopathie dilatée associée à la dystrophie myotonique de type 1

Dans cette première partie de ma thèse, je me suis intéressée à l'étude de l'implication de la dérégulation de *miR-1* et de sa cible potentielle *Mp* dans la cardiomyopathie dilatée associée à la DM1.

D'abord, j'ai choisi d'étudier *miR-1* car il présente un miARN clé dans la régulation des gènes impliqués dans la cardiogenèse au cours de développement. *miR-1* est un miARN hautement conservé au cours de l'évolution. Sa forme mature est composée de 21 nucléotides et sa maturation ainsi que son transport vers le cytoplasme sont extrêmement rapides (Sokol and Ambros, 2005). Il est spécifiquement exprimé dans le cœur et le muscle squelettique chez la souris et l'Homme où il joue un rôle important dans la cardiogenèse en régulant le pool de cardiomyocytes ventriculaires en prolifération et l'expansion ventriculaire (Zhao et al., 2005).

Chez tous les vertébrés, il existe deux *miR-1*, *miR-1-1* et *miR-1-2*, qui sont regroupés en clusters avec *miR-133a2* et *miR-133a1*. Les clusters *miR-1-1/miR-133a-2* et *miR-1-2/miR-133a-1* sont situés sur le chromosome 2 et sur le chromosome 18, respectivement (Wei et al., 2014). Les formes matures de *miR-1-1* et *miR-1-2* sont identiques. À l'aide d'amorces détectant spécifiquement les précurseurs de *miR-1-1* et *miR-1-2*, il a été démontré que l'expression de *miR-1-1* et *miR-1-2* augmente au cours du développement du cœur, atteignant des niveaux maximaux en période périnatale ce qui implique leur rôle critique chez les nouveau-nés (Wei et al., 2014).

Chez la souris, *miR-1* est régulé négativement et directement par *Nkx2-5*, orthologue de *Tinman* chez la Drosophile, au niveau des cardiomyocytes (Qian et al., 2011), et *miR-1* à son tour réprime le gène *Cdc42* (*Cell division control protein 42 homolog*), qui est un régulateur de divers fonctions cellulaires, y compris la morphologie et la migration cellulaire. Cette synergie de régulation entre *Cdc42* et *Nkx2-5/Tinman* passant par l'intermédiaire de *miR-1* est nécessaire pour assurer la morphogénèse et la fonction cardiaque chez les mammifères et aussi chez la Drosophile (Qian et al., 2011). Chez la souris ainsi que chez la Drosophile, la perte de *Cdc42* dans le cœur entraîne des anomalies de la morphogénèse cardiaque (Qian et al., 2011). Une étude menée sur un modèle de souris mutantes pour *miR-1* a montré que les souris mutantes doubles *miR-1 dKO* (*miR-1-1*<sup>-/-</sup> ; *miR-1-2*<sup>-/-</sup>) sont viables à la naissance et avec une taille normale, comparable à celle du contrôle. Vers l'âge de 12 jours postnatal

(P12), les souris mutantes deviennent significativement plus petites, s'affaiblissent et meurent avant P17. Cette létalité est induite principalement par un dysfonctionnement cardiaque sévère due à une cardiomyopathie dilatée et cela est concomitant avec une augmentation du nombre de cardiomyocytes et une surexpression des gènes cibles de *miR-1* (Wei et al., 2014).

Le *miR-1* de Drosophile « *dmiR-1* » est presque identique en séquence au *miR-1* de la souris et de l'Homme. Le *dmiR-1* est exprimé aux stades précoces de développement (2.2–2.8 h) au niveau du mésoderme embryonnaire précoce et ensuite dans les muscles somatiques, viscérales et les muscles pharyngés, et le cœur. Les transcrits de *dmiR-1* persistent dans les stades ultérieurs de différenciation musculaire, cardiaque et somatique. La perte de fonction de *dmiR-1* est létale chez la Drosophile suite au blocage de développement musculaire chez la larve. Ce phénotype est restauré par la réexpression de *dmiR-1* (Kwon et al., 2005; Sokol and Ambros, 2005). Cependant, la perte d'une seule copie de *dmiR1* provoque un développement cardiaque et musculaire anormal (Kwon et al., 2005) visible à partir de deuxième stade larvaire. Au niveau du cœur, *dmiR-1* régule l'expression du gène *Kay* qui est nécessaire pour la formation normale de vaisseau dorsale et pour la polarité cellulaire des cardioblastes (King et al., 2011). *dmiR-1* réprime aussi l'expression cardiaque du gène *Nedd4* qui code pour une ubiquitine ligase impliquée dans la régulation de la voie Notch. Cette régulation assure la différenciation de cardiomyocytes et la morphogenèse cardiaque chez l'embryon de la Drosophile et elle est conservée chez les mammifères (Zhu et al., 2017).

En plus de sa dérégulation dans les biopsies cardiaques des patients DM1 (Rau et al., 2011), et dans le modèle de Drosophile DM1 exprimant 480 CTG (Fernandez-Costa et al., 2013), *miR-1* est retrouvé également faiblement exprimé dans les biopsies cardiaques provenant des patients avec une cardiomyopathie dilatée en phase terminale (Ikeda et al., 2007) ainsi que dans le cœur d'un modèle de souris mutantes pour phospholambam qui développent la cardiomyopathie dilatée (Isserlin et al., 2014).

Dans un premier temps, j'ai étudié la fonction de *dmiR-1* dans la structure du cœur adulte, et dans la régulation du rythme et la contractilité cardiaque. Pour cela j'ai analysé la physiologie cardiaque dans le contexte perte de fonction de *dmiR-1* en utilisant une lignée *dmiR-1* double-sponge qui permet la synthèse des séquences complémentaires à la séquence de *dmiR-1*. Le croisement de la lignée *UAS-dmiR-1 sponge* avec la lignée pilote *Hand-GAL4* permet l'expression des séquences « sponge » spécifiquement dans le cœur (dès le stade embryonnaire et pendant toute la vie de la mouche) ou elles vont s'hybrider au *dmiR-1* par

complémentarité, empêchant ainsi sa fonction, ce qui va mimer le contexte de diminution de *miR1* observé dans la DM1. Nous avons observé que la diminution de l'expression de *dmiR-1* mature spécifiquement au niveau cardiaque cause une cardiomyopathie dilatée, un phénotype déjà observé dans le modèle *Hand>mblARNi* et *Hand>Bru3*. Ensuite nous avons analysé le niveau d'expression de *dmiR-1* dans le tissu cardiaque de modèle de Drosophile DM1 en utilisant LNA-FISH et nous avons trouvé que son expression est significativement diminuée au niveau des cardioblastes et des cellules péricardiaques.

Afin d'identifier les gènes cibles de *dmiR-1* associés à la cardiomyopathie dilatée observée dans la DM1, une analyse *in silico* a été réalisée et a identifié le gène *Multiplexin (Mp)* comme cible potentielle de *dmiR-1*.

Chez les vertébrés *Multiplexin (multiple triple-helix domains and interruptions)* fait partie d'une famille distincte de collagènes à laquelle appartiennent le Collagène XV et Collagène XVIII (Meyer et al., 2009). Mp est une protéine multi-domaines qui possède les mêmes caractéristiques fonctionnelles que les deux types de collagène (XV/ XVIII) (Meyer and Moussian, 2009).

Chez l'Homme, le Collagène XV est principalement exprimé dans les zones de la membrane basale des microvaisseaux et des myocytes du muscle cardiaque et squelettique et le Collagène XVIII est exprimé dans les reins et la rétine.

La mutation dans le collagène humain de type XVIII est associée au syndrome de Knobloch 1 (KNO1), caractérisé par une myopie, une cataracte, des anomalies de la rétine, avec encéphalocèle occipitale (Sertié et al., 2000), défauts également observés chez les souris mutantes *Col18a1*<sup>-/-</sup> (*collagène XVIII*<sup>-/-</sup>) (Ylikärppä et al., 2003). Cependant, chez les souris *Col15a1*<sup>-/-</sup> (*collagène XV*) le développement du système vasculaire est normal, mais une dégénérescence des cellules endothéliales dans le cœur et le muscle squelettique apparaissent à partir de trois mois d'âge et s'aggravent à l'âge adulte avec une apparition des altérations des fibres musculaires (dégénérescence, changement de la taille) et l'apparition des défauts de la structure et de la fonction cardiaque. En plus, les mutants *Col15a1*<sup>-/-</sup> sont plus vulnérables que les contrôles aux blessures musculaires induites par les exercices physiques. Donc, le collagène de type XV semble fonctionner comme un composant structural nécessaire pour stabiliser les cellules musculaires squelettiques et les microvaisseaux, car sa déficience est associée à des altérations de la paroi capillaire dans le cœur et le muscle squelettique, entraînant divers degrés de rétrécissement ou d'obstruction de la lumière capillaire (Eklund et

al., 2001; Rasi Karolina et al., 2010). En fin, les souris doubles mutantes *Coll5a1*<sup>-/-</sup> ; *Coll8a1*<sup>-/-</sup> (*XV*<sup>-/-</sup> ; *XVIII*<sup>-/-</sup>) ne présentent pas des anomalies supplémentaires en comparaison avec les simples mutantes, confirmant que les deux collagènes XV et XVIII assurent deux fonctions indépendantes (Ylikärppä et al., 2003).

Chez la Drosophile, *Mp*, un seul membre de la famille Multiplexin, est fortement exprimé dans le cœur embryonnaire, dans l'intestin moyen antérieur et postérieur, dans le système nerveux périphérique (PNS) et dans certaines cellules encore non identifiées au sein du cordon nerveux ventral (VNC) (Meyer and Moussian, 2009). Au stade embryonnaire 14, *Mp* est apparu à la fois dans le système nerveux central et périphérique (CNS et PNS) (Momota et al., 2011).

Pendant la cardiogenèse, l'expression de la protéine *Mp* est restreinte aux cardioblastes du cœur propre (partie postérieure de tube cardiaque), ou elle interagit avec les protéines Slit et Robo pour la formation de la lumière de tube cardiaque. Les embryons mutants pour *Mp* présentent des diamètres cardiaques plus petits que le contrôle, contrairement aux embryons avec une surexpression de *Mp* où le diamètre cardiaque est significativement plus grand. Il a été également démontré que la surexpression de *Mp* dans l'aorte des embryons est suffisante pour augmenter sa taille pour avoir le même diamètre que le cœur propre (Harpaz et al., 2013). Il a été également proposé que dans le muscle cardiaque et squelettique *Mp* joue un rôle important dans le maintien de la membrane basale et de la structure mitochondriale (Momota et al., 2013).

En se basant sur ces données de la littérature, nous avons supposé une implication probable de *Mp* dans la cardiomyopathie dilatée observée dans la DM1. D'abord, nous avons testé si l'expression de *Mp* est affectée dans le contexte DM1. Nos résultats d'immunomarquage montrent une augmentation significative des niveaux de la protéine *Mp* dans les lignées DM1 (*Hand*>*mblARNi* et *Hand*>*Bru3*). Ensuite, nous avons testé l'impact de la surexpression de *Mp* sur la structure et la physiologie du cœur en utilisant la lignée *UAS-3HNC1* (Meyer and Moussian, 2009). Nous avons observé que la surexpression de *Mp* induit une cardiomyopathie dilatée.

Pour tester si l'augmentation des niveaux de *Mp* cause la cardiomyopathie dilatée observée chez les mouches DM1, nous avons atténué l'expression de *Mp* par ARN interférence dans la lignée DM1 (*Hand*>*Bru3*) et nous avons observé une restauration significative du phénotype cardiaque chez les mouches DM1 âgées. Enfin, en collaboration avec Dr Masayuki Nakamori

de l'Université d'Osaka nous avons pu tester l'expression de l'orthologue humain de Mp dans les échantillons cardiaques des patients DM1. En fait, le niveau de Collagène XV était significativement élevé dans tous les cœurs des patients DM1 en comparaison avec le niveau de Collagène XV dans le cœur de personnes saines. Remarquablement, l'augmentation de Collagène XV était plus importante dans les échantillons cardiaques des patients DM1 qui souffrent d'une cardiomyopathie dilatée en comparaison avec les échantillons provenant des patients DM1 sans cardiomyopathie dilatée.

Enfin, nous avons validé la régulation directe de *Mp* par *dmiR-1* *in vivo* en utilisant des lignées rapportrices transgéniques de *Drosophile*.

Les résultats de cette partie de ma thèse sont regroupés dans une publication intitulée « *Deregulations of miR-1 and its target Multiplexin promote dilated cardiomyopathy associated with myotonic dystrophy type1* » soumise à publication.

## 1. Article : Deregulations of *miR-1* and its target *Multiplexin* promote dilated cardiomyopathy associated with myotonic dystrophy type 1

Anissa Souidi<sup>1</sup>, Masayuki Nakamori<sup>2</sup>, Monika Zmojdzian<sup>1</sup>, Teresa Jagla<sup>1</sup>, Yoan Renaud<sup>1</sup> and Krzysztof Jagla<sup>1</sup>

<sup>1</sup> iGReD Genetics Reproduction and Development Institute, Clermont Auvergne University, France

<sup>2</sup> Department of Neurology, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita 565-0871, Osaka, Japan

### Abstract

Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is the most common muscular dystrophy in adults. It is caused by the excessive expansion of non-coding CTG repeat, which when transcribed affect functions of RNA-binding factors. Specifically, MBNL1 is sequestered in nuclear foci while CELF1 is stabilised, with adverse effects on alternative splicing, processing and stability of a large set of muscular and cardiac transcripts. Among these effects, inefficient processing and down-regulation of muscle- and heart-specific miRNA, *miR-1*, has been reported in DM1 patients, but the impact of reduced *miR-1* on DM1 pathogenesis was unknown. Here, we used *Drosophila* DM1 models to explore *miR-1* involvement in cardiac dysfunction in DM1. We found that *miR-1* down-regulation in the heart led to dilated cardiomyopathy (DCM), a DM1-associated phenotype. We then combined *in silico* screening for *miR-1* targets with transcriptional profiling of DM1 cardiac cells to identify *miR-1* target genes with potential roles in DCM. We identified *Multiplexin* (*Mp*) as a new cardiac *miR-1* target involved in DM1. *Mp* encodes collagen protein involved in cardiac tube formation in *Drosophila*. *Mp* and its human ortholog *Col15A1* were both highly enriched in cardiac cells of DCM-developing DM1 flies and in heart samples from DM1 patients with DCM, respectively. Importantly, when overexpressed in the heart, *Mp* induced DCM, whereas its attenuation rescues the DCM phenotype in aged DM1 flies. Reduced levels of *miR-1* and consecutive up-regulation of its target *Mp/Col15A1* are thus critical in DM1-associated DCM.

## Introduction

Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is the most common muscular dystrophy in adults, with an estimated incidence of one in 8000 births (Meola and Cardani, 2015). DM1 is a multisystem disorder, with cardiac abnormalities accounting for 30% of fatalities (Mathieu et al., 1999). Cardiac involvements in DM1 include conduction defects, supraventricular and ventricular arrhythmias (Pelargonio et al., 2002), impaired diastolic or systolic function (Hermans et al., 2012; Pelargonio et al., 2002) and dilated cardiomyopathy (DCM) (Hermans et al., 2012; Lin et al., 1989; Harold H. Nguyen et al., 1988; Papa et al., 2018; Schilling et al., 2013).

The primary cause of DM1 is gain-of-function of toxic transcripts carrying expanded non-coding CUG repeats that aggregate into foci in nuclei, sequestering RNA-binding protein Muscleblind-like 1 (MBNL1) (Fardaei et al., 2002, 2001). Reduced MBNL1 levels and concomitant stabilisation of another RNA-binding protein, Elav-like family member 1 (CELF1) (Kuyumcu-Martinez et al., 2007), lead to deregulation of alternative splicing with abnormal expression of embryonic splice variants in adult tissues (Lee and Cooper, 2009). For example, CELF1-dependent inclusion of fetal exon 5 in the adult isoform of *cardiac troponin T (cTnT)* has been associated with cardiac conduction defects in DM1 (Philips et al., 1998). Besides their roles as alternative splicing regulators, both MBNL1 and CELF1 are involved in mRNA translation (Dasgupta and Ladd, 2012; de Haro et al., 2013; Timchenko et al., 2006, 2005), de-adenylation and decay (Dasgupta and Ladd, 2012; Masuda et al., 2012; Vlasova et al., 2008), and in RNA editing (Dasgupta and Ladd, 2012). MBNL1 is specifically involved in miRNA processing (Rau et al., 2011). These diverse functions of MBNL1 and CELF1 mean that DM1 may involve deregulation of multiple pathways.

To investigate the pathophysiology and the molecular mechanisms underlying DM1, several DM1 models, both mouse (Huguet et al., 2012; Orengo et al., 2008; Wang et al., 2007) and *Drosophila* (de Haro et al., 2006; Garcia-Lopez et al., 2008; Houseley et al., 2005; Picchio et al., 2013), have been created.

Reduction of MBNL1 and stabilisation of CELF1 is thought to be involved in most DM1 phenotypes. Indeed, *Mbnl1* knockout mice develop muscle myotonia, weakness/wasting and cardiac defects including dilated cardiomyopathy and heart conduction block (Lee et al., 2013). Mice overexpressing *CELF1* in the heart show conduction abnormalities and dilated cardiomyopathy (Koshelev et al., 2010) thus confirming the contribution of MBNL1

sequestration and CELF1 upregulation to DM1 pathogenesis. Overall, the mouse models reproduced multiple DM1 features including RNA foci formation and various alternative splice defects.

We generated a series of inducible *Drosophila* DM1 lines bearing UAS-iCTG constructs with 240, 480, 600 and 960 CTGs (Picchio et al., 2013). These lines were used to model DM1 in larval somatic muscles showing not only nuclear foci formation and Mbl sequestration but also muscle hypercontraction, splitting of muscle fibres, reduced fibre size and myoblast fusion defects leading to impaired larva mobility (Picchio et al., 2013). The severity of phenotypes in these *Drosophila* models could be correlated with repeat size (Picchio et al., 2013), as also observed in DM1 patients. Finally, the overexpression of *Drosophila* *CELF1* ortholog *Bru-3* and attenuation of *MBNL1* counterpart *mbl* (Picchio et al., 2018; Auxerre-Plantié et al., 2019) offer further valuable models for identifying gene deregulations underlying DM1.

Among molecular mechanisms associated with DM1, deregulation of miRNAs and in particular reduced levels of evolutionarily conserved muscle- and heart-specific miRNA, *miR-1*, has been reported in DM1 patients (Rau et al., 2011) and in DM1 models including mouse (Kalsotra et al., 2014) and *Drosophila* (Fernandez-Costa et al., 2013). However, the impact of *miR-1* down-regulation on DM1-associated phenotypes has not yet been analysed.

Here, we made use of *Drosophila* DM1 models to explore *miR-1* involvement in cardiac dysfunction in DM1. We observed that *dmiR-1* level was reduced in the cardiac cells of DM1 flies and that its down-regulation in the heart led to DCM, thus suggesting that reduced *dmiR-1* levels contribute to DM1-associated DCM. Among potential *dmiR-1* regulated genes from *in silico* screening, we identified *Multiplexin (Mp) / Collagen15A1 (Col15A1)* as a new cardiac *dmiR-1* target involved in DM1. Both Mp and Col15A1 proteins were highly enriched in cardiac cells of DCM-developing DM1 flies and in heart samples from DM1 patients with DCM, respectively. Moreover, heart-targeted overexpression of Mp was sufficient to induce DCM, whereas its attenuation rescues the DCM phenotype in DM1 flies. *miR-1* and its target *Mp/Col15A1* thus emerge as molecular determinants of DM1-associated DCM.

## Results

### Heart-targeted *dmiR-1* attenuation causes DCM in *Drosophila*

Reduced *miR-1* levels had previously been observed in mice developing DCM (Isserlin et al., 2014) and in cardiac samples from patients with end-stage DCM (Ikeda et al., 2007). It had also been shown that *miR-1* knockout mice display the DCM phenotype (Wei et al., 2014). However, whether *miR-1* attenuation specifically within the heart leads to DCM has not been assessed. Here we tested heart-specific knockdown (KD) of *dmiR-1* in *Drosophila* using a sponge line that contain multiple complementary binding sites for *dmiR-1*. When expressed at high levels under the control of cardiac-specific *Hand-Gal4* driver, sponge sequences inhibit the activity of *dmiR-1* in fly heart, thus preventing its function (Fulga et al., 2015). In the *Hand>dmiR-1 sponge* context, the adult fly hearts showed a larger diameter with an enlarged cardiac lumen (Fig. 1A,A',B,B'). Consistent with this observation, analyses of semi-intact *Hand>dmiR-1 sponge* heart preparations and generated M-modes (Fig.1C,C') confirmed enlargement of the cardiac tube and showed significantly increased diastolic and systolic heart diameters in young and aged flies (Fig. 1D, E) concomitant with myofibrillar disarray in the heart tube (Fig. S1 C'). We then characterized the effects of *dmiR-1* down-regulation on heart contractility by assessing percent fractional shortening (%FS), which refers to the size of the cardiac tube at the end of systole and the end of diastole. The cardiac dilation in *Hand>dmiR-1 sponge* flies was associated with a significant reduction in heart contractility at both 1 and 5 weeks of age (Fig. 1F). *dmiR-1* attenuation in the *Drosophila* heart thus leads to DCM.

### DM1 flies develop a DCM phenotype and show a reduced *dmiR-1* level in cardiac cells

DCM accounts for fatal cardiac involvements in DM1 patients, but the gene deregulations underlying DM1-associated DCM have not been identified. To address this issue, we first tested whether *Drosophila* DM1 models developed DCM. We tested three heart-specific DM1 contexts, namely (i) overexpression of 960CTG repeats, (ii) overexpression of *CELF1* ortholog *Bru3*, and (iii) attenuation of *MBNL1* ortholog *mbl*. Since the severity of cardiac phenotypes in DM1 disease increases with age, we performed all analyses at 1 and 5 weeks of age. From the three heart-specific DM1 contexts the DCM phenotype was present in *Hand>Bru3* and *Hand>mblRNAi* models at both 1 and 5 weeks of age (Fig. 2A-F) but not in *Hand>960CTG*. The DCM phenotype, in *Hand>mblRNAi* and *Hand>Bru3* DM1 contexts, is

also associated with myofibrillar disarray in the heart tubes (Fig. S1B',C'). The *Hand>960CTG* line presents cardiac dilation at 5 weeks of age characterized by significant increase in diastolic and systolic diameters but with normal cardiac contractility (Fig. S2A,B,C). Non-affected contractility in these DM1 flies could be due to a milder effect of 960CTG repeats on *Bru3* and *Mbl* levels compared to GAL4-driven overexpression of *Bru3* and RNAi-knockdown of *mbl*.

Given that *dmiR-1* attenuation leads to DCM and that *Hand>Bru3* and *Hand>mblRNAi* DM1 models develop a DCM phenotype, we tested whether cardiac cells of *Hand>Bru3* and *Hand>mblRNAi* flies showed reduced *dmiR-1* levels. Using *in situ* hybridization (ISH) with *dmiR-1*-specific miRCURY LNA probe we found a significantly reduced *dmiR-1* level in cardiac cells of both DCM-developing DM1 contexts (Fig. 2G,G',H,I and Fig. S3). *Pre-miR-1* expression was also lower in young DM1 flies (Fig. S4D), whereas hearts from aged *Hand>mblRNAi* flies showed an increased *pre-miR-1* level, most probably owing to its impaired processing (Fig. S4E). DCM-developing *Drosophila* DM1 models could thus serve to test and identify genes deregulated in the DM1-associated DCM context in response to a reduced *dmiR-1* level.

### ***dmiR-1* target Multiplexin is up-regulated in DCM-developing DM1 flies**

To identify *dmiR-1* target genes involved in DM1-associated DCM, we first performed *in silico* screening by mapping *Drosophila*-specific *dmiR-1* seed sites annotated in miRBase (Griffiths-Jones et al., 2006;<http://www.mirbase.org/>) on 3'UTR regions of *Drosophila* genes up-regulated in the hearts of two DCM-developing DM1 contexts at 5 weeks of age (Table 1; Fig. 3A) (Auxerre-Plantié et al., 2019). We identified a set of 124 candidate genes that contain a potential *dmiR-1* seed site and among them *Multiplexin (Mp)* (Table 1, scheme in Fig. 3A).

*Mp*, a *Drosophila* ortholog of mammalian Collagen XVIII and Collagen XV, belongs to the family of multi-domain collagens. It is composed of an N-terminal thrombospondin-related domain, followed by multiple Collagen repeats, a Collagen trimerisation domain and a C-terminal endostatin domain (Meyer and Moussian, 2009). *Mp* also contains consensus glycosaminoglycan (GAG) attachment sites, and biochemical analysis of the protein extracted from embryonic tissues revealed the presence of chondroitin sulphate (CS) chains, making it more like human collagen XV than collagen XVIII in this respect. In the embryonic

*Drosophila* heart, Mp is expressed in cardioblasts of the heart proper but not in aorta (Harpaz et al., 2013; Meyer and Moussian, 2009). The Mp was shown to be deposited in a polarised way along the heart lumen during cardiac tube formation (Meyer and Moussian, 2009) and involved in lumen shaping by enhancing Slit/Robo activity (Harpaz et al., 2013). Mp overexpression in the developing embryonic heart leads to an enlargement of heart lumen and is sufficient to promote an increase of the embryonic aorta diameter to that of the heart proper (Harpaz et al., 2013). We thus reasoned that Mp could be involved in DM1-associated DCM.

Here, we show that Mp is also expressed in the adult fly heart (Fig. S5B,B',B''). Consistent with the predicted location of an extracellular matrix protein, Mp was detected on the luminal and external surfaces of the cardiomyocytes and was also present on the underlying adult heart ventral longitudinal muscles (VLM) (Fig. S5B,B').

The predicted *dmiR-1*-binding site within the *Mp*-3'UTR region (Fig. 3B) is expected to negatively regulate *Mp* transcript level in the presence of *dmiR-1*. To assess the biological relevance of this binding site *in vivo*, we cloned the *Mp*-3'UTR fragment carrying the *dmiR-1* seed site downstream of the GFP coding sequence to generate the *UAS-GFP-Mp3'UTR* transgenic line. In parallel, the *UAS-GFP-ΔMp3'UTR* line was created in which the *dmiR-1* binding site was deleted from the 3'UTR *Mp* sequence. Both GFP sensor lines were then combined with the *UAS-dmiR-1* line to generate double transgenic lines *UAS-GFP-Mp3'UTR; UAS-dmiR-1* (Fig. 3C,C',D,D') and *UAS-GFP-ΔMp3'UTR; UAS-dmiR-1* (Fig. 3E,E',F,F'), respectively. We found that expression of *dmiR-1* in *Hand>GFP-3'UTRMp* hearts significantly reduced the GFP signal in cardiac and pericardial cells (Fig. 3D'), suggesting that *dmiR-1* binds to the predicted seed site and negatively regulates *Mp* mRNA expression in the adult fly heart. The deletion of the *dmiR-1* binding site in *Hand>GFP-Δ3'UTRMp; dmiR1* heart prevented the repressive effects of *dmiR-1* (Fig. 3F'), demonstrating that the GFP silencing observed in *Hand>GFP-Mp3'UTR; dmiR1* hearts (Fig. 3D') is *dmiR-1* dependent. This finding is also consistent with an increased Mp protein levels detected in hearts of the *Hand>miR-1-sponge* context mimicking *miR-1* attenuation and leading to DCM (Fig. S5J).

We then tested whether Mp protein level increased in DM1 contexts with DCM characterised by a reduced *dmiR-1*. We detected a significant increase in Mp protein level on the surface of cardiomyocytes in DCM-developing lines (*Hand>mblRNAi* and *Hand>Bru3*) in both young and aged flies (Fig. 3G',H',I',J',K,L). A similar increase in Mp expression was found in DM1 pericardial cells (Fig. S5D',E',F',G',H,I).

### Heart-targeted Mp overexpression leads to DCM

Mp protein level increases in DCM-developing DM1 hearts and in the heart-specific *dmiR-1* attenuation context causing DCM. Moreover, the 3'UTR region of *Mp* carries a *dmiR-1* binding site, making *Mp* an *in vivo dmiR1* target in the heart. All these observations prompted us to determine whether the increased cardiac Mp level could lead to DCM. To generate cardiac Mp gain-of-function we crossed *Hand-Gal4* with the *UAS-Mp 3HNC1 (UAS-Mp)* line (Meyer and Moussian, 2009). The *Hand>Mp* adult flies expressed a high Mp protein level in the heart (Fig. 4B,D). Already at age one week, the Mp gain-of-function flies displayed a larger heart tube diameter and a wider cardiac lumen than control (*UAS-Mp*) (Fig. 4D',C'). The diastolic and systolic diameters of hearts overexpressing Mp were also significantly increased at both one- and five-week-old *Hand>Mp* flies relative to controls (Fig. 4E,F). The cardiac dilation was concomitant with significantly reduced fractional shortening and thus adversely affected cardiac contractility (Fig. 4G). These findings demonstrate that heart-specific increase in Mp protein level is detrimental to cardiac function, leading to DCM in flies.

To further analyse effects of Mp expression level on heart morphology and function, we tested the impact of cardiac-specific Mp knockdown at one and five weeks of age. We observed a reduced heart lumen in *Hand>MpRNAi* flies compared to controls and a significant decrease in diastolic and systolic diameters at ages one and five weeks (Fig. S6).

Taken together, our findings demonstrate that Mp expression level plays a critical role in setting the size of the cardiac lumen and the systolic and diastolic fly heart variables, and its overexpression in the heart leads to DCM. We thus infer that the reduced *dmiR-1* leading to the up-regulation of its direct target Mp promotes development of DCM in the DM1 context (see scheme in Fig. 4I).

### Mp counterpart Col15A1 is up-regulated in cardiac samples of DM1 patients with DCM

Given the increased Mp level in DM1 fly models developing DCM, we examined whether expression of its human ortholog Col15A1 was also up-regulated in cardiac cells of DM1 patients. Of three DM1 cardiac tissue samples tested, two were from DM1 patients with DCM (Fig. 5A,B). We observed that DM1 cardiac cells showed an increase in Col15A1 expression compared to cardiac cells from healthy donors that is non-significant at RNA levels but significant at protein levels. We also noticed differentially higher Col15A1 levels in DM1

patients with DCM compared to cardiac cells from DM1 patient without DCM (Fig. 5A,B). Thus, like Mp in *Drosophila* DM1 models, the up-regulation of Col15A1 in the heart correlates with DCM in DM1 patients.

### Heart-specific attenuation of Mp rescues DM1-associated DCM phenotype

To determine whether the increased Mp/Col15A1 levels could contribute to the DCM phenotype in DM1, we applied our DM1 fly models and performed genetic rescue experiments by attenuating Mp expression in the DCM-developing *Hand>Bru3* context and we used *UAS-UPRT; Bru3* as a negative control (*UPRT* encodes uracil phosphoribosyltransferase enzyme). Young one-week-old *Hand>UPRT; Bru3* flies do not present DCM (Fig. S7). However, five-weeks-old flies from this line show significant increase in diastolic and systolic diameter in comparison to the control. When Mp expression is attenuated via RNAi in *Hand>Bru3* DM1 context, diastolic and systolic diameters are reduced and the cardiac contractility becomes similar to that of aged control flies (Fig. 5C-E). Thus, heart-specific attenuation of Mp rescues DCM phenotype in aged DM1 flies.

## Discussion

Myotonic dystrophy type 1 is the most common muscular dystrophy in adults. Cardiac repercussions including DCM are among the main causes of death in DM1 (Groh et al., 2008). However, the underlying mechanisms remain poorly understood, impeding the development of adapted treatments. As we previously demonstrated (Auxerre-Plantié et al., 2019; Souidi et al., 2018; Souidi and Jagla, 2021), *Drosophila* DM1 models recapitulate all the cardiac phenotypes observed in DM1 patients and so could help gain insight into gene deregulations underlying DM1-associated DCM.

### DM1 fly models show reduced *dmiR-1* in cardiac cells and develop DCM

In humans, DCM is characterized by left ventricular dilation and systolic dysfunction defined by a depressed ejection fraction. Similarly, in DCM-developing flies, the cardiac tube is enlarged and shows an increased diastolic and systolic diameter with reduced contractility. The loss of cardiac miRNAs and in particular *miR-1* has already been correlated to DCM and heart failure in mice (Rao Prakash et al., 2009; Wei et al., 2014) and observed in patients with

end-stage DCM (Ikeda et al., 2007). *miR-1* sequence is highly conserved between *Drosophila* and Human and it is well known that it regulates genes involved in cardiac development and function including *Nkx2.5*, *SRF* and components of *WNT* and *FGF* signalling pathways (Kura et al., 2020) and that its level is reduced in the pathological context of DM1 (Rau et al., 2011). However, it was not known whether the low *miR-1* level caused DM1-associated DCM, nor what were the downstream *miR-1* targets. Here, we show that two heart-targeting *Drosophila* DM1 models, *Hand>mblRNAi* and *Hand>Bru3* mimicking sequestration of MBNL1 and stabilisation of CELF1, respectively, developed DCM and showed a reduced expression of *dmiR-1* in cardiac cells. Because overexpression of CELF1 (Koshelev et al., 2010) and loss of MBNL1 (Lee et al., 2013) also result in DCM in mice, *Drosophila* appears well-suited to assessing the impact of reduced *miR-1* in DM1-associated DCM. One mechanism explaining why *miR-1* levels fall in the DM1 context is the sequestration of MBNL1, which can no longer play its physiological role in *pre-miR-1* processing into mature *miR-1* (Rau et al., 2011). Here, we observed reduced *dmiR-1* also upon cardiac overexpression of CELF1 ortholog Bru3. How CELF1/Bru3 impinges on *miR-1* levels is not fully understood, but it was demonstrated that CELF1 could bind UG-rich miRNAs (such as *miR-1*) and mediate their deadenylation and degradation by recruiting poly(A)-specific ribonuclease (PARN) (Teplova et al., 2010; Katoh et al., 2015). Given that *Drosophila* DM1 models developing DCM showed markedly reduced *dmiR-1* in cardiac cells, we sought to determine whether heart-targeted attenuation of *dmiR-1* was sufficient to induce DCM: *dmiR-1* knockdown in the heart mimics DM1-associated DCM.

### **Col 15A1 ortholog *Mp* is a new *miR-1* target involved in DM1-associated DCM**

To identify candidate *dmiR-1* target genes involved in DCM we performed *in silico* screening for *dmiR-1* seed sites in the 3'UTR regions of genes up-regulated in cardiac cells at 5 weeks of age (Auxerre-Plantié et al., 2019) in DM1 models developing DCM (see Table 1). Among 1189 3'UTR sequences tested we found that 162 bore potential *dmiR-1* seed sites, including the 3'UTR of *Multiplexin (Mp)*. *Mp* codes for extracellular matrix protein belonging to a conserved collagen XV/XVIII family. We top-ranked *Mp* because of its known role in setting the size of the cardiac lumen (Harpaz et al., 2013). The embryos overexpressing *Mp* display enlarged cardiac tube and conversely, *Mp*<sup>-/-</sup> embryos were found to present a narrower lumen with reduced contractility of the heart tube (Harpaz et al., 2013). In parallel, the mouse mutants of *Mp* ortholog, *Col15A1*, showed age-related muscular and cardiac

deteriorations linked to a degraded organisation of the collagen matrix (Eklund et al., 2001; Rasi et al., 2010). This prompted us to examine how Mp was expressed in the adult fly heart and what the effect of its overexpression was. Using Mp specific antibody we detected Mp on the surface of the cardiac cells and found that it accumulated to a high level in both *Hand>mbIRNAi* and *Hand>Bru3* DM1 lines. We also tested whether the *in silico* identified *dmiR-1* seed site was required for the regulation of Mp expression and confirmed that *Mp* is a direct *in vivo* target of *dmiR-1* in cardiac cells. As potential binding site for human *miR-1* is present also in 3'UTR of *Col15A1* transcript (Fig. S4G) we hypothesize that *Mp/Col15A1* are evolutionarily conserved *miR-1* targets. Consistent with its role downstream of *dmiR-1*, Mp overexpression in the heart mimicked the *dmiR-1* knockdown phenotype, leading to a significantly enlarged heart with reduced contractility. Moreover, heart-specific attenuation of Mp expression in the *Hand>Bru3* DM1 context reduced heart dilation and rescued DCM phenotype in aged flies, thus demonstrating that increased Mp levels contribute to DCM observed in DM1 flies. Previous reports (Louzao-Martinez et al., 2016; Gil-Cayuela et al., 2016) revealed increased expression levels of different collagens associated with DCM in both animal models and patients. Here, we report evidence that *Col15A1* is specifically up-regulated at both transcript and protein levels in cardiac samples from DM1 patients and in particular in those with DCM. Altogether, the observations that *Col15A1* expression level is abnormally elevated in DCM-developing DM1 patients and that attenuation of its *Drosophila* ortholog Mp could ameliorate the DCM phenotype suggest that *Col15A1* could be a novel therapeutic target in DM1.

### **DCM, a complex cardiac condition with a poor prognosis in DM1**

A large number of genes have so far been implicated in DCM, attesting to the complex molecular origin of this cardiac condition. For example, in *Drosophila*, DCM was observed in mutants of genes encoding contractile and structural muscle proteins such as Troponin I (TpnI), Tropomyosin 2 (Tm2),  $\delta$ -sarcoglycan and Dystrophin but also associated with deregulations of EGF, Notch, Cdc42 and CCR4-Not signalling pathway components. In (reviewed in Wolf, 2012) humans, DCM-causing mutations were also identified in a large number of genes including those encoding cytoskeletal proteins such as FLNC, nuclear membrane protein LMNA or involved in sarcomere stability (Titin, TNNT2, MYH7, TPM1) but also RNA binding protein RBM20 (McNally and Mestroni, 2017).

Here, we focused on DCM associated with DM1. A previous study on a mouse model overexpressing CELF1 and developing DCM (Wang et al., 2015), identified down-regulation of *Transcription factor A mitochondrial (Tfam)*, *Apelin (Apln)* and *Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 1 (Acsll1)* as potentially associated with DCM. It was suggested that CELF1 might regulate their mRNA stability by binding to their 3'UTR regions and causing destabilisation and degradation of their transcripts (Chang Kuei-Ting et al., 2017). In this DCM-developing mouse DM1 model, Col15a transcripts were elevated (Wang et al., 2015), but the role of Col15a in DCM was not analysed. Here, using *Drosophila* DM1 models with a DCM phenotype, we identified up-regulation of Col15A1 ortholog *Mp* as a molecular determinant of DM1-associated DCM. We also link reduced *miR-1* levels in DCM-developing DM1 cardiac cells to the up-regulation of *Mp*, establishing that *Mp* is an *in vivo* target of *dmiR-1*.

Importantly, our findings show that in DM1 patients, Collagen 15A1 is up-regulated in the hearts of patients with DCM. In DM1 patients, the DCM phenotype appears several years after onset and is less common than the conduction system defects and arrhythmias (Lin et al., 1989; Nguyen et al., 1988). However, it is frequently associated with poor prognosis and indication for heart transplant (Papa et al., 2018).

In summary, we report evidence for the importance of *miR-1*-dependent gene deregulations in DM1 and identify *Mp* as a new *miR-1* target involved specifically in DM1-associated DCM. We also demonstrate that Mbl depletion and Bru3 up-regulation in the heart have overlapping impacts on DM1 pathogenesis, both leading to reduced *miR-1*, up-regulation of *Mp*, and so to DCM (see scheme in Fig. 4C).

Our conclusion is that in a physiological context, *Mp* level is moderately triggered by Mbl-dependent regulation of *dmiR-1* processing and Bru3-dependent regulation of *dmiR-1* stability. However, in the DM1 context, Mbl is sequestered in nuclear foci while Bru3 levels increase, leading to a reduced *dmiR-1* and the up-regulation of its target gene *Mp*. Considering the known role of *Mp* as a positive regulator of cardiac lumen size (Harpaz et al., 2013) we would expect *Mp* accumulation in the adult heart also to promote heart tube enlargement, leading to the DCM phenotype. Whether like in embryos this *Mp* function involves the Slit/Robo signalling pathway remains to be investigated, but the finding that Robo2 is among identified *miR-1* targets up-regulated in DCM-developing DM1 flies (Table 1) supports this possibility. Finally, the fact that *Mp* ortholog Col15A1 is highly elevated in cardiac samples from DM1 patients with DCM and that reducing *Mp* rescues DCM phenotype in DM1 fly

model suggests that Mp/Col15A1 could be an attractive diagnostic and/or therapeutic target for DM1-associated DCM.

## MATERIALS AND METHODS

### **Drosophila stocks**

All *D. melanogaster* stocks were grown and crossed at 25° C on standard fly food. In this study, we used three *Drosophila* DM1 models: *UAS-960CTG* (Picchio et al., 2013), *UAS-MbiRNAi* (28732, VDRC Vienna, Austria) and *UAS-Bru3* (Picchio et al., 2013). For *dmiR-1* loss and gain of function we used *UAS-dmiR-1 sponge* (Fulga et al., 2015), *dmiR-1 KO* (58879, Bloomington, USA) and *UAS-dmiR-1* (41125, Bloomington, USA) respectively. For functional analyses of Mp, we used *UAS-MpRNAi-TRIP* (52981, Bloomington, USA) and *UAS-3HNC1* (Meyer and Moussian, 2009). For testing the rescue of dilated cardiomyopathy observed in *Hand>Bru3* line, we have recombined *UAS-Bru3* with *UAS-MpTRIP* line to generate *UAS-MpTRIP; Bru3* line. The *UAS-Bru3* line was also recombined with the *UAS-UPRT* (UAS-HA-UPRT Bloomington 27604) line to generate *UAS-UPRT; Bru3* as a negative control for this rescue experiment.

All inducible lines were crossed with the driver line *Hand-Gal4* (provided by Laurent Perrin, TAGC, Marseille, France) to induce the expression of transgenes specifically in the fly heart (cardioblasts and pericardial cells, with a low expression in VLM). Control lines were generated by crossing the above-cited UAS lines with *w<sup>1118</sup>* line. *Hand-Gal4/+* control was generated also by crossing *Hand-Gal4* driver line with *w<sup>1118</sup>*. *w<sup>1118</sup>* is a mutant strain with a recessive white-eye phenotype.

### **Heartbeat analyses of adult *Drosophila* hearts**

Physiological analyses of adult *Drosophila* hearts were performed on one and five weeks old female flies using the Semi-automatic Optical Heartbeat Analysis (SOHA) approach protocol of Ocorr (Ocorr et al., 2009). For each genotype, about 20 flies were analyzed. First, we proceeded to dissection and preparation of semi-dissected hearts: adult *Drosophila* flies were anesthetized with Fly Nap for 5 minutes, then placed, dorsal side down, into a petri dish coated with a thin layer of petroleum jelly. The head, the ventral thorax and the ventral abdominal cuticle were removed in order to expose the abdominal contents. The ovaries and

other organs as well as fats were then removed in order to expose heart tube attached to the dorsal cuticle. Dissection was performed in an oxygenated, artificial hemolymph (AH) solution composed of 108mM Na<sup>+</sup>, 5mM KCl, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 8mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4mM NaHCO<sub>3</sub>, 10mM sucrose, 5mM trehalose, 5mM HEPES (pH 7.1, all reagents from Sigma Chemicals). The solution was oxygenated by air-bubbling for 15 to 20 min. The beating hearts were filmed by a digital camera on 30 seconds movie with speed of 150 frames /second (Digital camera C9300, Hamamatsu, McBain Instruments, Chatsworth, CA) using microscope Zeiss (Axiophot, Zeiss) using immersion objective 10X. The heartbeats were recorded in A3 and A4 segments. The SOHA program based on Matlab R2009b software has been used for film analysis: The cardiac tube membrane during maximum diastole (relaxation) and maximum systole (contraction) were defined manually. One pair of marks identified the diastolic diameter, and one pair identified the systolic diameter. From this vertical row of pixels, a M-mode was generated to analyze the contraction and relaxation intervals: diastolic (DD), and systolic (SD) diameters, heart period (HP), and systolic (SI) and diastolic (DI) intervals. The diastolic and systolic diameters was used to calculate the Fractional shortening (FS) using the formula:  $((\text{Diastolic diameter} - \text{Systolic diameter})/\text{Diastolic diameter}) \times 100$  (Ocorr et al., 2009).

### **Immuno-fluorescence staining of *Drosophila* heart**

The adult hearts from one and five weeks old females were dissected as described previously, then fixed with formaldehyde 4%. Samples were incubated with primary rat anti-Mp antibodies (1/100) (Harpaz et al., 2013) or goat anti-GFP (1/500) (Abcam ab5450) overnight at 4 °C followed by 3 washes with PBS-Tween 0.1%, of 10 min each, then secondary antibodies anti-rat Alexa-CY3 (1/150) or with anti-goat Alexa-488 (1/150) (Jackson ImmunoResearch), respectively, for two hours at room temperature, Rhodamine phalloidin (1/1000) (Thermo Fischer Scientific) was used to reveal actin filaments. The preparations were mounted in a the Vectashield with DAPI (Vector laboratories, Inc. Burlingame, CA). Immunofluorescence labeled preparations were analyzed using a confocal microscope Leica SP8.

### Quantification of Multiplexin immunolabeling

Fluorescent-labelled heart tissues were all processed and stained under the same conditions. The level of fluorescent signal was quantified using ImageJ software by CTCF (Corrected Total Cell Fluorescence) approach. CTCF is calculated according to the formula: Measured by the software Integrated Optical Density - (Area of select x mean fluorescence of background readings). For each heart, CTCF was measured in two regions from segment A3 and two regions from segment A4. For each genotype 9 hearts were analyzed for cardioblasts with 4 measurements in regions for each, and 3 pericardial cells were analyzed from each heart.

### Fluorescence in situ hybridisation (FISH) using LNA enhanced probes

For detection of *dmiR-1* we used fluorescence in situ hybridization (FISH) using double-labeled (enhanced) miRCURY LNA probes. First, flies one and five weeks old were dissected and fixed for 30 min with 4% paraformaldehyde; rinsed at PBS1X -Tween 0.1% three-time, 5 min each. Samples were dehydrated through a series of increasing ethanol concentrations, transferred sequentially to 25%, 50%, 75%, 100% ethanol baths for 10 min each. After removing ethanol tissues were rehydrated through a series of decreasing ethanol concentrations, transferred sequentially 50%, 25% ethanol baths for 10 min each, and then post fixed for 30 min with 4% paraformaldehyde. Then incubated with solution composed of 50% PBT and 50% hybridisation buffer (5 mL Formamide, 0.5 mL SSC 20X, 100  $\mu$ L ssDNA, 20  $\mu$ L tRNA 50 ng/ $\mu$ L, 5  $\mu$ L Heparin 100 ng/ $\mu$ L, 10  $\mu$ L Tween) for 5 min. The samples were finally incubated with hybridisation solution for 1h30 min at 50°C. The hybridisation mix including specific DIG-labeled probes (1nM for U6 snRNA positive control ref 339459, 20nM for negative control scramble ref 339459 and 40 nM for DME-miR1-3p ID: 339111) were added in each tube and samples were incubated at 50°C overnight. To remove non-specific RNA hybridisation, samples were washed with ISH (5 mL Formamide, 0.5 mL SSC 20X, 100  $\mu$ L ssDNA, 5  $\mu$ L Heparin 100 ng/ $\mu$ L, 10  $\mu$ L Tween) for 30 min each at 50°C then with PBT. Slides were blocked in western blockage reagent (3mL blockage reagent+ 12mL PBT) for 30 min, incubated with sheep anti-DIG POD antibodies (11633716001, Roche) for 2 hours, treated with the TSA Plus Cyanine 3 System 1% (PerkinElmer, USA) for 5 min, blocked in 20% NGS diluted in PBT for 30 min. Finally, samples were incubated with primary antibodies (anti-Actin 1/250) overnight at 4 °C and then with secondary antibodies coupled with Alexa448 (1/150). The preparations were mounted in a Vectashield with DAPI

medium. Immunofluorescence labeling preparations have been then analyzed using a confocal microscope Leica SP8.

### **FISH quantification**

Stained *Drosophila* hearts were imaged in 3D to allow the quantification of RNA transcripts in the total volume of cardiac and pericardial cells. The transcripts hybridized with miRCURY LNA enhanced probes appear on the images as luminous fluorescent spots. Each spot represents several *miR-1* transcripts. The 3D images were analyzed using Imaris (version 9.3.1) that allows the detection, the visualization of spatial distribution as well as the quantification of intensity for each spot detected. To detect the real RNA spots of interest we have adjusted the threshold of intensity detection according to scramble. To determine the lower threshold in pericardial cells, we have analyzed the spots detected in 27 pericardial cells in 9 heart preparations labelled by scramble. We adjusted the lower threshold above the mean intensity of scramble spots (30) and the upper threshold (255) by default. With this background subtracting parameter, Imaris software generated *dmiR1* spots and calculated the mean intensity for each spot detected as well as the average of the mean intensities for all *dmiR-1* spots. Similar approach has been applied for *dmiR-1* FISH quantification in cardioblasts.

### **RNA extraction and RT-qPCR on adult fly heart samples**

Total RNA was isolated from 20 adult hearts from one and five weeks old female flies, using Direct-zol™RNA Microprep (ref: R2060) from Zymo Research following the manufacturer's instructions. RNA quality and quantity were respectively assessed using Agilent RNA Screen Tape Assay on 4200 TapeStation System (Agilent Technologies) and Qubit RNA HS assay kit on a Qubit 3.0 Fluorometer (Thermo Fischer Scientific). Then, 150 ng total RNA was reverse transcribed using SuperScript IV Reverse Transcriptase kit (Invitrogen) with random primer mix, in a 20 µL reaction. Quantitative PCR was performed in 4 replicates in final volume of 10 µL using Light SYBR Green PCR Master Mix (Roche, Applied Science) on a LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche, Applied Science). 2 µL (3 ng) of cDNA were added to a SYBR Green Master Mix. We used Rp49 as a reference gene. The following pairs of primers were used: *Rp49*: forward GCTTCAAGGGACAGTATCTG and reverse AAACGCGGTTCTGCATGAG; *pre-dmiR-1*:

forward TTCAGCCTTTGAGAGTTCCATG and reverse CGCCAGATTTTCGCTCCATAC. The relative quantifications of transcripts were obtained with the  $\Delta\Delta C_t$  method. Finally, nonparametric Mann–Whitney tests were performed to compare control samples and samples of interest.

### ***In silico* search for *dmiR-1* target genes up-regulated in DM1 models**

We aligned *dmiR-1-3p* sequence (UGGAAUGUAAAGAAGUAUGGAG) ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)) on 3'UTR part of every *D. melanogaster* gene (dm6 *D. melanogaster* genome sequence) allowing 1 mismatch or indel using bowtie2 (Langmead and Salzberg, 2012). From this pool of potential *dmiR-1* targets we selected those which are up-regulated (Fold change > 1.7) in *Hand*>*Bru3* and/or *Hand*>*mbIRNAi* DM1 contexts in comparison to the control *Hand*>*LacZ* at 5 weeks of age (transcriptomic data of our laboratory (Auxerre-Plantié et al., 2019)).

### **Generating transgenic fly lines**

To validate *Mp* as a direct target of *dmiR-1* *in vivo*, we have generated double transgenic fly lines. For the generation of *UAS-GFP-3'UTRmp* line, approximately 470 base pairs surrounding the predicted *dmiR-1*-target site in 3'UTR of *Mp* were amplified directly from the genomic DNA from the *w<sup>1118</sup>* flies using the primers Mp-F1: ATAACTAGTTGAGCGGAAACGGAAGGAAGAAGAGGAG and Mp-R1: ATATCTAGATGTTGTGAATGATGACGTTAGG and a high-fidelity DNA Polymerase enzyme (Thermo Scientific Phusion High-Fidelity DNA Polymerase) kit. For the *UAS-GFP-Δ3'UTRmp* line, the same steps were proceeded with primers Mp-F2: ATAACTAGTTGATAAAACAAAACAAATCACAGCAC and Mp-R1: ATATCTAGATGTTGTGAATGATGACGTTAGG to amplify about 350 bp without predicted *dmiR-1*-target site. The *SpeI* and *XbaI* restriction sites were incorporated into primers and introduced by PCR. PCR products were purified using NucleoSpin Plasmid clean up kit after validation of inserts by electrophoresis on 1% agarose gel. After digestion of purified 3'UTR *Mp* fragments and *pUASP-PL-Venus* vector by *SpeI* and *XbaI* enzymes, we performed ligation between 3'UTR *Mp* fragments and the vector using the T4 DNA ligase kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Purified vectors were then microinjected by the Fly Facility platform to generated transgenic lines. Finally, *UAS-GFP-*

*3'UTRMp* and *UAS-GFP-Δ 3'UTRMp* transgenic lines were combined with *UAS-miR-1* (41125, Bloomington, USA) to generate *UAS-GFP-3'UTRMp; UAS-miR-1* and *UAS-GFP-Δ3'UTRMp; UAS-miR-1* respectively and then crossed with the driver line *Hand -GALA*.

### **RNA extraction, RT-qPCR, and immunoblot on DM1 human hearts**

Human ventricular cardiac muscle tissues were obtained at autopsy from 3 DM1 patients and 3 normal controls following informed consent. All experimental protocols were approved by the Institutional Review Board at Osaka University and carried out in accordance with the approved guidelines. Total mRNA was extracted and first-strand complementary DNA synthesized as described previously (Nakamori et al., 2008). RT-qPCR was performed using TaqMan Gene Expression assays (Hs00266332\_m1 and 4333760F, Applied Biosystems) on an ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems), as described previously (Nakamori et al., 2011). Level of *COL15A1* mRNA was normalized to *18S* rRNA. For protein analysis, cardiac muscle tissues were homogenized in a 10x volume of radioimmunoprecipitation assay buffer (25 mM Tris-HCl; pH 7.5; 150 mM NaCl; 1% NP-40; 1% sodium deoxycholate; and 0.1% sodium dodecyl sulfate) containing a protein inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). The homogenate was centrifuged for 10 minutes at 10,000g and the supernatant was collected. Equal amounts of protein (40 μg) were separated by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto Immobilon-P membranes (Millipore), as previously described (Nakamori et al., 2008). Blots were blocked for nonspecific protein binding with 5% (w/v) nonfat milk and then incubated with a 1:500-diluted antibody against COL15A1 (Thermo Fisher Scientific) or 1:3000-diluted antibody against GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) (Sigma-Aldrich). After repeated washings, the membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Thermo Fisher Scientific). The ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Cytiva) and ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad) were used to detect the proteins.

### **Statistics**

Nonparametric Mann-Whitney tests were performed to compare control samples and samples of interest of *Drosophila* model and t-test was performed to compare controls to

DM1 context from heart samples of DM1 patients. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism (version 8.0.1) software. Results are reported with *p-value* < 0.05 considered statistically significant.

## References

- Auxerre-Plantié, E., Nakamori, M., Renaud, Y., Huguet, A., Choquet, C., Dondi, C., Miquerol, L., Takahashi, M.P., Gourdon, G., Junion, G., Jagla, T., Zmojdzian, M., Jagla, K., 2019. Straightjacket/ $\alpha 2\delta 3$  deregulation is associated with cardiac conduction defects in myotonic dystrophy type 1. *eLife* 8, e51114. <https://doi.org/10.7554/eLife.51114>
- Chang Kuei-Ting, Cheng Ching-Feng, King Pei-Chih, Liu Shin-Yi, Wang Guey-Shin, 2017. CELF1 Mediates Connexin 43 mRNA Degradation in Dilated Cardiomyopathy. *Circulation Research* 121, 1140–1152. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311281>
- Dasgupta, T., Ladd, A.N., 2012. The importance of CELF control: molecular and biological roles of the CUG-BP, Elav-like family of RNA binding proteins. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 3, 104–121. <https://doi.org/10.1002/wrna.107>
- De Haro, M. de, Al-Ramahi, I., Jones, K.R., Holth, J.K., Timchenko, L.T., Botas, J., 2013. Smaug/SAMD4A Restores Translational Activity of CUGBP1 and Suppresses CUG-Induced Myopathy. *PLOS Genetics* 9, e1003445. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003445>
- de Haro, M., Al-Ramahi, I., De Gouyon, B., Ukani, L., Rosa, A., Faustino, N.A., Ashizawa, T., Cooper, T.A., Botas, J., 2006. MBNL1 and CUGBP1 modify expanded CUG-induced toxicity in a *Drosophila* model of myotonic dystrophy type 1. *Hum. Mol. Genet.* 15, 2138–2145. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl137>
- Eklund, L., Piuhola, J., Komulainen, J., Sormunen, R., Ongvarrasopone, C., Fässler, R., Muona, A., Ilves, M., Ruskoaho, H., Takala, T.E.S., Pihlajaniemi, T., 2001. Lack of type XV collagen causes a skeletal myopathy and cardiovascular defects in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1194–1199.
- Fardaei, M., Larkin, K., Brook, J.D., Hamshere, M.G., 2001. In vivo co-localisation of MBNL protein with DMPK expanded-repeat transcripts. *Nucleic Acids Res* 29, 2766–2771.
- Fardaei, M., Rogers, M.T., Thorpe, H.M., Larkin, K., Hamshere, M.G., Harper, P.S., Brook, J.D., 2002. Three proteins, MBNL, MBLL and MBXL, co-localize in vivo with nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells. *Hum Mol Genet* 11, 805–814. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.7.805>
- Fernandez-Costa, J.M., Garcia-Lopez, A., Zuñiga, S., Fernandez-Pedrosa, V., Felipo-Benavent, A., Mata, M., Jaka, O., Aiastui, A., Hernandez-Torres, F., Aguado, B., Perez-Alonso, M., Vilchez, J.J., Lopez de Munain, A., Artero, R.D., 2013. Expanded CTG repeats trigger miRNA alterations in *Drosophila* that are conserved in myotonic dystrophy type 1 patients. *Hum Mol Genet* 22, 704–716. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds478>
- Fulga, T.A., McNeill, E.M., Binari, R., Yelick, J., Blanche, A., Booker, M., Steinkraus, B.R., Schnell-Levin, M., Zhao, Y., DeLuca, T., Bejarano, F., Han, Z., Lai, E.C., Wall, D.P., Perrimon, N., Van Vactor, D., 2015. A transgenic resource for conditional competitive inhibition of conserved *Drosophila* microRNAs. *Nat Commun* 6, 7279. <https://doi.org/10.1038/ncomms8279>

- Garcia-Lopez, A., Monferrer, L., Garcia-Alcover, I., Vicente-Crespo, M., Alvarez-Abril, M.C., Artero, R.D., 2008. Genetic and Chemical Modifiers of a CUG Toxicity Model in *Drosophila*. *PLOS ONE* 3, e1595. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001595>
- Gil-Cayuela, C., Roselló-Lletí, E., Ortega, A., Tarazón, E., Triviño, J.C., Martínez-Dolz, L., González-Juanatey, J.R., Lago, F., Portolés, M., Rivera, M., 2016. New Altered Non-Fibrillar Collagens in Human Dilated Cardiomyopathy: Role in the Remodeling Process. *PLoS One* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168130>
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R.J., van Dongen, S., Bateman, A., Enright, A.J., 2006. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 34, D140–D144. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj112>
- Groh, W.J., Groh, M.R., Saha, C., Kincaid, J.C., Simmons, Z., Ciafaloni, E., Pourmand, R., Otten, R.F., Bhakta, D., Nair, G.V., Marashdeh, M.M., Zipes, D.P., Pascuzzi, R.M., 2008. Electrocardiographic abnormalities and sudden death in myotonic dystrophy type 1. *N. Engl. J. Med.* 358, 2688–2697. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa062800>
- Harpaz, N., Ordan, E., Ocorr, K., Bodmer, R., Volk, T., 2013. Multiplexin Promotes Heart but Not Aorta Morphogenesis by Polarized Enhancement of Slit/Robo Activity at the Heart Lumen. *PLOS Genetics* 9, e1003597. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003597>
- Hermans, M.C., Faber, C.G., Bekkers, S.C., de Die-Smulders, C.E., Gerrits, M.M., Merckies, I.S., Snoep, G., Pinto, Y.M., Schalla, S., 2012. Structural and functional cardiac changes in myotonic dystrophy type 1: a cardiovascular magnetic resonance study. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance* 14, 48. <https://doi.org/10.1186/1532-429X-14-48>
- Houseley, J.M., Wang, Z., Brock, G.J.R., Soloway, J., Artero, R., Perez-Alonso, M., O'Dell, K.M.C., Monckton, D.G., 2005. Myotonic dystrophy associated expanded CUG repeat muscleblind positive ribonuclear foci are not toxic to *Drosophila*. *Hum Mol Genet* 14, 873–883. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi080>
- Huguet, A., Medja, F., Nicole, A., Vignaud, A., Guiraud-Dogan, C., Ferry, A., Decostre, V., Hogrel, J.-Y., Metzger, F., Hoefflich, A., Baraibar, M., Gomes-Pereira, M., Puymirat, J., Bassez, G., Furling, D., Munnich, A., Gourdon, G., 2012. Molecular, Physiological, and Motor Performance Defects in DMSXL Mice Carrying >1,000 CTG Repeats from the Human DM1 Locus. *PLoS Genet* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003043>
- Ikeda, S., Kong, S.W., Lu, J., Bisping, E., Zhang, H., Allen, P.D., Golub, T.R., Pieske, B., Pu, W.T., 2007. Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiological Genomics* 31, 367–373. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00144.2007>
- Isserlin, R., Merico, D., Wang, D., Vuckovic, D., Bousette, N., Gramolini, A.O., Bader, G.D., Emili, A., 2014. Systems analysis reveals down-regulation of a network of pro-survival miRNAs drives the apoptotic response in dilated cardiomyopathy. *Mol. BioSyst.* 11, 239–251. <https://doi.org/10.1039/C4MB00265B>
- Kalsotra, A., Singh, R.K., Gurha, P., Ward, A.J., Creighton, C.J., Cooper, T.A., 2014. The Mef2 transcription network is disrupted in myotonic dystrophy heart tissue dramatically altering miRNA and mRNA expression. *Cell Rep* 6, 336–345. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.025>
- Katoh, T., Hojo, H., Suzuki, T., 2015. Destabilization of microRNAs in human cells by 3' deadenylation mediated by PARN and CUGBP1. *Nucleic Acids Res* 43, 7521–7534. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv669>

- Koshelev, M., Sarma, S., Price, R.E., Wehrens, X.H.T., Cooper, T.A., 2010. Heart-specific overexpression of CUGBP1 reproduces functional and molecular abnormalities of myotonic dystrophy type 1. *Hum. Mol. Genet.* 19, 1066–1075. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp570>
- Kura, B., Kalocayova, B., Devaux, Y., Bartekova, M., 2020. Potential Clinical Implications of miR-1 and miR-21 in Heart Disease and Cardioprotection. *Int J Mol Sci* 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21030700>
- Kuyumcu-Martinez, N.M., Wang, G.-S., Cooper, T.A., 2007. Increased steady state levels of CUGBP1 in Myotonic Dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyper-phosphorylation. *Mol Cell* 28, 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.07.027>
- Langmead, B., Salzberg, S.L., 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9, 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Lee, J.E., Cooper, T.A., 2009. Pathogenic mechanisms of myotonic dystrophy. *Biochem Soc Trans* 37. <https://doi.org/10.1042/BST0371281>
- Lee, K.-Y., Li, M., Manchanda, M., Batra, R., Charizanis, K., Mohan, A., Warren, S.A., Chamberlain, C.M., Finn, D., Hong, H., Ashraf, H., Kasahara, H., Ranum, L.P.W., Swanson, M.S., 2013. Compound loss of muscleblind-like function in myotonic dystrophy. *EMBO Mol Med* 5, 1887–1900. <https://doi.org/10.1002/emmm.201303275>
- Lin, A.E., Mitchell, F.M., Fitz, R.W., Doyle, J.J., 1989. Dilated cardiomyopathy in myotonic dystrophy. *Journal of the American College of Cardiology* 13, 262–263. [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(89\)90582-2](https://doi.org/10.1016/0735-1097(89)90582-2)
- Louzao-Martinez, L., Vink, A., Harakalova, M., Asselbergs, F.W., Verhaar, M.C., Cheng, C., 2016. Characteristic adaptations of the extracellular matrix in dilated cardiomyopathy. *International Journal of Cardiology* 220, 634–646. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.06.253>
- Masuda, A., Andersen, H.S., Doktor, T.K., Okamoto, T., Ito, M., Andresen, B.S., Ohno, K., 2012. CUGBP1 and MBNL1 preferentially bind to 3' UTRs and facilitate mRNA decay. *Sci Rep* 2, 209. <https://doi.org/10.1038/srep00209>
- Mathieu, J., Allard, P., Potvin, L., Prévost, C., Bégin, P., 1999. A 10-year study of mortality in a cohort of patients with myotonic dystrophy. *Neurology* 52, 1658–1662. <https://doi.org/10.1212/wnl.52.8.1658>
- McNally Elizabeth M., Mestroni Luisa, 2017. Dilated Cardiomyopathy. *Circulation Research* 121, 731–748. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309396>
- Meola, G., Cardani, R., 2015. Myotonic dystrophies: An update on clinical aspects, genetic, pathology, and molecular pathomechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, Neuromuscular Diseases: Pathology and Molecular Pathogenesis* 1852, 594–606. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.05.019>
- Meyer, F., Moussian, B., 2009. *Drosophila* multiplexin (Dmp) modulates motor axon pathfinding accuracy. *Development, Growth & Differentiation* 51, 483–498. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2009.01111.x>
- Nakamori, M., Gourdon, G., Thornton, C.A., 2011. Stabilization of expanded (CTG) $\cdot$ (CAG) repeats by antisense oligonucleotides. *Mol Ther* 19, 2222–2227. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.191>
- Nakamori, M., Kimura, T., Kubota, T., Matsumura, T., Sumi, H., Fujimura, H., Takahashi, M.P., Sakoda, S., 2008. Aberrantly spliced alpha-dystrobrevin alters alpha-syntrophin binding in myotonic dystrophy type 1. *Neurology* 70, 677–685. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000302174.08951.cf>

- Nguyen, Harold H., Wolfe, J.T., Holmes, D.R., Edwards, W.D., 1988. Pathology of the cardiac conduction system in myotonic dystrophy: A study of 12 cases. *Journal of the American College of Cardiology* 11, 662–671. [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(88\)91547-1](https://doi.org/10.1016/0735-1097(88)91547-1)
- Nguyen, H. H., Wolfe, J.T., Holmes, D.R., Edwards, W.D., 1988. Pathology of the cardiac conduction system in myotonic dystrophy: a study of 12 cases. *J. Am. Coll. Cardiol.* 11, 662–671.
- Ocorr, K., Fink, M., Cammarato, A., Bernstein, S.I., Bodmer, R., 2009. Semi-automated Optical Heartbeat Analysis of Small Hearts. *J Vis Exp.* <https://doi.org/10.3791/1435>
- Orengo, J.P., Chambon, P., Metzger, D., Mosier, D.R., Snipes, G.J., Cooper, T.A., 2008. Expanded CTG repeats within the DMPK 3' UTR causes severe skeletal muscle wasting in an inducible mouse model for myotonic dystrophy. *PNAS* 105, 2646–2651. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708519105>
- Papa, A.A., Verrillo, F., Scutifero, M., Rago, A., Morra, S., Cassese, A., Cioppa, N.D., Magliocca, M.C., Galante, D., Palladino, A., Golino, P., Politano, L., 2018. Heart transplantation in a patient with Myotonic Dystrophy type 1 and end-stage dilated cardiomyopathy: a short term follow-up. *Acta Myol* 37, 267–271.
- Pelargonio, G., Russo, A.D., Sanna, T., De Martino, G., Bellocci, F., 2002. MYOTONIC DYSTROPHY AND THE HEART. *Heart* 88, 665–670.
- Philips, A.V., Timchenko, L.T., Cooper, T.A., 1998. Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science* 280, 737–741. <https://doi.org/10.1126/science.280.5364.737>
- Picchio, L., Legagneux, V., Deschamps, S., Renaud, Y., Chauveau, S., Paillard, L., Jagla, K., 2018. Bruno-3 regulates sarcomere component expression and contributes to muscle phenotypes of myotonic dystrophy type 1. *Dis Model Mech* 11. <https://doi.org/10.1242/dmm.031849>
- Picchio, L., Plantie, E., Renaud, Y., Poovthumkadavil, P., Jagla, K., 2013. Novel Drosophila model of myotonic dystrophy type 1: phenotypic characterization and genome-wide view of altered gene expression. *Hum Mol Genet* 22, 2795–2810. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt127>
- Plantie, E., Nakamori, M., Renaud, Y., Huguet, A., Choquet, C., Dondi, C., Miquerol, L., Takahashi, M., Gourdon, G., Junion, G., Jagla, T., Zmojdian, M., Jagla, K., 2018. Straightjacket/ $\alpha$  2 $\delta$  3 deregulation is associated with cardiac conduction defects in Myotonic Dystrophy type 1. *bioRxiv* 431569. <https://doi.org/10.1101/431569>
- Rao Prakash K., Toyama Yumiko, Chiang H. Rosaria, Gupta Sumeet, Bauer Michael, Medvid Rostislav, Reinhardt Ferenc, Liao Ronglih, Krieger Monty, Jaenisch Rudolf, Lodish Harvey F., Billeloch Robert, 2009. Loss of Cardiac microRNA-Mediated Regulation Leads to Dilated Cardiomyopathy and Heart Failure. *Circulation Research* 105, 585–594. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.200451>
- Rasi Karolina, Piuhola Jarkko, Czabanka Marcus, Sormunen Raija, Ilves Mika, Leskinen Hanna, Rysä Jaana, Kerkelä Risto, Janmey Paul, Heljasvaara Ritva, Peuhkurinen Keijo, Vuolteenaho Olli, Ruskoaho Heikki, Vajkoczy Peter, Pihlajaniemi Taina, Eklund Lauri, 2010. Collagen XV Is Necessary for Modeling of the Extracellular Matrix and Its Deficiency Predisposes to Cardiomyopathy. *Circulation Research* 107, 1241–1252. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.222133>
- Rau, F., Freyermuth, F., Fugier, C., Villemain, J.-P., Fischer, M.-C., Jost, B., Dembele, D., Gourdon, G., Nicole, A., Duboc, D., Wahbi, K., Day, J.W., Fujimura, H., Takahashi, M.P., Auboeuf, D., Dreumont, N., Furling, D., Charlet-Berguerand, N., 2011. Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy. *Nature Structural & Molecular Biology* 18, 840. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2067>

- Schilling, L., Forst, R., Forst, J., Fujak, A., 2013. Orthopaedic Disorders in Myotonic Dystrophy Type 1: descriptive clinical study of 21 patients. *BMC Musculoskelet Disord* 14, 338. <https://doi.org/10.1186/1471-2474-14-338>
- Souidi, A., Jagla, K., 2021. Drosophila Heart as a Model for Cardiac Development and Diseases. *Cells* 10, 3078. <https://doi.org/10.3390/cells10113078>
- Souidi, A., Zmojdzian, M., Jagla, K., 2018. Dissecting Pathogenetic Mechanisms and Therapeutic Strategies in Drosophila Models of Myotonic Dystrophy Type 1. *Int J Mol Sci* 19, E4104. <https://doi.org/10.3390/ijms19124104>
- Timchenko, L.T., Salisbury, E., Wang, G.-L., Nguyen, H., Albrecht, J.H., Hershey, J.W.B., Timchenko, N.A., 2006. Age-specific CUGBP1-eIF2 complex increases translation of CCAAT/enhancer-binding protein beta in old liver. *J Biol Chem* 281, 32806–32819. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605701200>
- Timchenko, N.A., Wang, G.-L., Timchenko, L.T., 2005. RNA CUG-binding Protein 1 Increases Translation of 20-kDa Isoform of CCAAT/Enhancer-binding Protein  $\beta$  by Interacting with the  $\alpha$  and  $\beta$  Subunits of Eukaryotic Initiation Translation Factor 2. *J. Biol. Chem.* 280, 20549–20557. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409563200>
- Vlasova, I.A., Tahoe, N.M., Fan, D., Larsson, O., Rattenbacher, B., Sternjohn, J.R., Vasdewani, J., Karypis, G., Reilly, C.S., Bitterman, P.B., Bohjanen, P.R., 2008. Conserved GU-rich elements mediate mRNA decay by binding to CUG-binding protein 1. *Mol. Cell* 29, 263–270. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.024>
- Wang, E.T., Ward, A.J., Cherone, J.M., Giudice, J., Wang, T.T., Treacy, D.J., Lambert, N.J., Freese, P., Saxena, T., Cooper, T.A., Burge, C.B., 2015. Antagonistic regulation of mRNA expression and splicing by CELF and MBNL proteins. *Genome Res* 25, 858–871. <https://doi.org/10.1101/gr.184390.114>
- Wang, G.-S., Kearney, D.L., De Biasi, M., Taffet, G., Cooper, T.A., 2007. Elevation of RNA-binding protein CUGBP1 is an early event in an inducible heart-specific mouse model of myotonic dystrophy. *J Clin Invest* 117, 2802–2811. <https://doi.org/10.1172/JCI32308>
- Wei, Y., Peng, S., Wu, M., Sachidanandam, R., Tu, Z., Zhang, S., Falce, C., Sobie, E.A., Lebeche, D., Zhao, Y., 2014. Multifaceted roles of miR-1 s in repressing the fetal gene program in the heart. *Cell Research* 24, 278–292. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.12>
- Wolf, M.J., 2012. Modeling Dilated Cardiomyopathies in Drosophila. *Trends Cardiovasc Med* 22, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2012.06.012>
- Yu, Z., Teng, X., Bonini, N.M., 2011. Triplet Repeat-Derived siRNAs Enhance RNA-Mediated Toxicity in a Drosophila Model for Myotonic Dystrophy. *PLOS Genetics* 7, e1001340. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001340>

Tables

**Table 1. List of *in silico* identified *dmiR-1* targets up-regulated in DM1 contexts developing DCM at 5 weeks of age.**

Hand>mbIRNAi			Hand>Bru3		
	Symbol	Db id		Symbol	Db id
CG10045	GstD1	FBgn0001149	CG10036	otp	FBgn0015524
CG10650	CG10650	FBgn0046302	CG10076	spir	FBgn0003475
CG10693	slo	FBgn0003429	CG1044	dos	FBgn0016794
CG11125	CG11125	FBgn0033174	CG10650	CG10650	FBgn0046302
CG11128	slif	FBgn0037203	CG10693	slo	FBgn0003429
CG1128	alpha-Est9	FBgn0015577	CG10843	Cyp4p3	FBgn0033397
CG11340	pHCl-2	FBgn0039840	CG11253	Zmynd10	FBgn0266709
CG12287	pdm2	FBgn0004394	CG11319	Dpp10	FBgn0031835
CG12400	ND-B14.5B	FBgn0031505	CG11426	CG11426	FBgn0037166
CG12974	CG12974	FBgn0037065	CG12443	ths	FBgn0033652
CG13323	CG13323	FBgn0033788	CG13253	cmpy	FBgn0037015
CG13796	CG13796	FBgn0031939	CG13648	tnc	FBgn0039257
CG1414	bbx	FBgn0024251	CG13796	CG13796	FBgn0031939
CG1449	zfh2	FBgn0004607	CG13936	CNMa	FBgn0035282
CG14642	CG14642	FBgn0037222	CG14509	jus	FBgn0039647
CG14669	CG14669	FBgn0037326	CG14535	CG14535	FBgn0031955
CG14823	CG14823	FBgn0035734	CG14853	CG14853	FBgn0038246
CG14996	Chd64	FBgn0035499	CG14895	Pak3	FBgn0044826
CG15532	hdc	FBgn0010113	CG15312	CG15312	FBgn0030174
CG16757	Spn	FBgn0010905	CG1667	Sting	FBgn0033453
CG17375	CG17375	FBgn0031861	CG16820	CG16820	FBgn0032495
CG17716	tei	FBgn0000633	CG16995	CG16995	FBgn0031412
CG17875	Cyp9f3	FBgn0038034	CG1722	CG1722	FBgn0031168
CG17928	CG17928	FBgn0032603	CG17224	CG17224	FBgn0031489
CG18188	Damm	FBgn0033659	CG17228	pros	FBgn0004595
CG18211	betaTry	FBgn0010357	CG17264	CG17264	FBgn0031490
CG18480	CG18480	FBgn0028518	CG17907	Ace	FBgn0000024
CG1887	dsb	FBgn0035290	CG18188	Damm	FBgn0033659
CG2381	Syt7	FBgn0039900	CG1916	Wnt2	FBgn0004360
CG2471	Sclp	FBgn0030357	CG2105	Corin	FBgn0033192
CG2543	Fpgs	FBgn0030407	CG2381	Syt7	FBgn0039900
CG2718	Gs1	FBgn0001142	CG3038	CG3038	FBgn0040373
CG30489	Cyp12d1-p	FBgn0050489	CG31127	Wsck	FBgn0046685
CG30502	fa2h	FBgn0050502	CG31221	CG31221	FBgn0051221
CG32490	cpx	FBgn0041605	CG3151	Rbp9	FBgn0010263
CG33307	CG33307	FBgn0053307	CG31795	IA-2	FBgn0031294

RESULTATS ET DISCUSSION

CG34026	CG34026	FBgn0054026	CG32183	Ccn	FBgn0052183
CG34405	NaCP60E	FBgn0085434	CG32191	CG32191	FBgn0052191
CG3764	CG3764	FBgn0036684	CG32521	Mnr	FBgn0052521
CG3989	Paics	FBgn0020513	CG32602	Muc12Ea	FBgn0052602
CG42340	CG42340	FBgn0259242	CG33307	CG33307	FBgn0053307
CG4257	Stat92E	FBgn0016917	CG33542	upd3	FBgn0053542
CG42674	CG42674	FBgn0261556	CG33950	trol	FBgn0284408
CG42751	CG42751	FBgn0261805	CG34220	CG34220	FBgn0085249
CG42807	CG42807	FBgn0261989	CG34256	CG34256	FBgn0085285
CG43374	Cht6	FBgn0263132	CG34361	Dgk	FBgn0085390
CG43427	smash	FBgn0263346	CG34405	NaCP60E	FBgn0085434
CG43690	fok	FBgn0263773	CG3764	CG3764	FBgn0036684
CG44325	CG44325	FBgn0265413	CG3953	Invadolysin	FBgn0086359
CG45017	IP3K2	FBgn0283680	CG3997	RpL39	FBgn0023170
CG5065	CG5065	FBgn0034145	CG40160	CG40160	FBgn0058160
CG5481	robo2	FBgn0002543	CG4058	Nep4	FBgn0038818
CG5548	ND-B18	FBgn0030605	CG42333	Sytbeta	FBgn0261090
CG5744	Frq1	FBgn0030897	CG42450	CG42450	FBgn0259927
CG7106	lectin-28C	FBgn0040099	CG42540	CG42540	FBgn0260657
CG7272	CG7272	FBgn0036501	CG42543	Mp	FBgn0260660
CG7345	Sox21a	FBgn0036411	CG42575	NaPi-III	FBgn0260795
CG7503	Con	FBgn0005775	CG42732	SLO2	FBgn0261698
CG7727	Appl	FBgn0000108	CG42751	CG42751	FBgn0261805
CG8112	CG8112	FBgn0037612	CG42803	gpp	FBgn0264495
CG8345	Cyp6w1	FBgn0033065	CG42807	CG42807	FBgn0261989
CG8663	nrv3	FBgn0032946	CG42817	Ca-Ma2d	FBgn0261999
CG8942	NimC1	FBgn0259896	CG43079	nrm	FBgn0262509
CG9369	m	FBgn0002577	CG43224	Gfrl	FBgn0262869
CG9552	rost	FBgn0011705	CG43374	Cht6	FBgn0263132
CG9734	glob1	FBgn0027657	CG43744	bru3	FBgn0264001
CG9772	Skp2	FBgn0037236	CG43756	Slob	FBgn0264087
CG9908	disco	FBgn0000459	CG43901	CG43901	FBgn0264502
			CG44085	CG44085	FBgn0264894
			CG45017	IP3K2	FBgn0283680
			CG4587	stol	FBgn0028863
			CG5065	CG5065	FBgn0034145
			CG5295	bmm	FBgn0036449
			CG5399	CG5399	FBgn0038353
			CG5446	CG5446	FBgn0032429
			CG5481	robo2	FBgn0002543
			CG5744	Frq1	FBgn0030897
			CG6220	CG6220	FBgn0033865
			CG6330	CG6330	FBgn0039464

	CG6658	Ugt302K1	FBgn0040251
	CG6713	Nos	FBgn0011676
	CG7191	CG7191	FBgn0031945
	CG7220	CG7220	FBgn0033544
	CG7503	Con	FBgn0005775
	CG7576	Rab3	FBgn0005586
	CG7727	Appl	FBgn0000108
	CG8250	Alk	FBgn0040505
	CG8502	Cpr49Ac	FBgn0033725
	CG8663	nrv3	FBgn0032946
	CG8785	CG8785	FBgn0033760
	CG9552	rost	FBgn0011705
	CG9652	Dop1R1	FBgn0011582
	CG9717	CG9717	FBgn0039789
	CG9907	para	FBgn0285944

### Figure legends

**Figure 1. Heart-targeted *dmiR-1* attenuation causes DCM in *Drosophila*.** (A) Control (*UAS-dmiR-1 sponge*) and (B) mutant (*Hand>dmiR-1 sponge*) adult hearts from one-week-old flies labelled for F-actin (red). (A', B') Cross-sections of cardiac tubes 3D-reconstructed using Imaris software. White line shows enlargement of lumen cardiac tube in *Hand>dmiR-1 sponge* (B') in comparison to control (*UAS-dmiR-1 sponge*) (A'). M-mode records from one-week-old control (*UAS-dmiR-1 sponge*) (C) and *Hand>dmiR-1 sponge* (C') flies showing increased diastolic (green) and systolic diameters (red) in the *dmiR-1 sponge* context (C'). Diastolic (D) and systolic (E) diameters and cardiac contractility analyses (percent fractional shortening) (F) performed using SOHA approach for controls (*Hand-Gal4* and *UAS-dmiR-1 sponge*) and *Hand>sponge dmiR-1* contexts at ages one and five weeks.  $n = 20$  hearts. Scale bar = 20  $\mu\text{m}$ .  $p\text{-value} < 0.05$  considered statistically significant. (\*)  $p\text{-value} = 0.033$ , (\*\*)  $p\text{-value} = 0.021$ , (\*\*\*)  $p\text{-value} = 0.0002$ . (\*\*\*\*)  $p\text{-value} < 0.0001$ .

**Figure 2. DM1 flies develop DCM phenotype with a reduced *dmiR-1* level in cardiac cells.** Cardiac tube size (diastolic (A, D) and systolic (B, E) diameters) and contractility (percent fractional shortening (C, F)) analyses performed using SOHA approach for controls (*Hand-Gal4*, *UAS-Bru3* and *UAS-mblRNAi*) and DM1 contexts (*Hand>Bru3* and *Hand>mblRNAi*), at ages one and five weeks.  $n = 20$  hearts. (G, G') Representative spot views generated using Imaris from *in situ* hybridization with miRCURY LNA probe for *dmiR-1* and

used for quantification of *dmiR-1* levels. Spot views of *dmiR-1* in hearts of one-week-old control (*UAS-mblRNAi*) (**G**) and DM1 flies (*Hand>mblRNAi*) (**G'**) are shown. Each spot represents a pool of *dmiR-1* transcripts detected in the same area. The zoom region in **G** corresponds to area used for FISH quantifications. (**H, I**) Scatter plot graph showing the signal intensity quantified in cardioblasts of one- and five-week-old flies for controls (*UAS-Bru3*, *UAS-mblRNAi*) and DM1 contexts (*Hand>Bru3*, *Hand>mblRNAi*).  $n = 9$  hearts. Scale bar = 40  $\mu\text{m}$ .  $p\text{-value} < 0.05$  considered statistically significant. (\*)  $p\text{-value} = 0.033$ , (\*\*)  $p\text{-value} = 0.021$ , (\*\*\*)  $p\text{-value} = 0.0002$ . (\*\*\*\*)  $p\text{-value} < 0.0001$ .

**Figure 3. Multiplexin, a new cardiac *dmiR-1* target is up-regulated in DCM-developing DM1 flies.** (**A**) Up-regulated genes identified by heart-specific transcriptomic approach (TU-tagging (Auxerre-Plantié et al., 2019) in DM1 contexts developing DCM (*Hand>mblRNAi* and *Hand>Bru3*) aged of 5 weeks (top Venn diagrams). Lower Venn diagrams show DM1 up-regulated genes identified *in silico* as potential *dmiR-1* targets. (**B**) Alignment of *dmiR-1* binding site with 3'UTR region of *Multiplexin*. (**C-F'**) *dmiR-1* binding site in 3'UTR-Mp region is required to negatively regulate Mp expression *in vivo*. Adult hearts from transgenic GFP-sensor lines carrying 3'UTRMp region with (*UAS-GFP 3'UTRMp*) or without *dmiR-1* seed site (*UAS-GFP  $\Delta$ 3'UTRMp*). These lines were combined with the *UAS-dmiR1* line to generate double transgenic lines and tested for GFP expression in non-targeted context (crossed with  $w^{1118}$ ) (**C,E**) or in heart-targeted context (crossed with heart specific driver *Hand-Gal4*) (**D,F**). When crossed with *Hand-Gal4*, GFP expression in *Hand>GFP 3'UTRMp; dmiR1* line (carrying *dmiR-1* seed site) (**D'**) is attenuated in cardiac tube and pericardial cells compared to *Hand>GFP  $\Delta$ 3'UTRMp; dmiR-1* line (lacking *dmiR-1* seed site) (**F'**). Scale bar = 40  $\mu\text{m}$ . Cross sections of adult hearts from one- and five-week-old controls (*UAS-mblRNAi*, *UAS-Bru3*) (**G,H,I,J**) and DM1 contexts (*Hand>mblRNAi*, *Hand>Bru3*) (**G',H',I',J'**) labelled for Mp (green). Highlighted regions in **G** correspond to areas used for quantifications of the fluorescent signals. (**K,L**) Graphs of Mp signal quantification in cardioblasts from adult flies aged one and five weeks for controls (*UAS-mblRNAi*, *UAS-Bru3*) and DM1 contexts (*Hand>mblRNAi*, *Hand>Bru3*) using CTCF method.  $n = 9$  hearts. Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ .  $p\text{-value} < 0.05$  considered statistically significant. (\*)  $p\text{-value} = 0.033$ , (\*\*)  $p\text{-value} = 0.021$ , (\*\*\*)  $p\text{-value} = 0.0002$ . (\*\*\*\*)  $p\text{-value} < 0.0001$ .

**Figure 4. Heart-targeted Mp overexpression leads to DCM.** Adult hearts from one-week-old flies (**A,A',B,B'**) and their cross sections (**C,C',D,D'**) labelled for Mp (green) and actin

(red) for controls (*UAS-Mp*) and Mp overexpression context (*Hand>Mp*). Cardiac variables (diastolic (E) and systolic (F) diameters) and percent fractional shortening (G) for controls (*Hand-Gal4* and *UAS-Mp*) and Mp overexpression (*Hand>Mp*) conditions at one and five weeks of age showing increase in diastolic and systolic diameters with reduced cardiac contractility in *Hand>Mp* in comparison to controls.  $n = 20$  hearts. Scale bar = 5  $\mu\text{m}$ . M-modes representing cardiac variables in five-week-old control (*UAS-Mp*) (H) and Mp-overexpressing (*Hand>Mp*) (H') flies. (I) Scheme presenting cardiac role of *dmiR-1* and its target *Mp* in DCM-developing *Drosophila* DM1 models. In wild-type *Drosophila* heart *mb1* promotes *pre-dmiR-1* processing. *Bru3* has potential antagonistic role in the destabilisation of *dmiR1*. As a result, in this context *dmiR-1* and its target *Mp* levels are moderate. In DM1, *mb1* is sequestered and *Bru3* is stabilised, causing inefficient processing of *pre-dmiR1* and destabilisation of mature *dmiR-1*. As a result, in the DM1 context, the *dmiR-1* level is reduced while its target *Mp* level is high. This leads to an enlarged heart with adversely affected contractility and myofibrillar disarray in the heart tubes.  $p\text{-value} < 0.05$  considered statistically significant. (\*)  $p\text{-value} = 0.033$ , (\*\*)  $p\text{-value} = 0.021$ , (\*\*\*)  $p\text{-value} = 0.0002$ . (\*\*\*\*)  $p\text{-value} < 0.0001$ .

**Figure 5. Increased cardiac expression of human Mp ortholog Col15A1 is associated with DCM in DM1 patients.** (A) *Col15A1* transcript levels tested by RT-qPCR and (B) *Col15A1* protein levels tested by Western blot in cardiac samples from healthy donors and from DM1 patients with (DCM+) and without DCM (DCM-). Cardiac variables (diastolic (C) and systolic (D) diameters and percent fractional shortening (E)) assessed by SOHA approach for controls (*UAS-Bru3; Mp RNAi* and *UAS-UPRT; Bru3*), Mp rescue (*Hand>Bru3; Mp RNAi*) and DM1 context (*Hand>UPRT; Bru3*) at five weeks of age showing rescue of diastolic and systolic diameters in *Hand>Bru3; Mp RNAi* in comparison to controls (C,D) with rescue of cardiac contractility (E).  $n = 20$  hearts. Cross-sections of cardiac tubes 3D-reconstructed using Imaris software from five-week-old control (*UAS-Bru3; MpRNAi*) (F), DM1 (*Hand>Bru3;UPRT*) (G) and Mp rescue (*Hand>Bru3; Mp RNAi*) (H) flies labeled for actin. The white line shows the diameter of the heart tube lumen. Scale bar = 20  $\mu\text{m}$ .  $p\text{-value} < 0.05$  considered statistically significant. (\*)  $p\text{-value} = 0.033$ , (\*\*)  $p\text{-value} = 0.021$ , (\*\*\*)  $p\text{-value} = 0.0002$ . (\*\*\*\*)  $p\text{-value} < 0.0001$ .

Figure 1

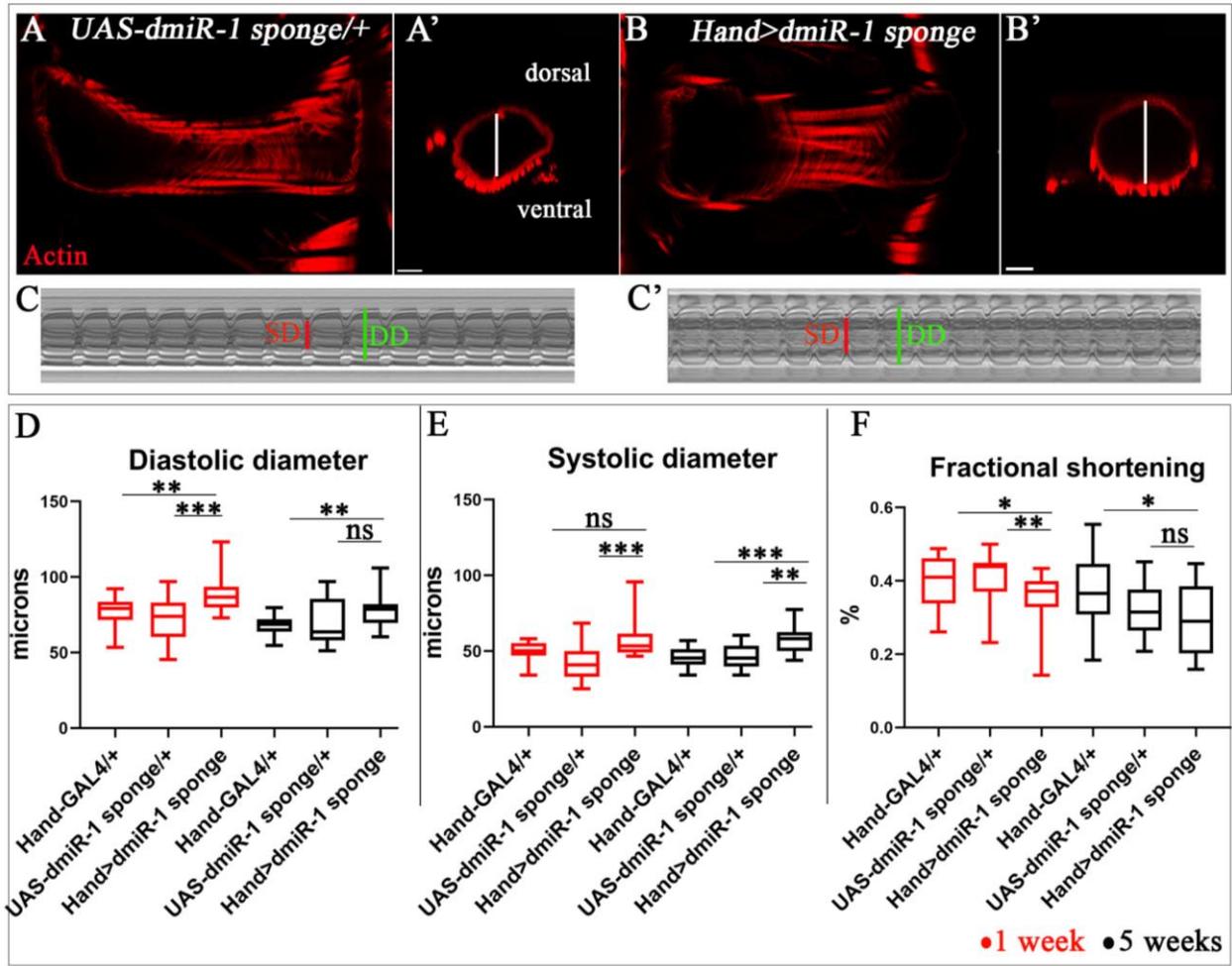


Figure 2

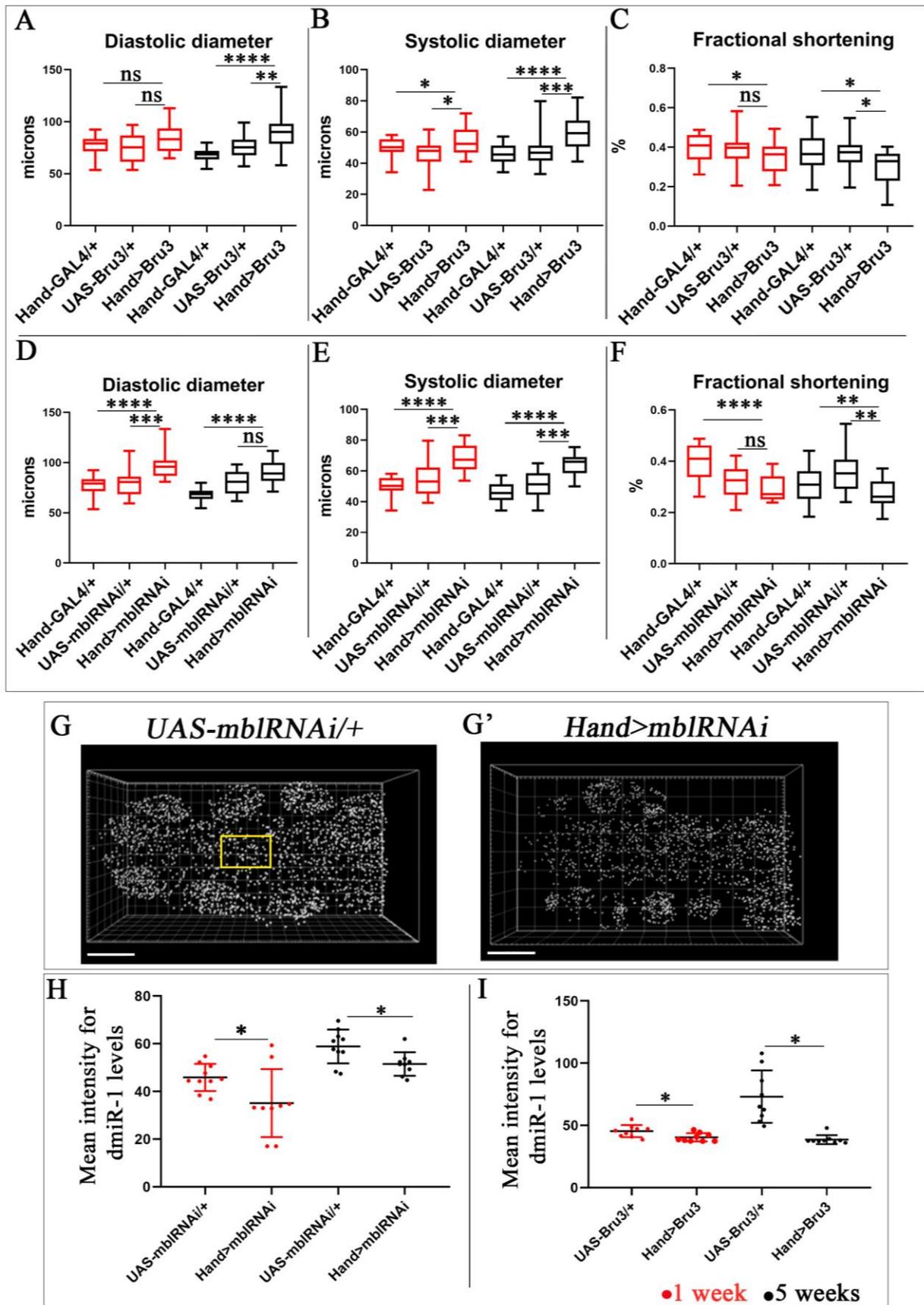


Figure 3

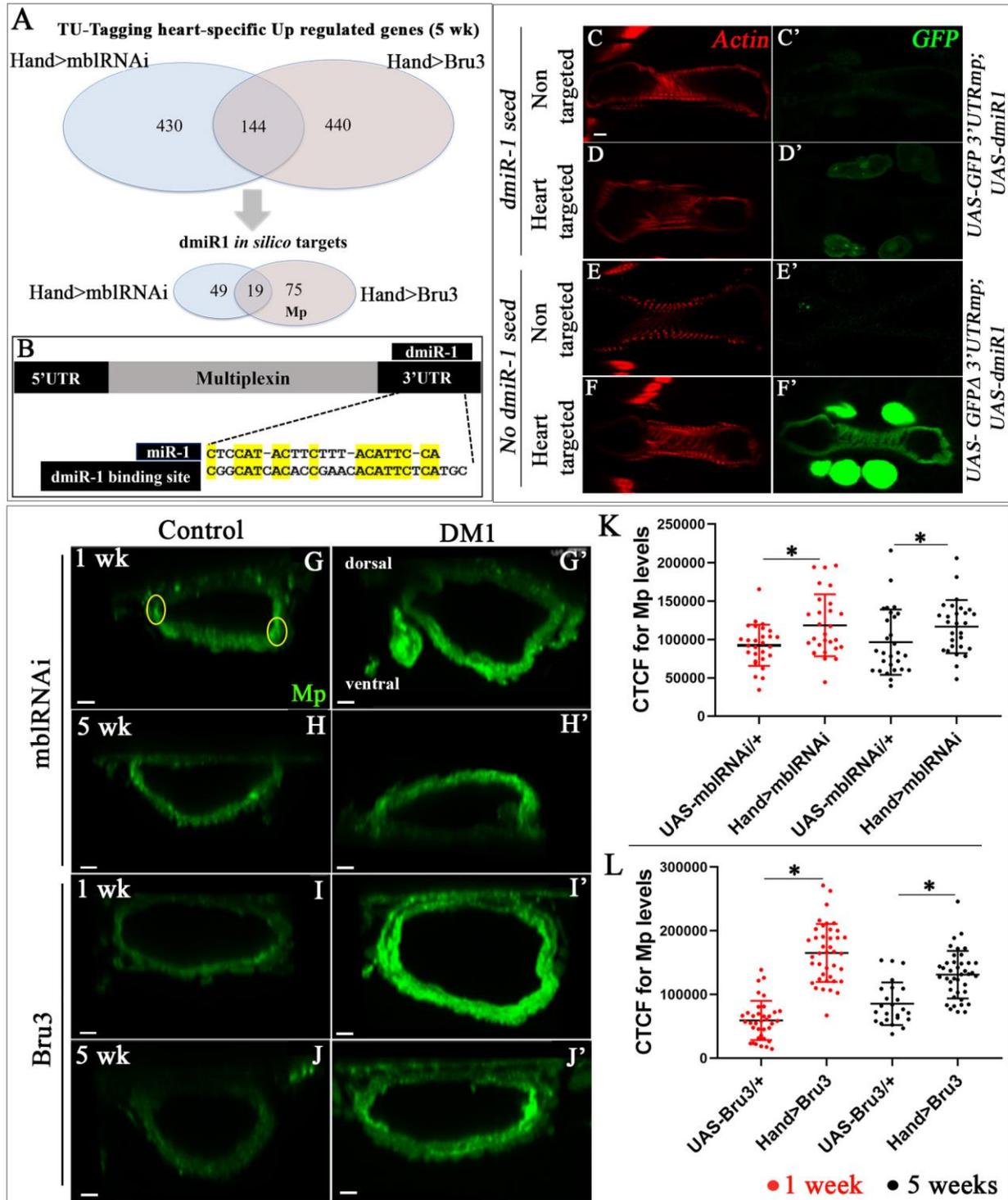


Figure 4

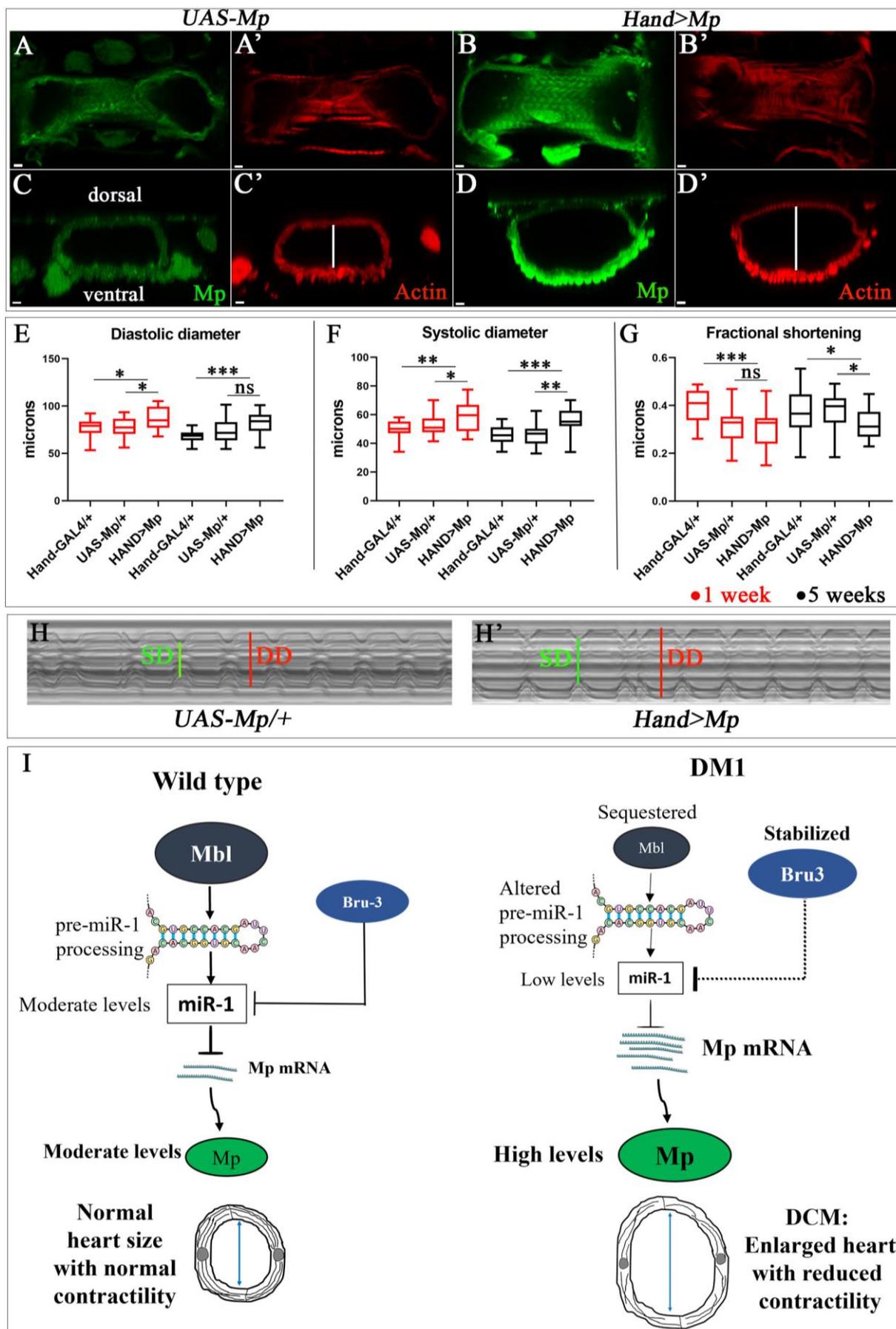
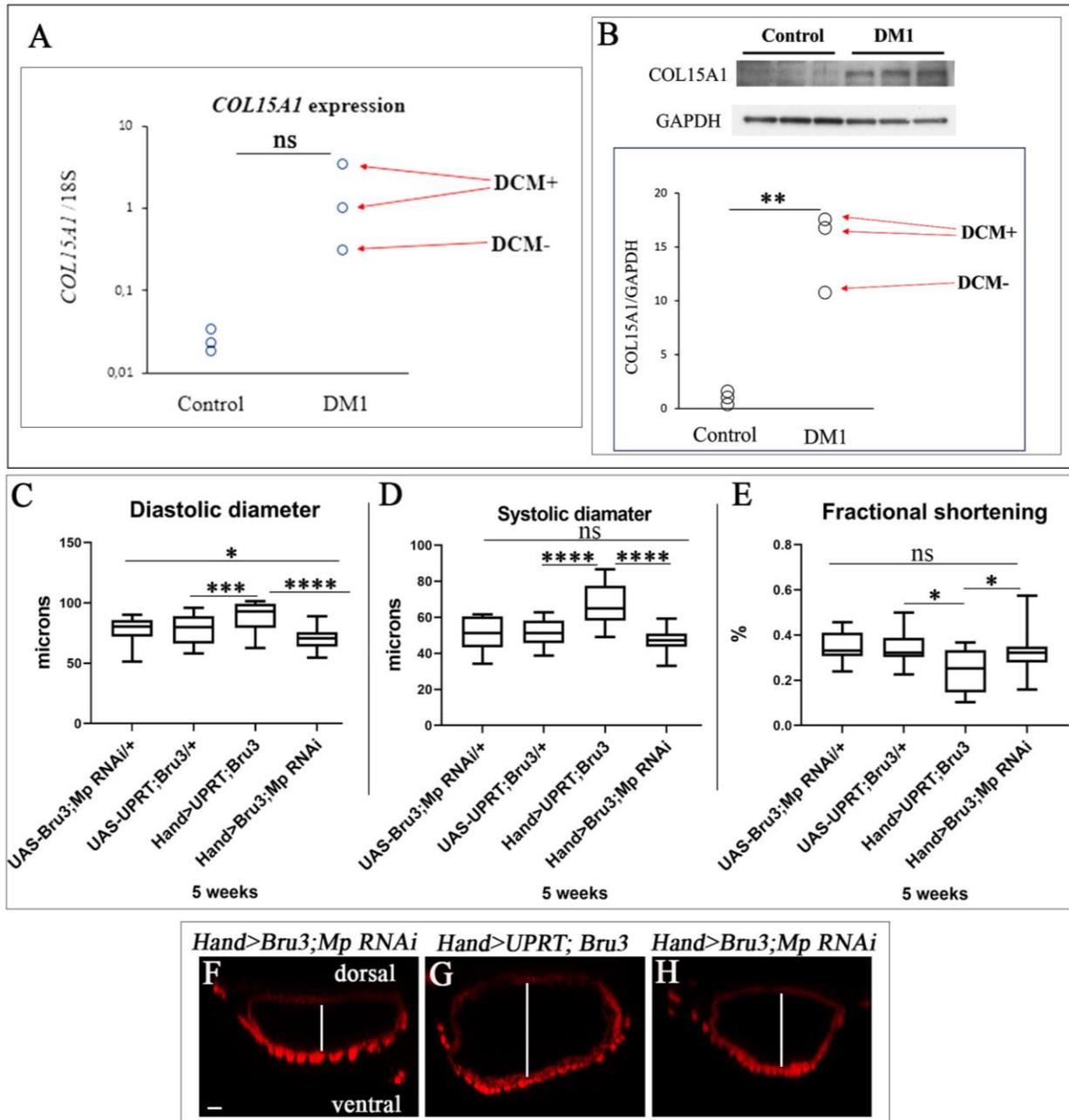


Figure 5



### Legends to Supplementary Figures

**Figure S1. Flies showing DCM present myofibrillar disarray in the heart tubes.** Cardiac z stack projection from hearts of controls (*UAS-mblRNAi*, *UAS-Bru3*, *UAS-dmiR-1 sponge* and *UAS-Mp*) (A,B,C,D) and mutants (*Hand>mblRNAi*, *Hand>Bru3*, *Hand>dmiR-1 sponge* and *Hand>Mp*) (A',B',C',D') aged of 5 weeks. The arrows show irregularity in myofibrillar density and arrangement in the heart tubes. Scale bar = 20  $\mu\text{m}$ .

**Figure S2. Aged *Hand>960CTG* flies develop cardia dilation.** Cardiac size analyzes (diastolic (A) and systolic (B) diameters) and percent fractional shortening (C) performed by SOHA approach for controls (*Hand-Gal4* and *UAS-960CTG*) and mutant (*Hand>960CTG*) at 1 and 5 weeks of age. Aged *Hand>960CTG* flies present cardiac dilation characterized by significant increase in diastolic and systolic diameters in comparison to control *Hand>Gal4* (A,B).  $n = 20$  hearts.  $p\text{-value} < 0.05$  considered statistically significant. (\*)  $p\text{-value} = 0.033$ , (\*\*)  $p\text{-value} = 0.021$ , (\*\*\*)  $p\text{-value} = 0.0002$ . (\*\*\*\*)  $p\text{-value} < 0.0001$ .

**Figure S3. DM1 flies show reduced levels of *dmiR-1* in cardiac cells.** FISH for scramble (5' 3' DIG) (A') and U6 (5'DIG) (B') detected in  $w^{1118}$  cardiac tube. FISH with miRCURY LNA probe for *dmiR-1* detection in controls (*UAS-dmiR1*, *UAS-mblRNAi*, *UAS-Bru3*) (C',E',G') and mutants (*Hand>dmiR-1*, *Hand>mblRNAi*, *Hand>Bru3*) (D',F',H') cardiac tubes labelled with *dmiR-1* probes (red) and actin (green) at 1 week of age. Representative spot views generated using Imaris from *in situ* hybridization with miRCURY LNA probe for *dmiR-1* and used for quantification of *dmiR-1* levels. Spot views of *dmiR-1* in hearts of one-week-old control (*UAS-mblRNAi*) (I) and DM1 (*Hand>mblRNAi*) flies (I') are shown. Each spot represents a pool of *dmiR-1* transcripts detected in the same area. The zoom area in I and I' corresponds to pericardial cells. (J,K) Scatter plot graph showing the signal intensity of *dmiR-1* levels quantified in pericardial cells of one- and five- week-old flies for controls (*UAS-Bru3*, *UAS-mblRNAi*) and DM1 contexts (*Hand>Bru3*, *Hand>mblRNAi*).  $n = 27$  pericardial cells. Scale bar = 40  $\mu\text{m}$ .  $p\text{-value} < 0.05$  considered statistically significant. (\*)  $p\text{-value} = 0.033$ , (\*\*)  $p\text{-value} = 0.021$ , (\*\*\*)  $p\text{-value} = 0.0002$ . (\*\*\*\*)  $p\text{-value} < 0.0001$ .

**Figure S4. Supplemental analyses of *miR-1*.** Cardiac size analyzes (diastolic (A) and systolic (B) diameters) and percent fractional shortening (C) performed by SOHA approach for control  $w^{1118}$  and heterozygous mutant context (*dmiR-1 KO/+*) at 1 and 5 weeks of age.

Aged *Hand>dmiR-1 KO-/+* flies present cardiac dilation characterized by significant increase in diastolic and systolic diameters in comparison to control. n=20 hearts. **(D,E)** RTq-PCR analysis for *pre-dmiR1* transcript in adult heart of 1 and 5 weeks of age for control (*Hand>LacZ*) and DM1 contexts (*Hand>mblRNAi*, *Hand>Bru3*). n= 4 biological replicates. **(F)** Alignment of *Drosophila* and human *miR-1* sequences. **(G)** Potential binding site of human *miR-1* in 3'UTR of *COL15A1* (*COL15A1-201* transcript position 4428 to 4447). *p-value*<0.05 considered statistically significant. (\*) *p-value* = 0.033, (\*\*) *p-value* =0.021, (\*\*\*) *p-value* =0.0002. (\*\*\*\*) *p-value*<0.0001.

**Figure S5. Mp is expressed in the adult fly heart and up-regulated in pericardial cells of DCM-developing DM1 lines.** **(A)** Adult heart of *w<sup>1118</sup>* line labeled for Mp (green), actin (red) and DAPI (blue). **(C)** The yellow arrows indicate ventral longitudinal muscles (VLM). **(C')** The yellow arrows indicate circular fibers (within cardioblast cells). **(A'', B'')** Cross section of *w<sup>1118</sup>* cardiac tube after 3D reconstruction with Imaris software, showing expression of Mp at the internal and the external surface of cardiac tube. Adult heart of 1 and 5 weeks of age labeled for Mp (green) for controls (*UAS-mblRNAi*, *UAS-Bru3*) **(D,E,F,G)** and DM1 context (*Hand>mblRNAi*, *Hand>Bru3*) **(D',E',F',G')**. Encircled region in **E'** corresponds to an example of area used for quantifications of the fluorescent signal in pericardial cells using CTCF method. **(H,I)** Fluorescence signal intensity quantification for Mp expression in pericardial cells in adult heart of 1 and 5 weeks of age for controls (*UAS-mblRNAi*, *UAS-Bru3*) and DM1 context (*Hand>mblRNAi*, *Hand>Bru3*) using CTCF method. Scale bar = 20µm. **(J)** Fluorescence signal intensity quantification for Mp expression in cardioblasts in adult heart of one week of age for control (*UAS-dmiR-1 sponge*) and mutant (*Hand>dmiR-1 sponge*) using CTCF method. *p-value*<0.05 considered statistically significant. (\*) *p-value* = 0.033, (\*\*) *p-value* =0.021, (\*\*\*) *p-value* =0.0002. (\*\*\*\*) *p-value*<0.0001.

**Figure S6. Mp loss of function leads to reduced heart size.** Adult heart of 1 week of age labeled for Mp (green) and actin (red) for control (*UAS-Mp RNAi*) **(A,A')** and mutant (*Hand>Mp RNAi*) contexts **(B,B')**. **(C)** Fluorescence signal intensity quantification for Mp expression in cardioblasts in adult heart of 1 week for control (*UAS-Mp RNAi*) and mutant (*Hand>Mp RNAi*) contexts using CTCF method. Cardiac size analyzes (diastolic **(D)** and systolic diameters **(E)**) and percent fractional shortening **(F)** performed by SOHA approach for controls (*Hand>Gal4* and *UAS-Mp RNAi*) and mutant (*Hand>Mp RNAi*) contexts at 1 and 5 weeks of age, showing reduced size of cardiac tube when attenuated Mp characterized by

reduced diastolic and systolic diameters of *Hand>Mp RNAi* in comparison to the control *Hand>Gal4*.  $n = 20$  hearts. Scale bar =  $20\mu\text{m}$ .  $p\text{-value} < 0.05$  considered statistically significant. (\*)  $p\text{-value} = 0.033$ , (\*\*)  $p\text{-value} = 0.021$ , (\*\*\*)  $p\text{-value} = 0.0002$ . (\*\*\*\*)  $p\text{-value} < 0.0001$ .

**Figure S7. The young DM1 flies present normal heart size.** Cardiac size analyzes (diastolic (A) and systolic (B) diameters) and percent fractional shortening (C) performed by SOHA approach for controls *UAS- Bru3; Mp RNAi* and *UAS-UPRT; Bru3* and Mp rescue (*Hand>Bru3; Mp RNAi*) and DM1(*Hand>UPRT; Bru3*) at 1 week of age.  $n = 20$  hearts.  $p\text{-value} < 0.05$  considered statistically significant. (\*)  $p\text{-value} = 0.033$ , (\*\*)  $p\text{-value} = 0.021$ , (\*\*\*)  $p\text{-value} = 0.0002$ . (\*\*\*\*)  $p\text{-value} < 0.0001$ .

**Figure S1**

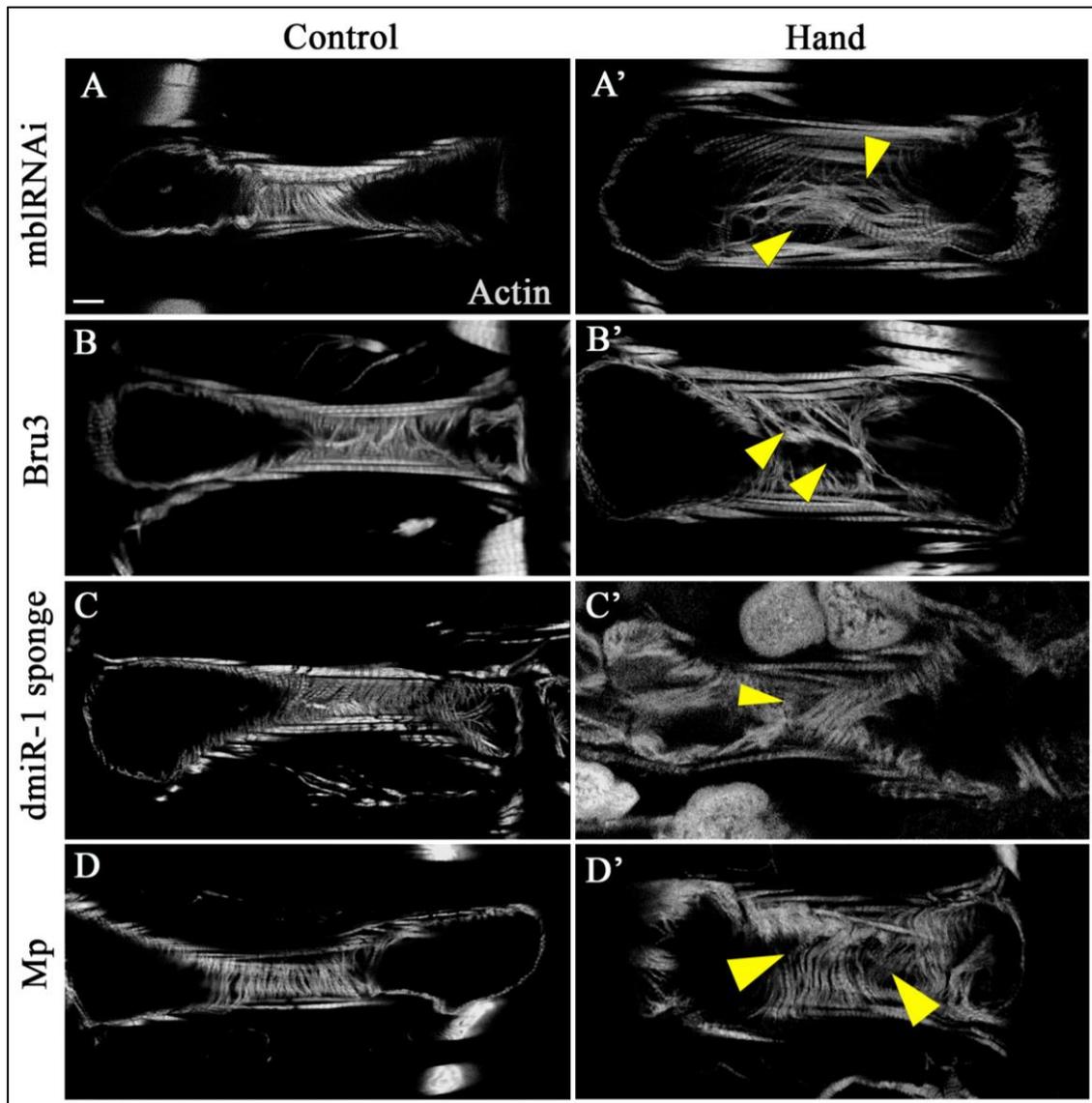


Figure S2

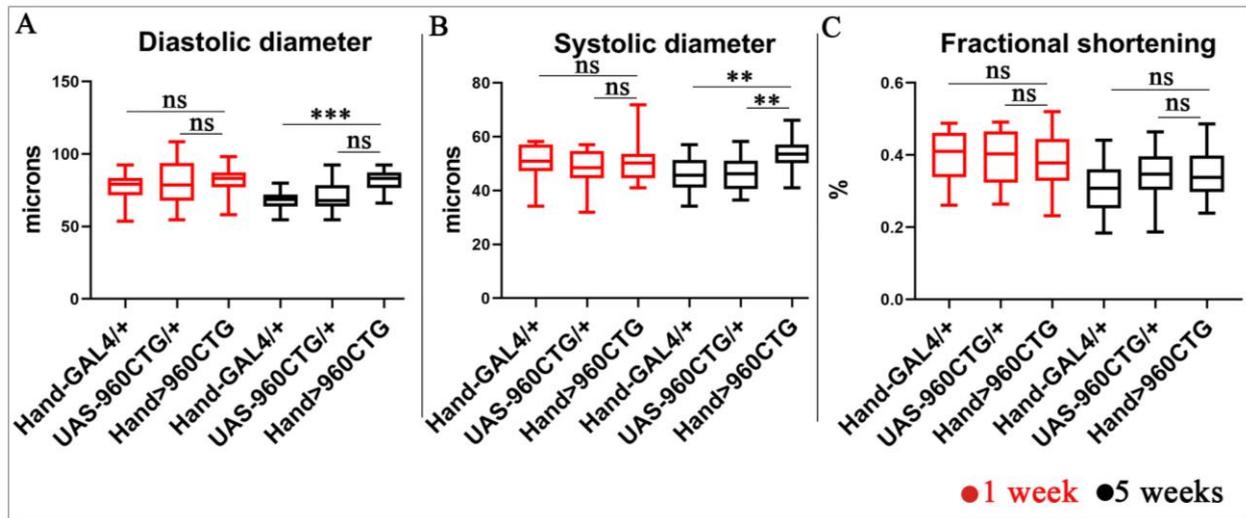


Figure S3

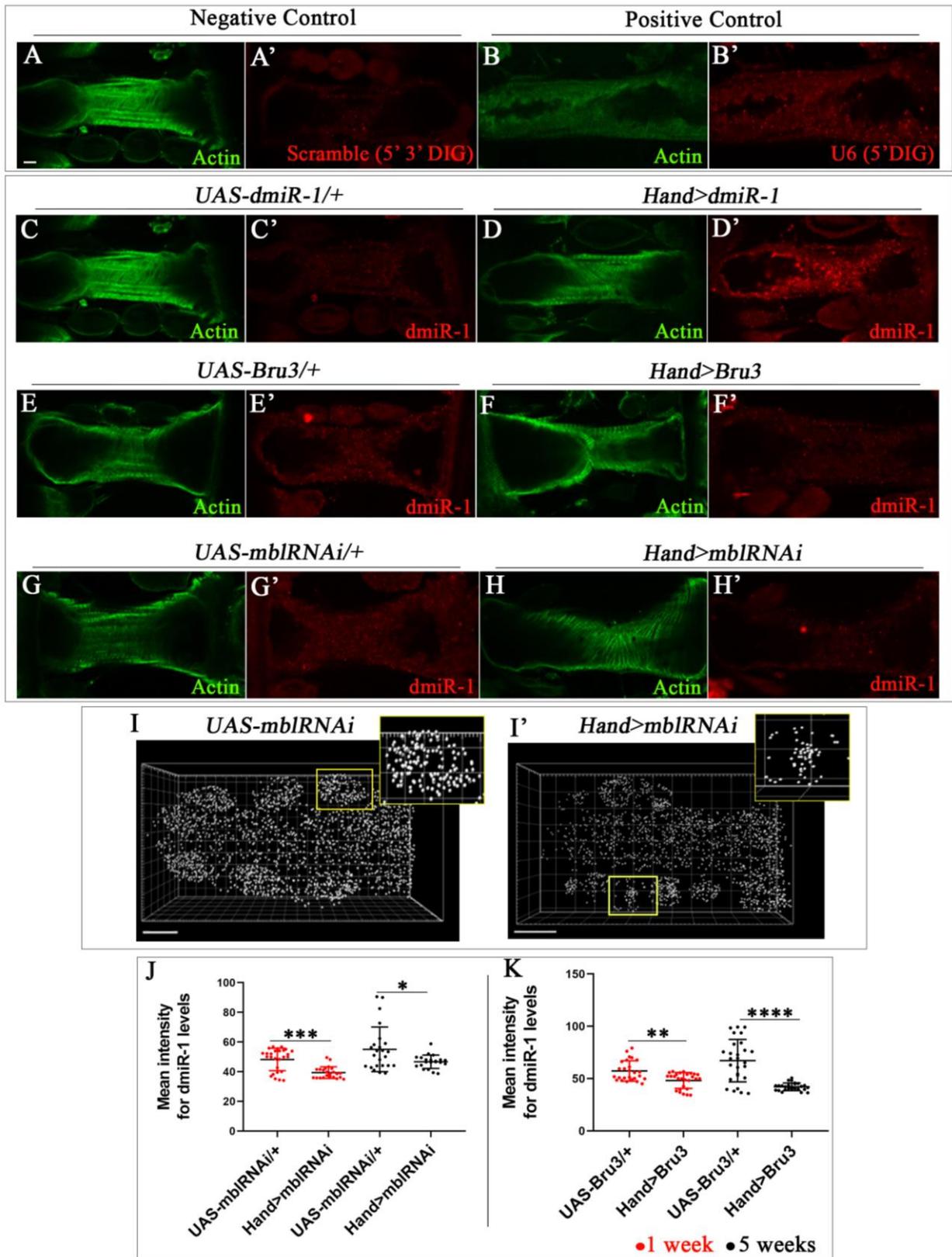


Figure S4

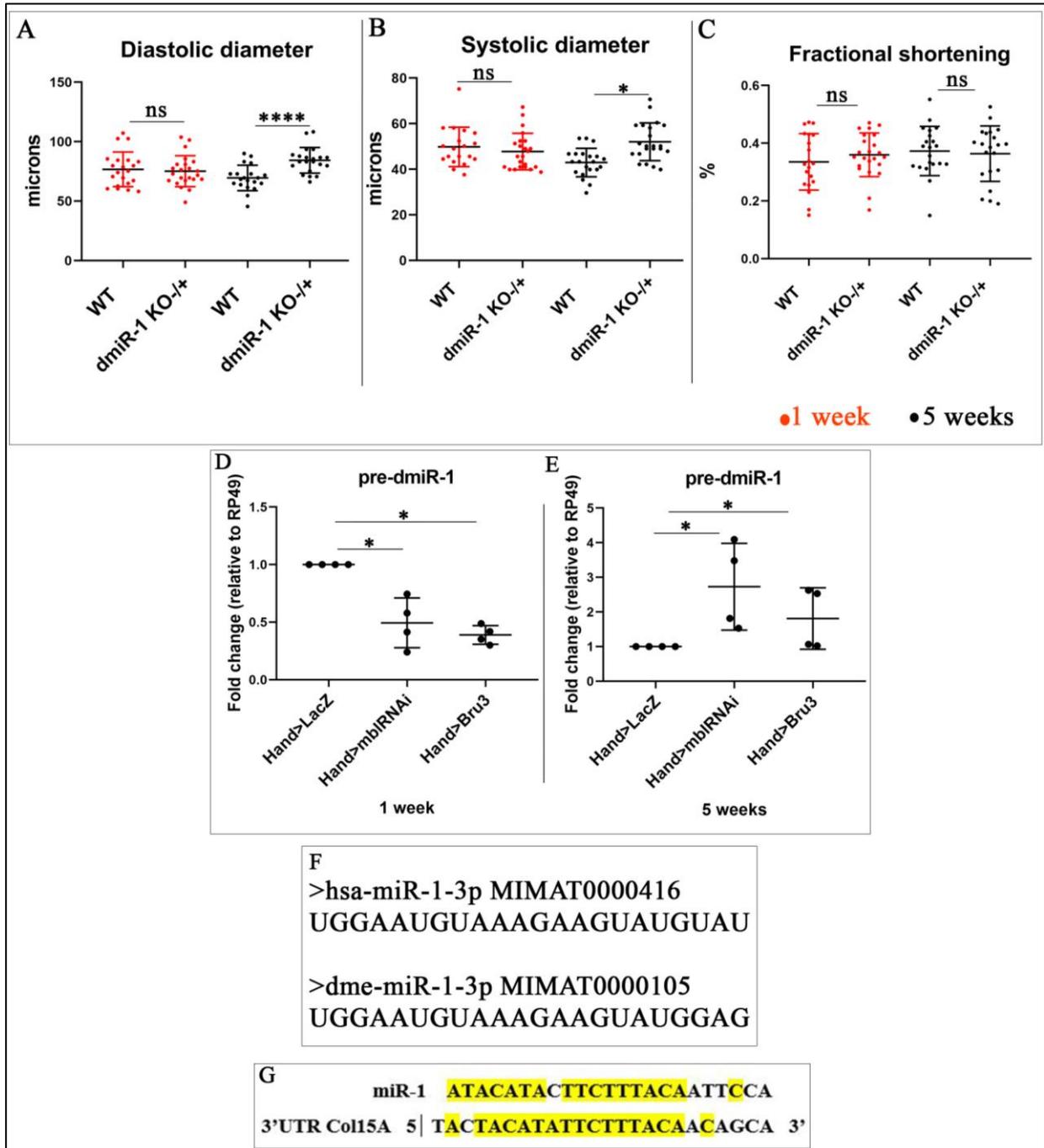


Figure S5

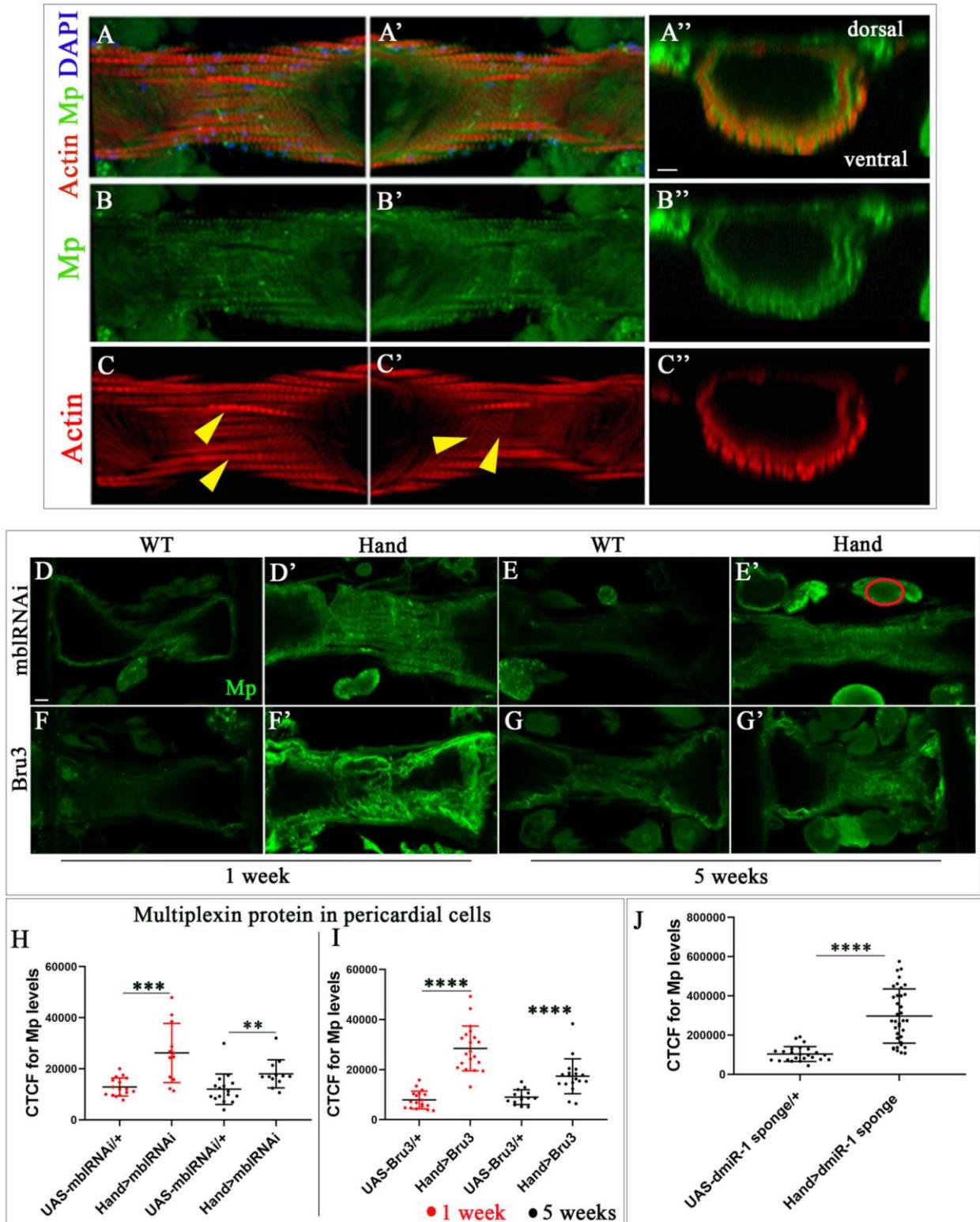


Figure S6

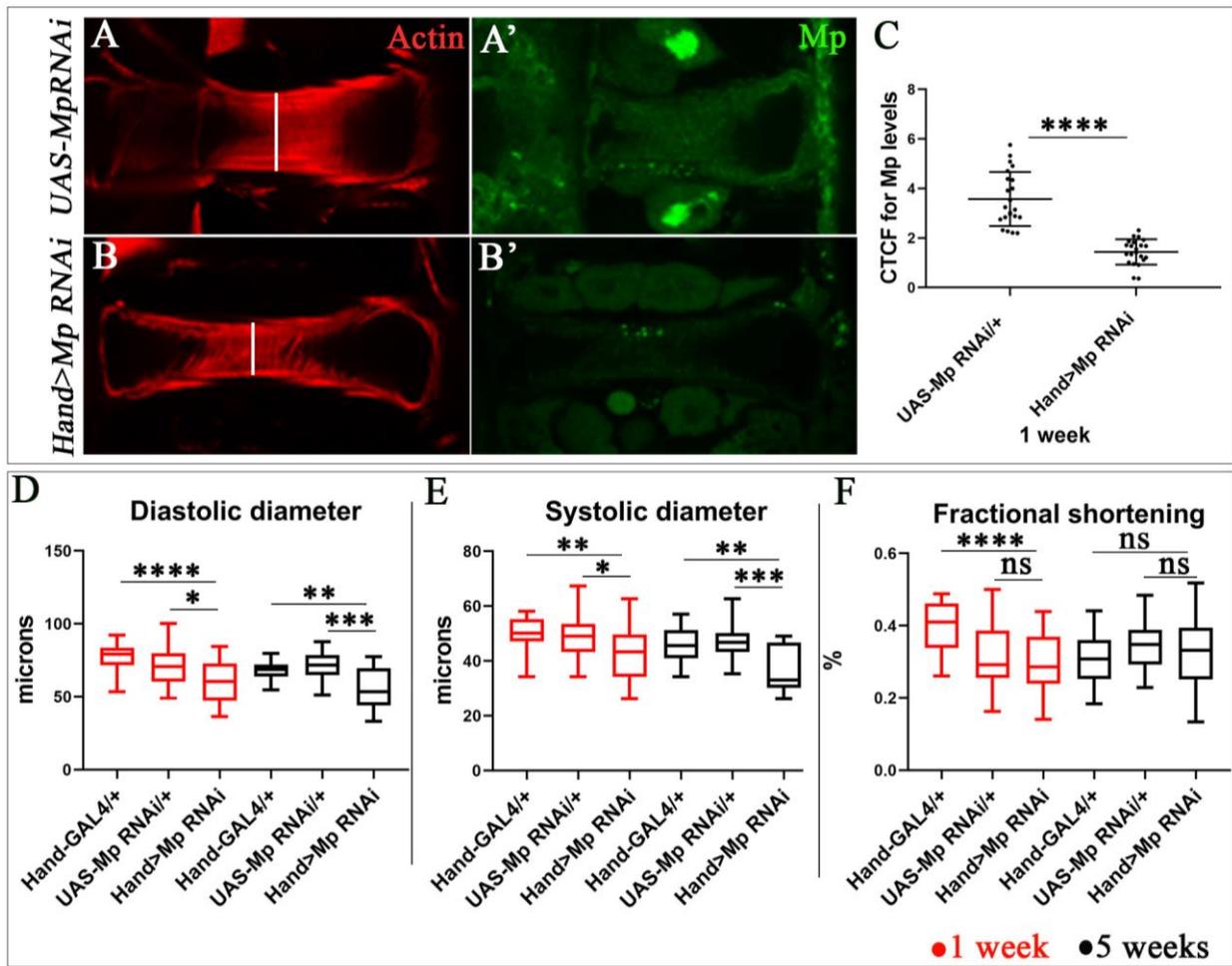
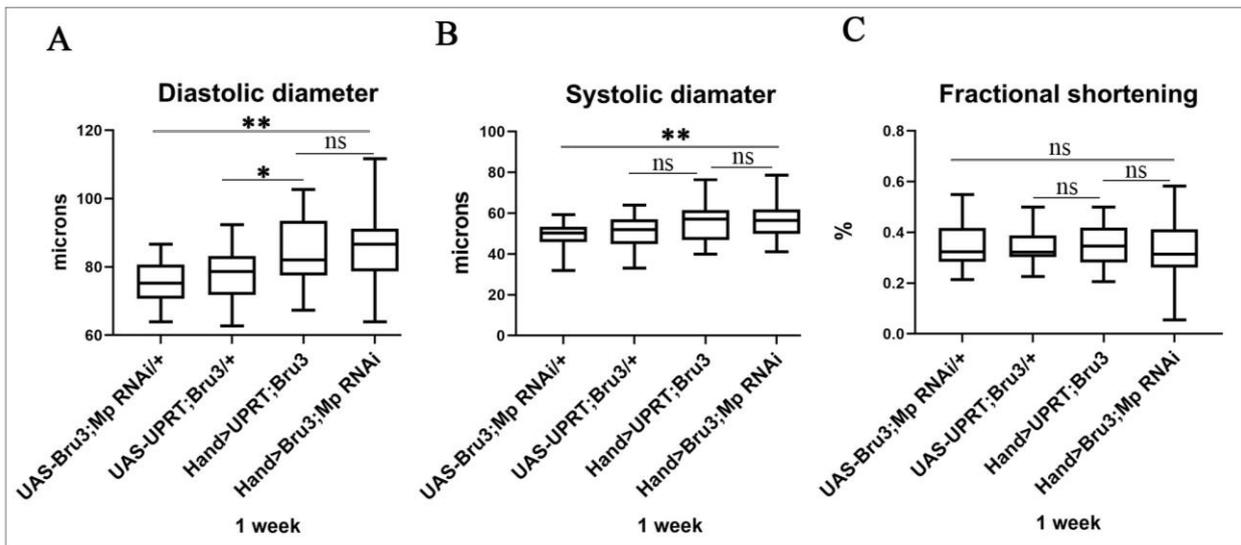


Figure S7



Les résultats décrits dans cet article ont permis de mettre en évidence la surexpression de *Mp* comme un nouveau facteur dérégulé via 3'UTR et impliqué dans la cardiomyopathie dilatée dans les deux modèles DM1: *Hand>Bru3* et *Hand>mblARNi*. Cette surexpression est due en grande partie au lever de la répression de son expression par *dmiR-1* parce que ce dernier est retrouvé faiblement exprimé dans les deux modèles de Drosophile DM1.

Je présente dans le chapitre suivant mes résultats complémentaires non publiés et qui seront divisés en deux parties :

- La première partie concerne l'implication de *Bru3* dans la régulation de l'expression de *Mp* via 3'UTR
- La deuxième partie concerne l'implication de *Mp* dans d'autres phénotypes cardiaques observés dans la DM1.

## II. Résultats complémentaires non publiés

### 1. Implication de *Bru3* dans la régulation de l'expression de *Mp* via 3'UTR

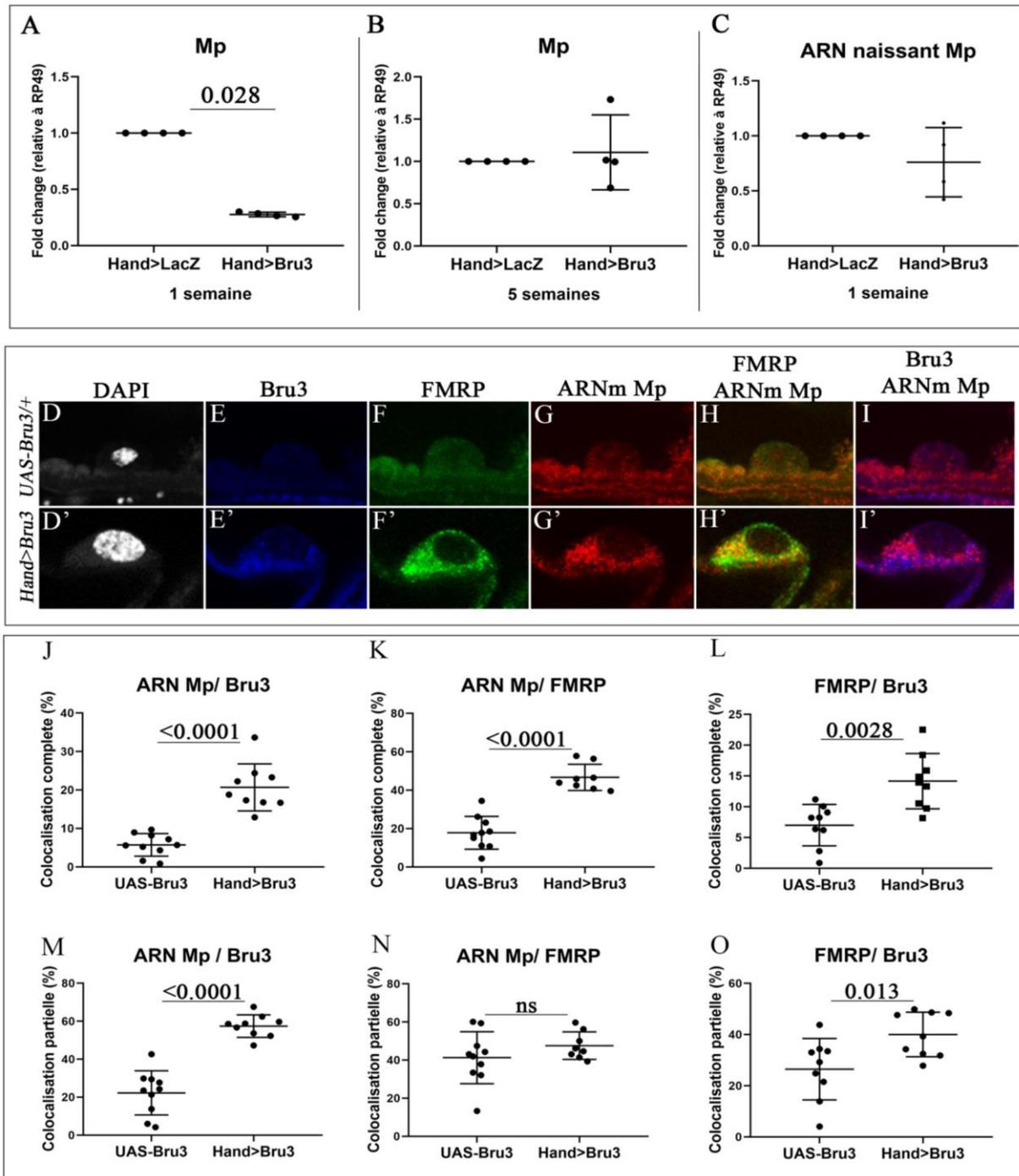
Nos résultats d'immunomarquage montrent que *Mp* est surexprimée dans le cœur des mouches jeunes et âgées des deux lignées *Hand>mblARNi* et *Hand>Bru3* (Figure 3 de l'article). Dans la lignée *Hand>mblARNi*, la surexpression de *Mp* est probablement due à l'atténuation de *mbl* et la diminution de *dmiR-1* fonctionnel, un mécanisme conservé entre la Drosophile et l'Homme. Cependant, dans la lignée *Hand>Bru3* ce mécanisme n'est pas confirmé.

Afin de déterminer si la surexpression de la protéine *Mp* observée dans le modèle surexprimant *Bru3* est corrélée à une activation de la transcription du gène *Mp*, nous avons quantifié les transcrits *Mp* cardiaques par RT-qPCR. À l'âge d'une semaine, nous observons que les niveaux des transcrits *Mp* sont significativement réduites dans le cœur des mouches *Hand>Bru3* en comparaison avec le contrôle *Hand>LacZ* (Figure 16 A) mais à 5 semaines d'âge, aucun changement au niveau des transcrits de *Mp* n'a été observé (Figure 16 B). Ces résultats suggèrent que les niveaux élevés de la protéine *Mp* observés par immunomarquage dans le cœur des mouches *Hand>Bru3* (Figure 3 de l'article) sont indépendants de la transcription du gène *Mp*. Cela nous a permis de supposer que l'expression de *Mp* dans ce contexte est régulée par un mécanisme post-transcriptionnel. Les niveaux faibles observés des transcrits *Mp* dans le cœur des mouches surexprimant *Bru3* (*Hand>Bru3*) âgées d'une

semaine, accompagnés d'une augmentation significative des niveaux de la protéine Mp, suggèrent que la surexpression de Bru3 affecte la traduction et / ou la stabilité de l'ARNm *Mp*. Cette hypothèse est renforcée par plusieurs données ultérieures.

Tout d'abord, nous avons révélé par une analyse *in silico* un enrichissement des sites de liaison de Bru3 dans la région 3'UTR *Mp* suggérant une régulation potentielle de l'expression de *Mp* par Bru3 via 3'UTR. En plus, une étude menée dans notre équipe par Lucie Picchio sur le muscle larvaire de la mouche a montré que Bru3 se lie aux régions 3'UTR de ses transcrits cibles, y compris les transcrits d'*Actinine* (*Actn*), et régule leur stabilité et leur traduction dans les muscles somatiques larvaires. Dans les muscles somatiques larvaires normaux, les transcrits sarcomériques *Actn* sont exportés des noyaux vers le sarcoplasme et ils sont stockés dans des complexes cytoplasmiques de ribonucléoprotéines (RNP) appelés « P-bodies ». Ces granules sont composées des facteurs impliqués dans la dégradation des ARNm, le contrôle de la traduction et l'interférence par les miARN (Courel et al., 2018). Cependant, dans les muscles somatiques larvaires DM1, l'augmentation de niveau de la protéine Bru3 cytoplasmique associée aux granules de P-bodies facilite la libération des transcrits d'*Actn* à partir de ces structures de stockage et favorise leur traduction ultérieure conduisant à l'accumulation de la protéine Actn. En parallèle de cette activation de la traduction, Bru3 associée aux sarcomères favorise la dégradation de l'ARNm *Actn* une fois qu'il est traduit conduisant à la réduction des niveaux d'ARNm *Actn* (Picchio et al., 2018). En se basant sur ce modèle expliquant le rôle double de Bru3 dans l'activation de la traduction ainsi que dans la dégradation de ses transcrits cibles, et en prenant en compte nos résultats montrant un niveau faible d'ARNm *Mp* et un niveau élevé de la protéine Mp dans le cœur de mouches surexprimant Bru3, nous avons supposé que dans le cœur de mouche jeunes *Hand>Bru3*, le facteur Bru3 se fixe sur les régions 3'UTR des transcrits *Mp* et favorise leur libération à partir des P-bodies. Bru3 transporte les ARNm *Mp* vers les ribosomes dans le cytoplasme où ils vont être traduits en protéines rapidement. Une fois que les ARNm *Mp* sont traduits, Bru3 favorise leur dégradation rapide.

Pour confirmer cette hypothèse, dans un premier temps, j'ai testé la colocalisation entre les transcrits *Mp*, le facteur Bru3 et les granules de P-bodies au niveau des cardioblastes. Nous avons effectué une hybridation *in situ* à molécule unique Stellaris pour détecter les transcrits de *Mp* dans les cardioblastes, suivi d'un double marquage en utilisant des anticorps contre Bru3 et aussi des anticorps contre le marqueur de P-bodies (FMRP) (Figure 16 D-I').



**Figure 16 : Le rôle de Bru3 dans la régulation de Mp.** Analyse RT-qPCR des ARNm *Mp* dans le tissu cardiaque du contrôle *Hand>LacZ* et *Hand>Bru3* à l'âge d'1 (A) et de 5 (B) semaines. (C) Analyse RT-qPCR des transcrits naissants de *Mp* dans le tissu cardiaque du contrôle *Hand>LacZ* et *Hand>Bru3* à l'âge d'1 semaine (n= 4 répliques biologiques). Immunomarquage de Bru3 (E,E'), FMRP (F,F'), et marquage par hybridation *in situ* des ARNm *Mp* (G,G') et colocalisation entre ARNm *Mp* et FMRP (H,H') et entre ARNm *Mp* et Bru3 (I,I') dans un cardioblaste du contrôle *UAS-Bru3* et du *Hand>Bru3* à l'âge d'1 semaine. Quantification de la colocalisation complète entre ARNm *Mp*/ Bru3 (J), ARNm *Mp*/ FMRP (K), FMRP/ Bru3 (L). Quantification de colocalisation partielle entre ARNm *Mp*/ Bru3 (M), ARNm *Mp*/ FMRP (N), FMRP/ Bru3 (O).

Dans les cardioblastes de *Drosophiles WT*, nous avons observé que la protéine Bru3 est faiblement exprimée et détectée dans le cytoplasme d'une manière diffuse (Figure 16 E). Nous avons observé aussi que les transcrits de *Mp* et la protéine FMRP sont exprimés de manière dispersée dans le cytoplasme des cardioblastes (Figure 16 F,G). Cependant dans les cardioblastes de la lignée *Hand>Bru3*, nous observons une augmentation de l'intensité du signal de Bru3 dans le cytoplasme des cardioblastes et surtout autour des noyaux (Figure 16E'). De manière surprenante, la FMRP est détectée sous forme de grands agrégats cytoplasmiques avec une intensité très forte autour des noyaux (Figure 16 F'). L'ARNm *Mp* est détecté autour des noyaux (Figure 16 G'), dans des agrégats colocalisés avec FMRP (Figure 16 H') et co-exprimant en partie le facteur Bru3 (Figure 16 I'), ce qui suggère une interaction entre ces trois composants Bru3, FMRP et l'ARNm *Mp*.

Pour confirmer l'effet de la surexpression de Bru3 sur la localisation de l'ARNm *Mp* dans les granules de P-bodies, nous avons quantifié la colocalisation entre l'ARNm *Mp*, et les deux facteurs FMRP et Bru3 en 3D à l'aide du logiciel Imaris. Nous avons effectué trois mesures :

- a) La première mesure consiste à quantifier la colocalisation entre l'ARNm *Mp* et le facteur Bru3, suggérant une éventuelle interaction directe entre eux.
- b) La deuxième mesure consiste à quantifier la colocalisation entre l'ARNm *Mp* et le facteur FMRP suggérant le stockage de l'ARNm *Mp* dans les granules de P-bodies.
- c) La troisième mesure consiste à la quantification de la colocalisation entre les deux facteurs FMRP et Bru3 suggérant l'association de Bru3 avec les granules de P-bodies.

A cause de la limite technique du logiciel utilisé, la colocalisation entre les trois composants : ARNm *Mp*, Bru3 et FMRP en même temps n'a pas pu être quantifiée.

Pour raffiner nos résultats encore plus, nous avons subdivisé les colocalisations observées dans les cardioblastes en deux types :

- a) Lorsque la distance entre deux composants (ARNm *Mp*/ FMRP ou Bru3/ FMRP) est supérieure à 0.5  $\mu\text{m}$ , nous avons considéré cette colocalisation comme « partielle » ce qui pourrait représenter l'entrée de l'ARNm *Mp* ou du facteur Bru3 dans les granules de P-bodies et/ ou leur libération vers le cytoplasme.
- b) Lorsque la distance entre deux composants (ARNm *Mp*/ FMRP ou Bru3/ FMRP) est inférieure à 0.5  $\mu\text{m}$ , nous avons considéré cette colocalisation comme « complète » ce qui pourrait représenter une association de l'ARNm *Mp* ou Bru3 avec les P-bodies.

Nous avons constaté que dans le cœur de la lignée *Hand>Bru3* âgée d'une semaine, 20% de l'ARNm *Mp* colocalise complètement avec Bru3 contre 5% dans le contrôle (*UAS-Bru3*) (Figure 16 J). Cette observation suggère une interaction entre les transcrits de *Mp* et le facteur Bru3 au niveau du cytoplasme.

Concernant la localisation de l'ARNm *Mp* dans les granules P-bodies, 46 % de l'ARNm *Mp* colocalise complètement avec le marqueur FMRP dans le contexte *Hand>Bru3*, contre 17 % dans le contrôle (*UAS-Bru3*) (Figure 16 K) suggérant que les P-bodies sont riches en ARNm *Mp* dans les cardioblastes de la lignée *Hand>Bru3* âgée d'une semaine.

Enfin, nous avons testé l'interaction entre la protéine Bru3 et le marqueur FMRP et nous avons constaté que 14 % de FMRP colocalise complètement avec Bru3 dans le contexte *Hand>Bru3* contre 6 % dans le contrôle (Figure 16 L) et 40 % de FMRP colocalise partiellement avec Bru3 dans le contexte *Hand>Bru3* contre 26 % dans le contrôle (Figure 16 O). Étant donnée une part importante de la colocalisation partielle entre Bru3 et FMRP, cela suggère une dynamique de l'entrée et la sortie de Bru3 dans les granules de P-bodies afin d'assurer la régulation des ARNm cibles dont l'ARNm *Mp*.

Dans un deuxième temps, nous avons tester l'hypothèse de l'implication de Bru3 dans la dégradation des transcrits de *Mp* après l'achèvement de leur traduction en protéines. Pour cela nous avons quantifié les transcrits naissants de *Mp* dans le tissu cardiaque de mouches *Hand>Bru3* âgées d'une semaine. Nous avons observé que le niveau des transcrits naissants de *Mp* dans le cœur *Hand>Bru3* est comparable à ceux du contrôle *UAS-Bru3* (Figure 16 C) suggérant que le niveau des ARNm *Mp* réduit observé dans les mouches *Hand>Bru3* âgées d'une semaine (Figure 16 A) n'est pas due à l'inhibition de la transcription du gène *Mp* mais à la dégradation des transcrits.

L'ensemble de ces données ont confirmé notre hypothèse selon laquelle dans les cardioblastes de la lignée *Hand>Bru3*, les ARNm *Mp* sont stockés dans des granules cytoplasmiques de P-bodies contenant le marqueur FMRP. Bru3 se lie aux ARNm *Mp* pour favoriser leur libération à partir des granules de P-bodies permettant ainsi leur traduction rapide. En outre, les niveaux significativement faibles des ARNm *Mp* et le niveau normal des transcrits naissants de *Mp* observés par RT-qPCR suggèrent que Bru3 favorise directement ou indirectement la dégradation de l'ARNm *Mp* une fois que sa traduction est achevée.

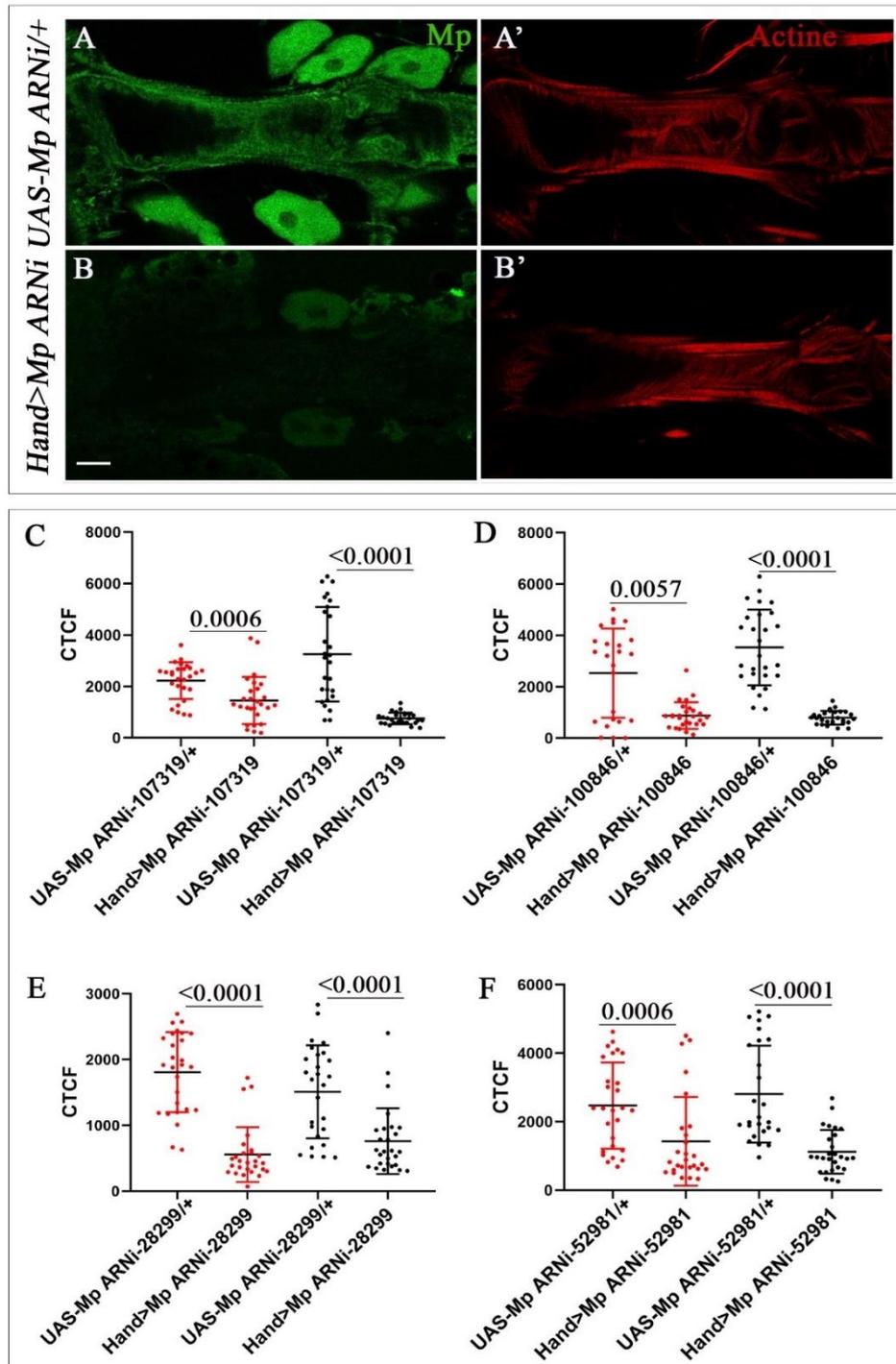
## 2. Implication de la dérégulation de Mp dans les arythmies cardiaques dans la DM1

Plusieurs études ont montré le rôle de la Mp dans le développement cardiaque chez la Drosophile (Harpaz et al., 2013; Momota et al., 2013). En revanche, aucune étude sur le rôle de Mp dans la physiologie cardiaque chez la mouche adulte n'a été effectuée.

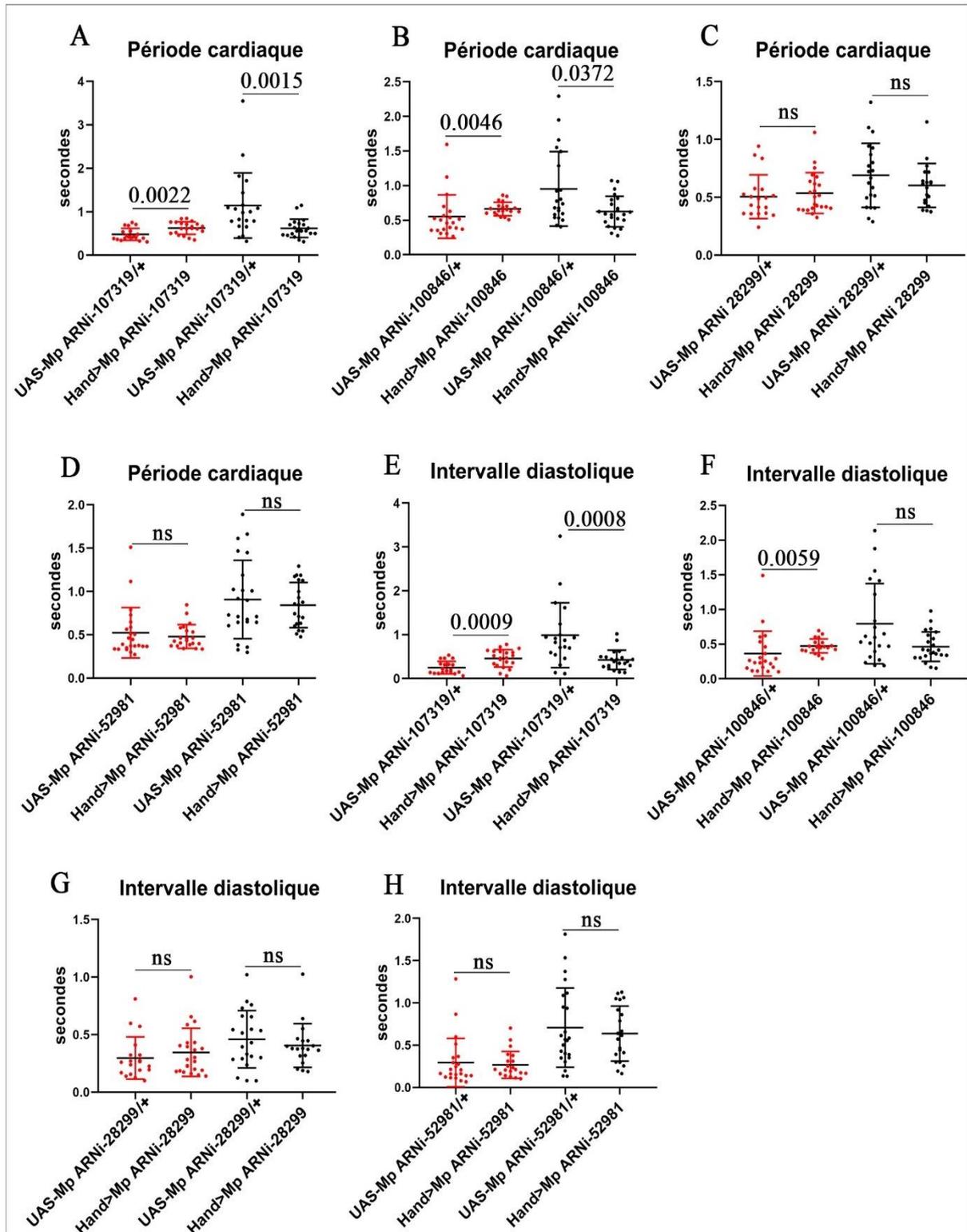
Dans la première partie des résultats, j'ai mis en évidence la surexpression de Mp comme un nouveau facteur impliqué dans la cardiomyopathie dilatée associée à la DM1. Dans la partie suivante, je vais présenter de nouveaux résultats qui montrent que Mp est impliquée dans d'autres phénotypes cardiaques observés dans la DM1.

Dans le but de tester si Mp est impliquée dans la fonction cardiaque, j'ai étudié l'effet de perte de fonction de Mp sur la régulation du rythme cardiaque. Pour cela nous avons utilisé deux lignées *UAS-Mp ARNi-TRIP* (52981, 28299), et deux lignées *UAS-Mp ARNi-KK* (100846, 107319) qui grâce au système UAS/ GAL4 vont pouvoir induire l'expression des ARNi contre le gène cible de manière tissu spécifique. D'abord nous avons analysé le niveau d'expression de Mp dans les 4 lignées afin de tester leur efficacité. La quantification de la protéine Mp en immunomarquage a montré une diminution significative de la protéine au niveau des cœurs des 4 lignées Mp ARNi (*Hand>Mp ARNi-52981*, *Hand>Mp ARNi-28299*, *Hand>Mp ARNi-100846* et *Hand>Mp ARNi-107319*) à 1 semaine et à 5 semaines d'âge (Figure 17). Ces résultats permettent ainsi de valider nos lignées pour le reste de l'étude.

Dans un premier temps, nous avons cherché à savoir si la diminution de l'expression de Mp spécifiquement dans le tissu cardiaque affecte le rythme cardiaque chez la mouche adulte. Pour répondre à cette question nous avons analysé plusieurs paramètres cardiaques impliquant les périodes cardiaques, la rythmicité et l'intervalle systolique/ diastolique par l'approche SOHA décrite dans la partie matériel et méthodes de l'article. Les résultats obtenus ont révélé une augmentation significative dans les périodes cardiaques des deux lignées Mp ARNi-KK (*Hand>Mp ARNi-100846*, *Hand>Mp ARNi-107319*) âgées d'une semaine (Figure 18 A,B). Ce phénotype se manifeste par des battements cardiaques ralentis avec des intervalles diastoliques élevées (Figure 18 E,F). Mais ce phénotype va être renversé à 5 semaines, lorsque l'inhibition par ARNi devient plus efficace, et les périodes cardiaques deviennent significativement diminuées (Figure 18 A,B) accompagnées d'une diminution des intervalles diastoliques (Figure 18 E,F) ce qui se manifeste par des battements cardiaques rapides. Cependant, les périodes cardiaques des deux lignée Mp ARNi-TRIP ne sont pas affectées (Figure 18 C,D).



**Figure 17 : Expression de Multiplexin dans le cœur adulte des lignées atténuées pour *Mp*.** Immunomarquage de cœur adulte âgé d'1 semaine de la lignée *Hand>Mp ARNi-100846* (A) et de la lignée *UAS-Mp ARNi-100846* comme contrôle (B) (anticorps primaires anti-Mp), images confocales au niveau des fibres circulaires. Barre d'échelle=15μm. (C,D,E,F) Graphes d'intensité du signal de la fluorescence au niveau des cardioblastes dans les 4 lignées *Mp ARNi* : *Hand>Mp ARNi-52981*, *Hand>Mp ARNi-28299*, *Hand>Mp ARNi-100846*, *Hand>Mp ARNi-107319* et leurs contrôles *UAS-Mp ARNi-52981*, *UAS-Mp ARNi-28299*, *UAS-Mp ARNi-100846*, *UAS-Mp ARNi-107319* à l'âge d'1 (graphes en rouge) et de 5 semaines (graphes en noir) (mesure par méthode CTCF). n=9 cœurs.



**Figure 18. Paramètres rythmiques de la fonction cardiaque des lignées atténuées pour *Mp*.** Analyses de la rythmicité cardiaque par SOHA (périodes cardiaques, intervalles diastolique et systolique) effectuées sur les lignées *Hand>Mp ARNi* : *Hand>Mp ARNi-52981*, *Hand>Mp ARNi-28299*, *Hand>Mp ARNi-100846*, *Hand>Mp ARNi-107319* et leurs contrôles *UAS-Mp ARNi-52981*, *UAS-Mp ARNi-28299*, *UAS-Mp ARNi-100846*, *UAS-Mp ARNi-107319* à l'âge d'1 (graphes en rouge) et de 5 (graphes en noir) semaines. n=20 cœurs.

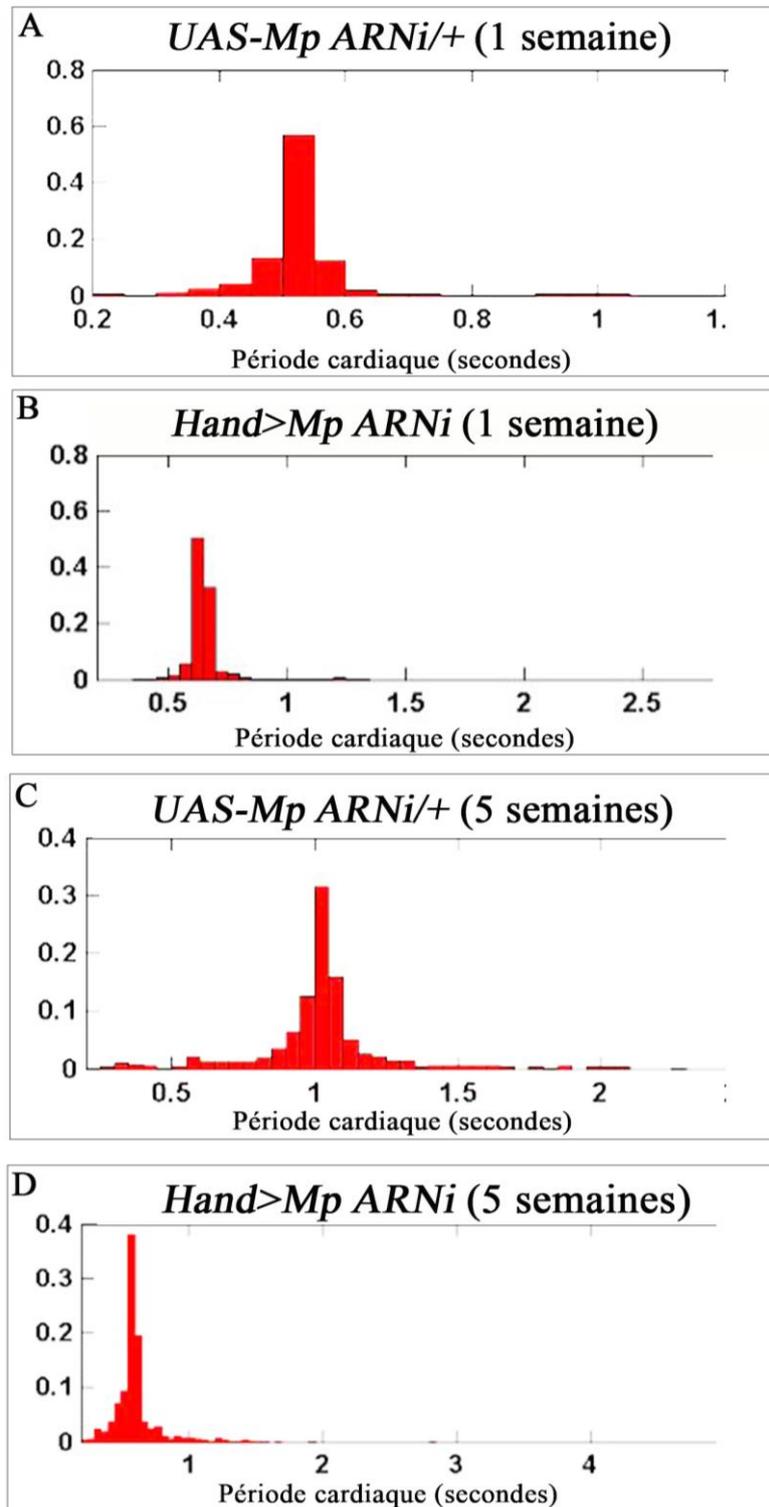
Dans le cas physiologique, les périodes cardiaques de mouches jeunes âgées d'une semaine sont d'une moyenne de 0.5 secondes (Figure 19 A), et elles deviennent plus longues avec le vieillissement de la mouche avec une moyenne de 1 seconde (Figure 19 C). Cela se manifestent par un rythme cardiaque plus long et des battements cardiaques ralentis au vieillissement.

En analysant le rythme cardiaque des mouches, nous avons constaté que lorsque l'expression de Mp est atténuée, 42 % des mouches *Hand>Mp ARNi-10046* âgées de 5 semaines présentent une période cardiaque d'une durée inférieure à 0.6 secondes (Figure 19 D), une durée similaire à celle des mouches contrôles *UAS-Mp ARNi-10046* âgées d'une semaine (Figure 19 A). Ces résultats sont similaires pour les autres lignées Mp ARNi (données non présentées). Cela nous laisse suggérer que Mp est une protéine impliquée dans le vieillissement cardiaque et que son atténuation permet aux mouches âgées de garder le rythme cardiaque de mouches jeunes.

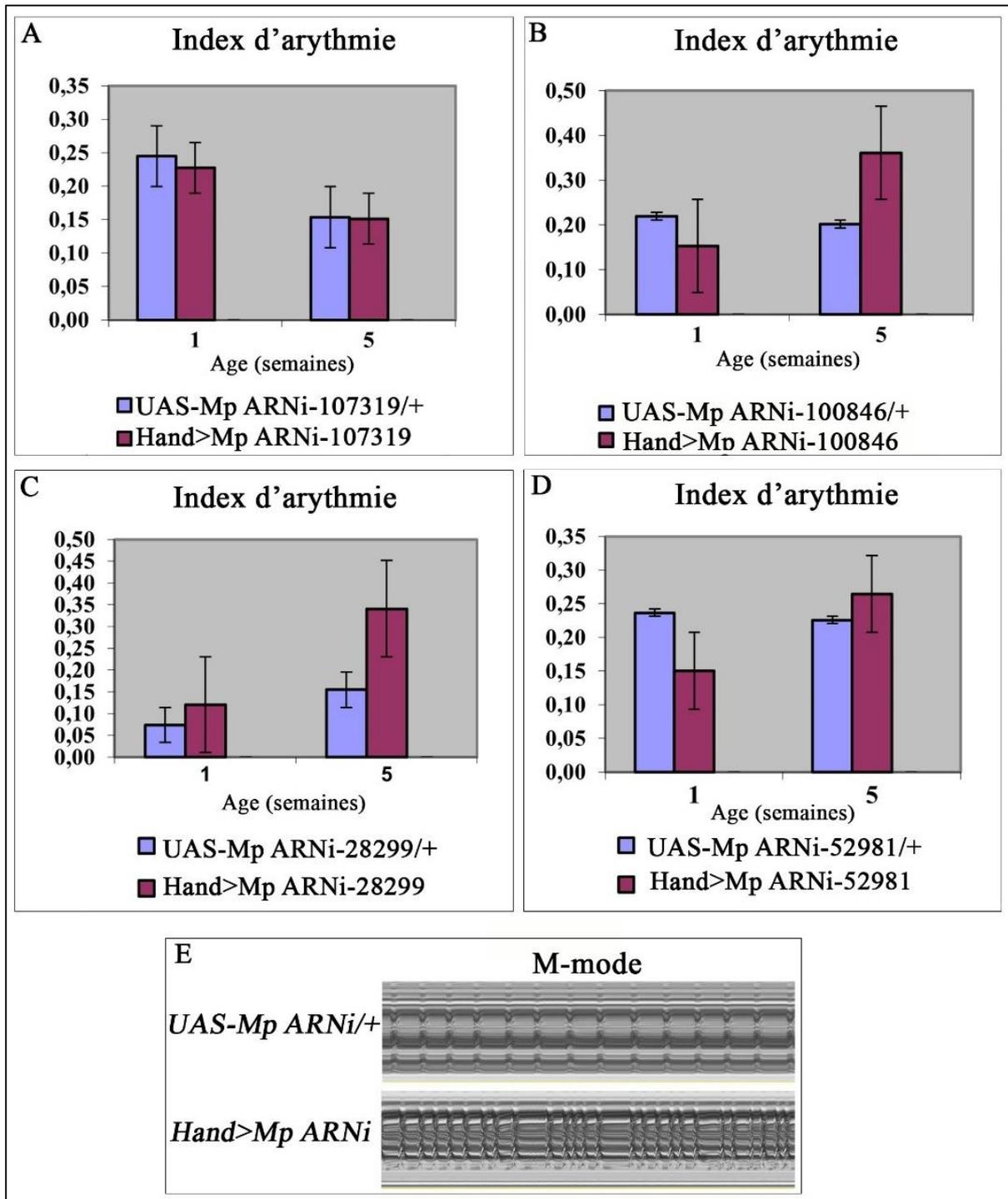
J'ai également observé une forte augmentation de l'index d'arythmie pour trois lignées atténuées pour Mp : *Hand>Mp ARNi-52981*, *Hand>Mp ARNi-100846* et *Hand>Mp ARNi-28299* âgées de 5 semaines (Figure 20 B,C,D). En revanche, le rythme cardiaque n'est pas affecté dans la lignée *Hand>Mp ARNi-107319* (Figure 20 A).

La variabilité au niveau des périodes cardiaques ainsi que les arythmies peuvent également être visualisés par des M-modes. Nous observons par exemple (Figure 20 E) un rythme cardiaque accéléré et une arythmie dans la lignée *Hand>Mp ARNi-100846* par rapport au contrôle (*UAS-Mp ARNi-100846*) à l'âge de 5 semaines.

En prenant l'exemple de la lignée *Hand>Mp ARNi-100846*, nous observons que 59% de mouches âgées de 5 semaines présentent une arythmie et 41% présentent un rythme cardiaque régulier (Figure 21). Afin de déterminer le type d'arythmie observée chez ces mouches, j'ai utilisé comme seuil la moyenne des périodes cardiaques dans les mouches contrôles *UAS-Mp ARNi-100846* âgées de 5 semaines. Nous avons considéré que les arythmies avec des périodes cardiaques d'une durée supérieure à 1 seconde sont considérées comme des arythmies avec un ralentissement de battement cardiaque ou « bradycardie », et les arythmies avec des périodes cardiaques d'une durée inférieure à 1 seconde sont considérées comme des arythmies avec une accélération de battement cardiaque ou « tachycardie ».

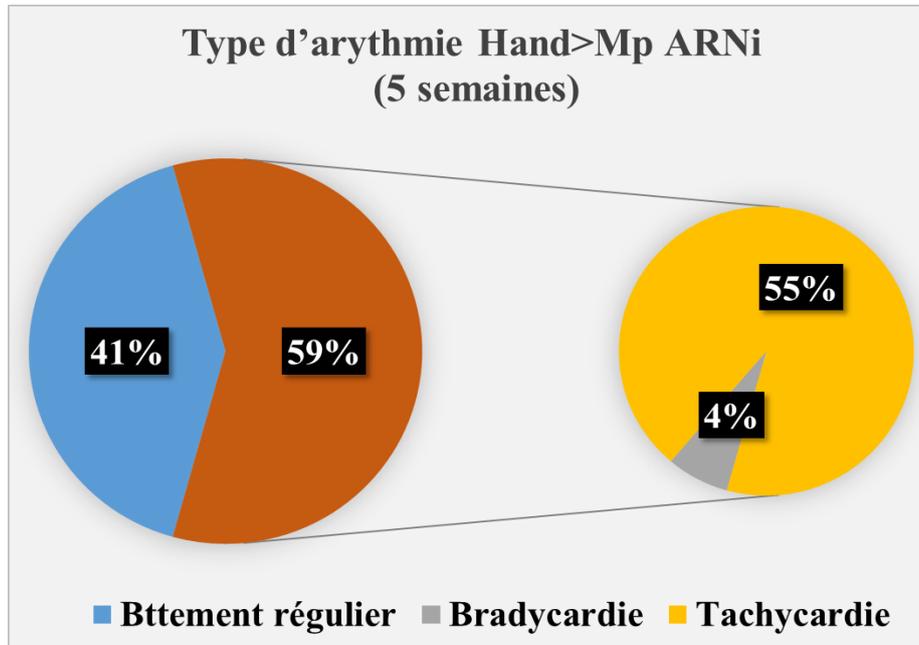


**Figure 19. Distribution des périodes cardiaques pour la lignée atténuée pour *Mp*.** Exemple de distribution des périodes cardiaques sur un film de 30 secondes pour le contrôle *UAS-Mp-ARNi-100846* (A,C) et pour la lignée *Hand>Mp ARNi-100846* (B,D) à 1 et 5 semaines d'âge. A 1 semaine, la moyenne des périodes cardiaques de la mouche *Hand>Mp-ARNi-100846* est de 0.6 sec similaires aux contrôle *UAS-Mp-ARNi-100846* (A,B). A 5 semaines, la moyenne des périodes cardiaques de la mouche *Hand>Mp-ARNi-100846* est de 0.6 sec donc plus courte que celle du contrôle qui est de 1 sec (C,D).



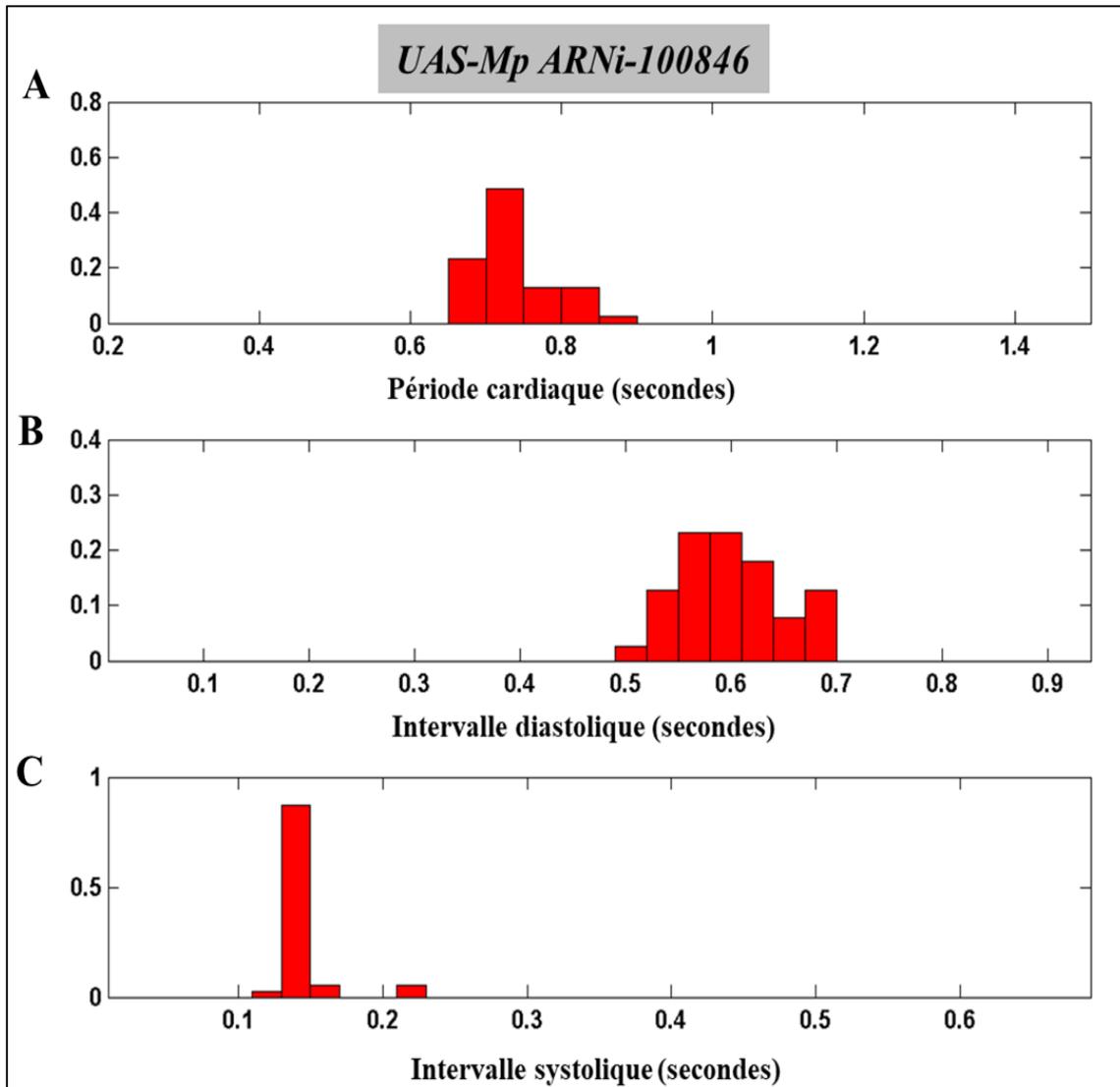
**Figure 20 : Analyse des arythmies dans les lignées atténuées pour *Mp*.** Index d'arythmie mesuré par SOHA pour les 4 lignées *Mp* ARNi : *Hand>Mp* ARNi-107319 (A), *Hand>Mp* ARNi-100846 (B), *Hand>Mp* ARNi-28299 (C), *Hand>Mp* ARNi-52981 (D), et leurs contrôles *UAS-Mp* ARNi-107319 (A), *UAS-Mp* ARNi-100846 (B), *UAS-Mp* ARNi-28299 (C), *UAS-Mp* ARNi-52981 (D), à l'âge d'1 et 5 semaines. n=20 cœurs. (E) Exemples de M-mode illustrant un rythme cardiaque régulier pour le contrôle *UAS-Mp* ARNi âgé d'1 semaine, et une arythmie cardiaque de type tachycardie (battements cardiaques irréguliers et accélérés) dans la lignée *Hand>Mp* RNAi âgée de 5 semaines.

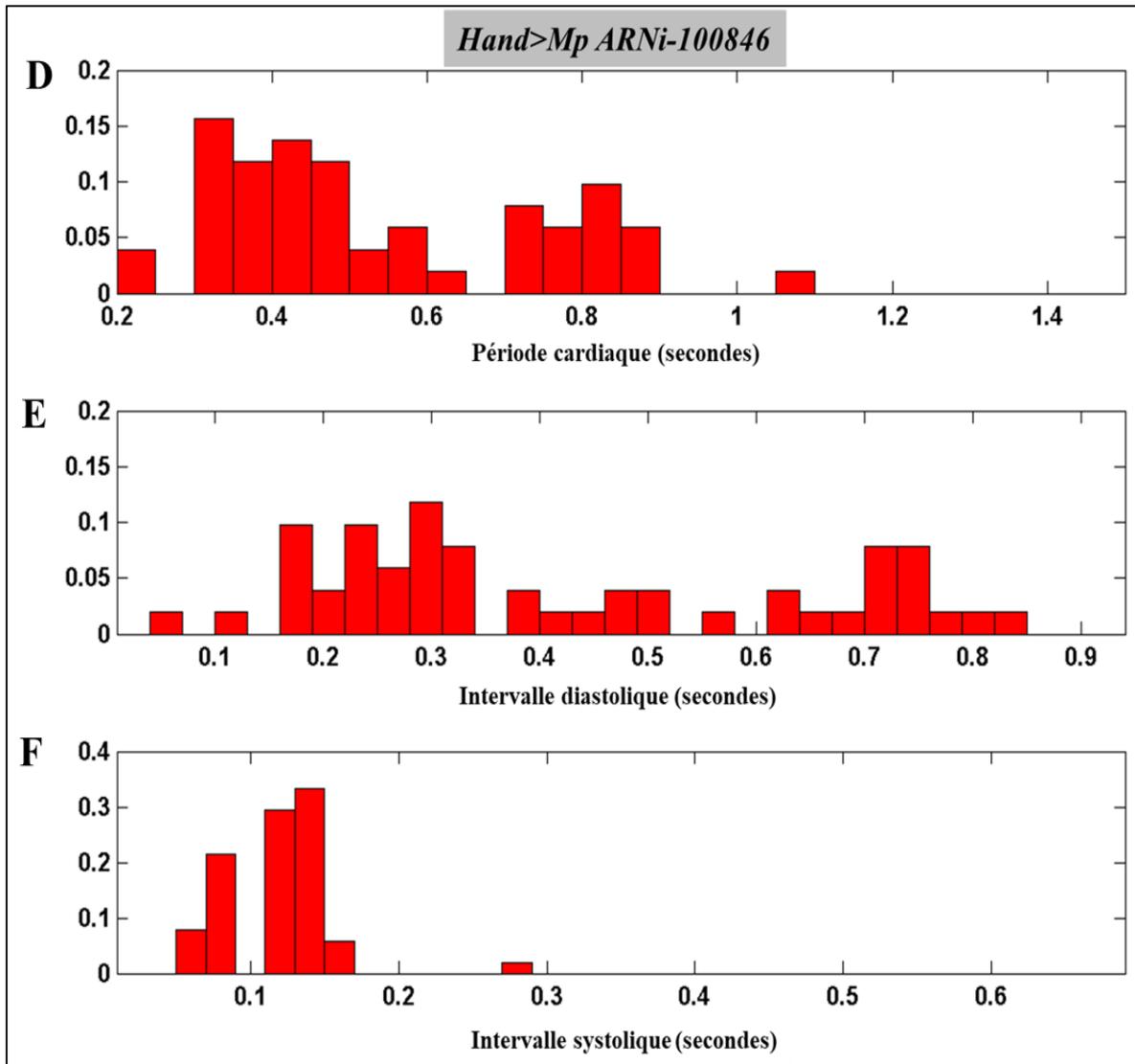
En se basant sur ces critères nous observons que 55% des mouches *Hand>Mp ARNi-100846* arythmiques présentent une arythmie avec une accélération des battement cardiaques et 4% de mouches présentent une arythmie avec un ralentissement des battements cardiaques (Figure 21).



**Figure 21. Distribution des arythmies cardiaques dans la lignée atténuée pour *Mp* à l'âge de 5 semaines.** 59% des mouches *Hand>Mp ARNi-100846* présentent une arythmie cardiaque : 55% de type accélération de battement cardiaque (tachycardie) et 4% de type ralentissement de battement cardiaque (bradycardie). n=20 cœurs.

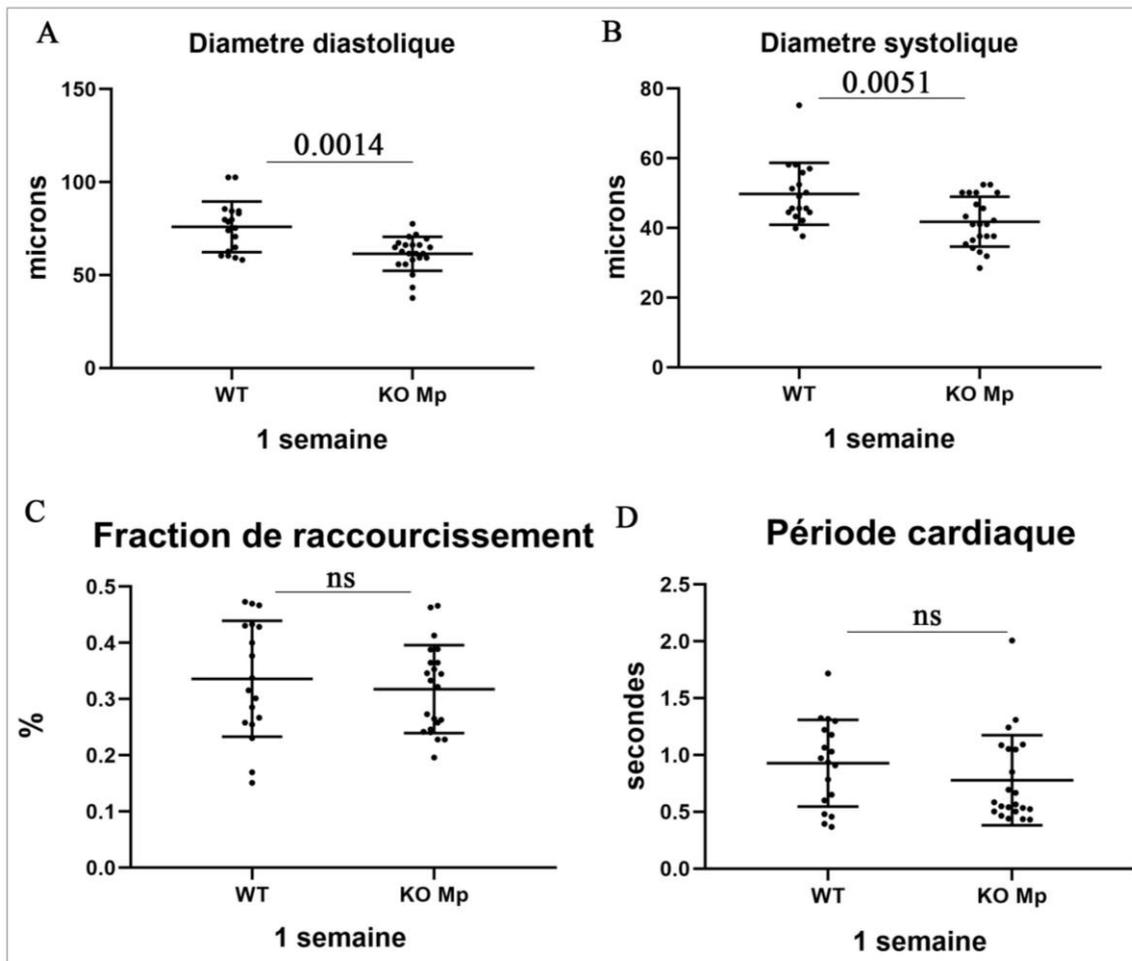
La figure 22 montre un exemple de la distribution des périodes cardiaques sur des films de 30 secondes pour le cœur contrôle *UAS-Mp ARNi-10046* et pour le cœur de la lignée *Hand>MpARNi-10046* qui a une tachycardie. Nous observons que les périodes cardiaques ont une durée très variable dans la lignée *Hand>Mp ARNi-10046* allant de 0.2 secondes à 1.1 secondes, ce qui représente une arythmie. Cependant, la plupart des périodes cardiaques présentent une durée courte entre 0.3 secondes et 0.5 secondes en comparaison avec le contrôle (0.7 secondes) cela se manifeste par une arythmie avec une accélération de battement cardiaque « tachycardie ». Ces résultats sont similaires pour les deux autres lignées *Mp ARNi* présentant des arythmies (*Hand>52981* et *Hand>28299TRIP* (données non présentées)).





**Figure 22 : Analyse de paramètres de rythme cardiaque dans une lignée atténuée pour *Mp* âgées de 5 semaines.** Exemple de distribution des périodes cardiaques sur un film de 30 sec pour la lignée contrôle *UAS-Mp ARNi-100846* (A) illustrant une homogénéité des périodes cardiaques avec une durée moyenne de 0.7 sec. (D) Les périodes cardiaques dans la lignée *Hand>Mp ARNi-100846* sont hétérogènes allant de 0.2 à 1.2 sec illustrant une arythmie de type tachycardie. (B) Distribution homogène des intervalles diastoliques dans la lignée contrôle *UAS-Mp ARNi-100846* avec une durée moyenne de 0.6 sec. (E) Distribution hétérogène et perturbée des intervalles diastoliques dans la lignée *Hand>Mp ARNi-100846* avec une durée allant de 0 à 0.8 sec. (C) Distribution des intervalles systoliques homogènes du contrôle *UAS-Mp ARNi-100846* d'une valeur de 0.1 sec. (F) Distribution des intervalles systoliques hétérogènes de la lignée *Hand>Mp ARNi-100846* avec une durée variable de 0 à 0.3 sec.

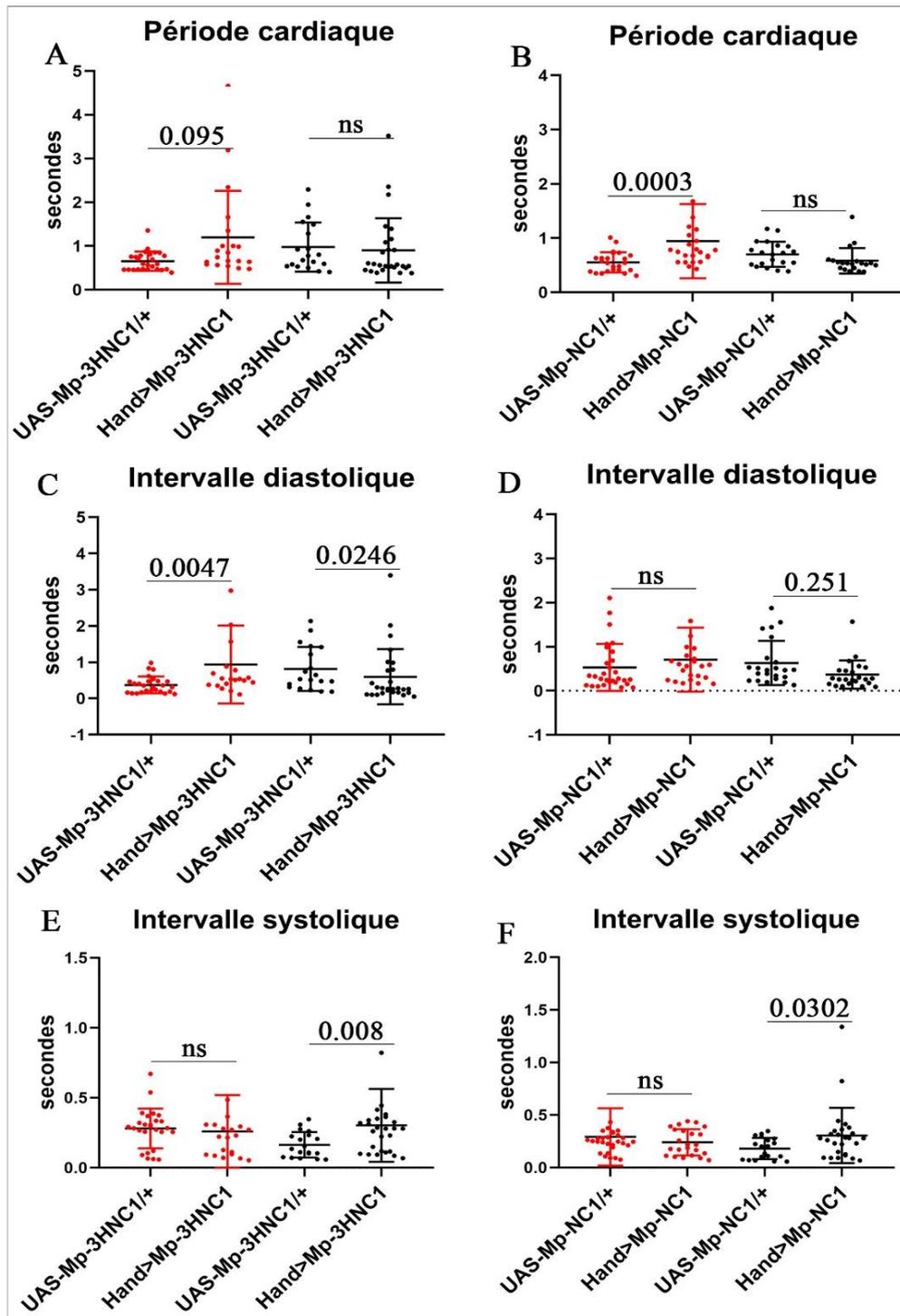
Afin de déterminer si la *Mp* est indispensable à la viabilité de la *Drosophile* j'ai analysé une lignée *Dmp*<sup>f07253</sup>. Cette lignée est invalidée pour *Mp* par l'insertion d'un élément transposable *piggyBack* au niveau du promoteur. Contrairement aux lignées ARNi inductibles que nous avons analysées, l'invalidation du gène *Mp* dans cette lignée est générale. Cette lignée est viable et fertile, mais nous avons également observé que les individus homozygotes *Dmp*<sup>f07253/f07253</sup> présentent une durée de survie réduite par rapport aux *w*<sup>1118</sup>. La lignée *Dmp*<sup>f07253</sup> présente des phénotypes cardiaques similaires aux phénotypes de lignées *Mp* ARNi (Figure supplémentaire 6 de l'article) et plus particulièrement le diamètre systolique et diastolique significativement diminués (Figure 23 A,B) sans effet sur la contractilité cardiaque (Figure 23C), mais les périodes cardiaques ne sont pas significativement diminuées (Figure 23 D).



**Figure 23: Paramètres contractiles et rythmiques de la fonction cardiaque de la lignée invalidée pour *Mp*.** Diamètre diastolique (A) et diamètre systolique (B) et la contractilité cardiaque (C) et les périodes cardiaques (D) des cœurs de la lignée contrôle (WT) et KO *Mp* âgée d'1 semaine, mesurés par SOHA. n= 20 cœurs.

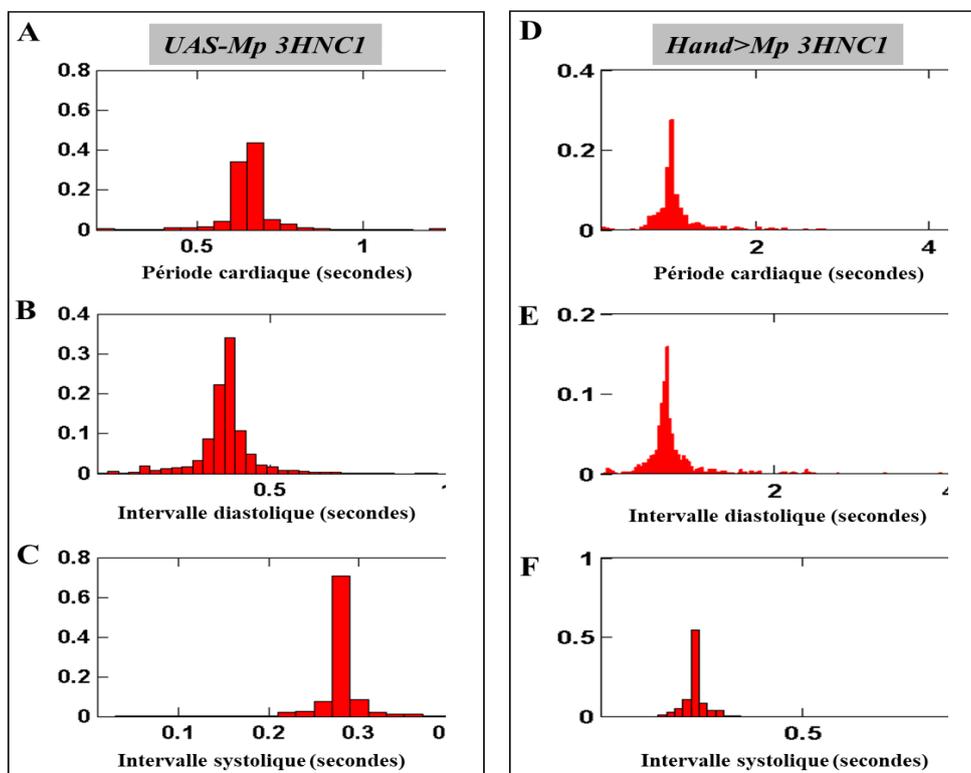
Afin de déterminer si le gain de fonction de Mp affecte également le rythme cardiaque, j'ai analysé les périodes cardiaques et la rythmicité de deux lignées UAS-Mp : *UAS-Mp-3HNC1* et *UAS-Mp-NC1*.

Nous avons observé que la surexpression de Mp dans le tissu cardiaque induit une augmentation significative de la période cardiaque dans les mouches jeunes des deux lignées *Hand>Mp-3HNC1* et *Hand>Mp-NC1* mais cette durée revient à la normale à l'âge de 5 semaines (Figure 24 A,B). Cette prolongation dans les périodes cardiaques à 1 semaine est associée à une élongation dans l'intervalle diastolique qui est significative dans la lignée *Hand>Mp-3HNC1* uniquement (Figure 24 C,D), sans altération de l'intervalle systolique (Figure 24 E,F).



**Figure 24 : Paramètres rythmiques de battement cardiaque des lignées gain de fonction *Mp*.** Périodes cardiaques pour la lignée *Hand>Mp-3HNC1* (A) et *Hand>Mp-NC1* (B) et leurs contrôles *UAS-Mp-3HNC1* et *UAS-Mp-NC1* respectivement à l'âge d'1 semaine (graphes en rouge) et 5 semaines (graphes en noir). Intervalles diastoliques pour la lignée *Hand>Mp-3HNC1* (C) et *Hand>Mp-NC1* (D) et leurs contrôles *UAS-Mp-3HNC1* et *UAS-Mp-NC1* respectivement à l'âge d'1 semaine (graphes en rouge) et 5 semaines (graphes en noir). Intervalles systoliques pour la lignée *Hand>Mp-3HNC1* (E) et *Hand>Mp-NC1* (F) et leurs contrôles *UAS-Mp-3HNC1* et *UAS-Mp-NC1* respectivement à l'âge d'1 semaine (graphes en rouge) et 5 semaines (graphes en noir). n=20 cœurs.

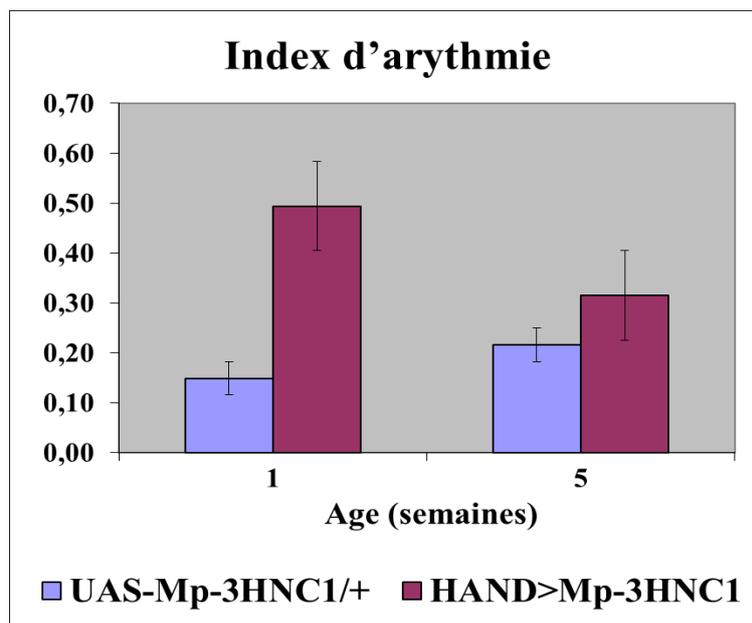
En regardant la distribution de périodes cardiaques sur l'ensemble de mouches analysées, nous observons que les périodes cardiaques des cœurs de la lignée *Hand>Mp-3HNC1* âgées d'une semaine, présentent des périodes cardiaques longues d'une moyenne de 1 sec (Figure 25 D) en comparaison avec celles du contrôle qui est de 0.6 sec (Figure 25 A). Cette prolongation des périodes cardiaques était accompagnée d'une élongation de la durée de l'intervalle diastolique de 0.4 sec chez le contrôle (*UAS-Mp-3HNC1*) à 1 sec chez les mouches *Hand>Mp-3HNC1* (Figure 25 B,E). Ces résultats sont similaires à la lignée *Hand>Mp-NC1* âgée d'une semaine (données non présentées).



**Figure 25 : Analyse de paramètres de rythme cardiaque des mouches de la lignée gain de fonction *Mp* âgées de 5 semaines.** Distribution des périodes cardiaques pour l'ensemble de 20 films de 30 sec analysés sur des battements cardiaques de mouches contrôles *UAS-Mp-3HNC1* (A) illustrant une durée moyenne des périodes cardiaques de 0.6 sec qui est prolongée à 1 sec dans les mouches *Hand>Mp-3HNC1* (D). (B) Distribution des intervalles diastoliques pour l'ensemble de 20 films de 30 sec analysés sur des battements cardiaques de mouches contrôles *UAS-Mp-3HNC1* illustrant une durée moyenne de 0.4 sec et qui est prolongée à 1 sec dans les mouches *Hand>Mp-3HNC1* (E). (C) Distribution des intervalles systoliques pour l'ensemble de 20 films de 30 sec analysés sur des battements cardiaques de mouches contrôles *UAS-Mp-3HNC1* illustrant une valeur moyenne de 0.3 sec qui reste stable dans les mouches *Hand>Mp-3HNC1* (F). n=20 cœurs.

Nous avons également observé que les deux lignées gain de fonction de *Mp* présentent des arythmies importantes. Je vais présenter les résultats détaillés pour une seule lignée (*Hand>Mp-3HNC1*) car ils sont similaires pour la lignée *Hand>Mp-NC1*.

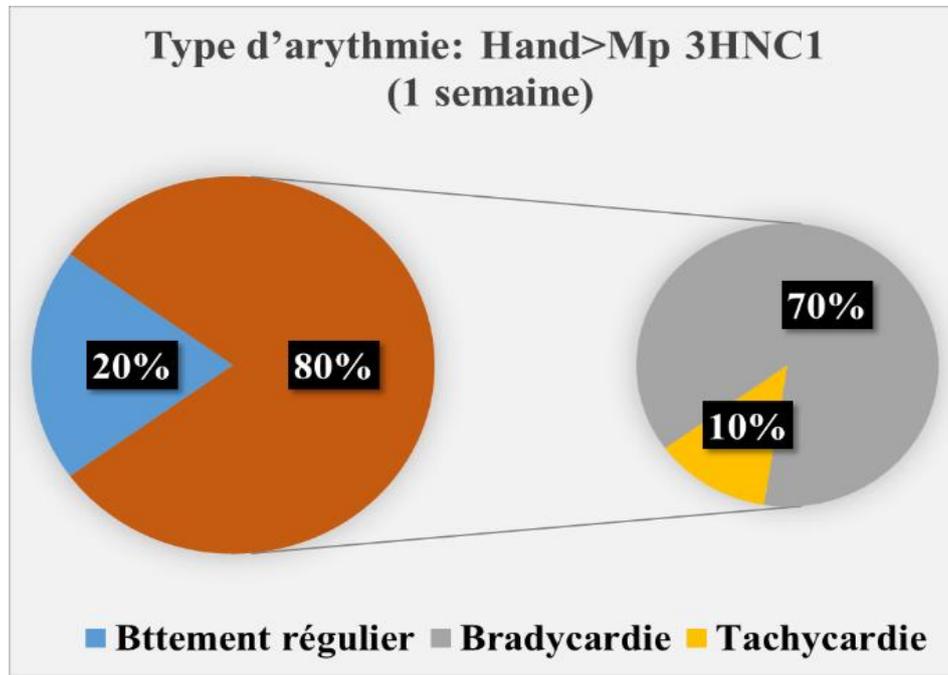
L'analyse de rythmicité par SOHA a révélé une augmentation de l'index d'arythmie à 49% et 31% dans la lignée *Hand>Mp-3HNC1* âgées de 1 et de 5 semaines (Figure 26).



**Figure 26 : Analyse des arythmies cardiaques dans la lignée gain de fonction de *Mp*.** Indexe d'arythmie mesuré par SOHA pour la lignée gain de fonction de *Mp Hand>Mp-3HNC1* et son contrôle *UAS-Mp-3HNC1* à l'âge d'1 et 5 semaines. n=20 cœurs.

Concernant la prévalence de l'arythmie chez les mouches surexprimant *Mp*, nous avons observé que à une semaine d'âge, 80% des mouches *Hand>Mp-3HNC1* présentent une arythmie cardiaque et uniquement 20 % de mouches qui présentent un rythme cardiaque régulier (Figure 27). Afin de déterminer le type d'arythmie observée chez les mouches jeunes, nous avons utilisé comme seuil la moyenne des périodes cardiaques dans les mouches contrôles *UAS-Mp-3HNC1* âgées d'une semaine. Nous avons considéré que les arythmies avec des périodes cardiaques d'une durée supérieure à 0.6 secondes sont considérées comme « bradycardie », et les arythmies avec des périodes cardiaques d'une durée inférieure à 0.6 secondes sont considérées comme « tachycardie ».

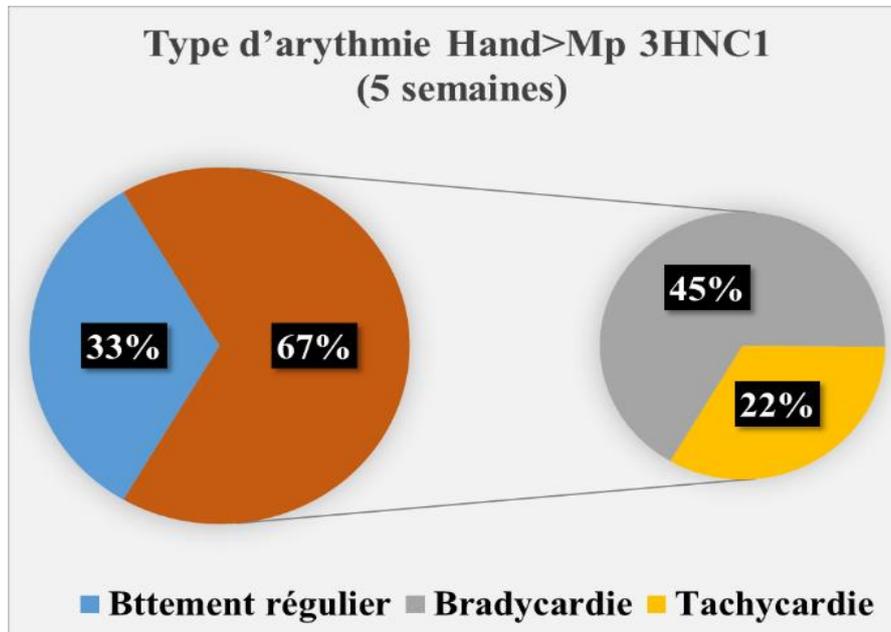
En se basant sur cette classification nous avons observé que 10% des arythmies observées dans la lignée *Hand>Mp-3HNC1* âgée d'une semaine sont de type tachycardie et 70% sont de type bradycardie (Figure 27).



**Figure 27 : Distribution des arythmies dans la lignée gain de fonction de *Mp* à l'âge d'1 semaine.** 80% des mouches *Hand>Mp-3HNC1* présentent une arythmie cardiaque : 10% de type accélération de battement cardiaque (tachycardie) et 70% de type ralentissement de battement cardiaque (bradycardie). n=20 cœurs.

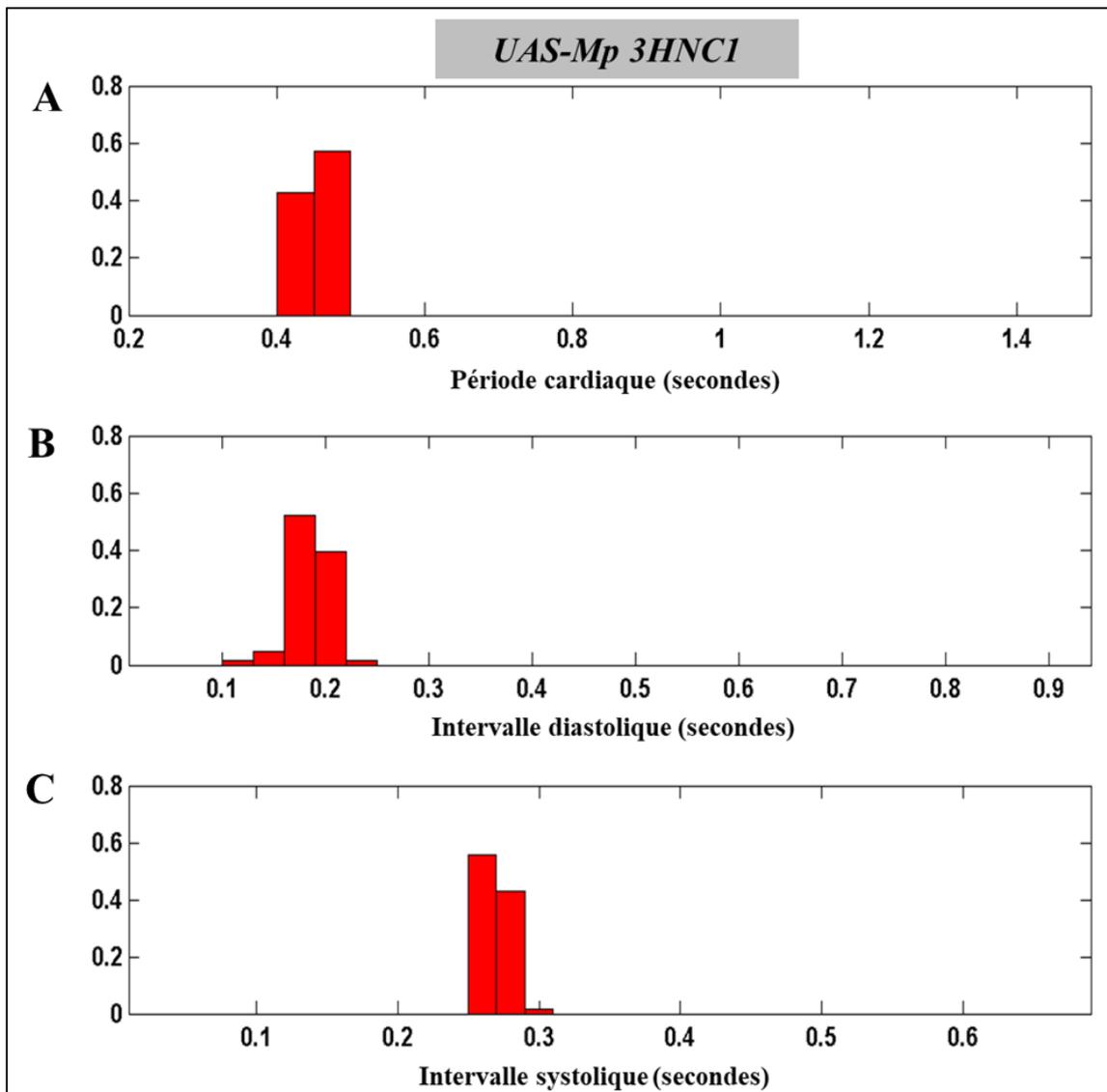
A 5 semaines d'âge dont l'index d'arythmie était moins important (Figure 26), 67% des mouches *Hand>Mp-3HNC1* présentent une arythmie cardiaque et 33 % de mouches présentent un rythme cardiaque régulier. Afin de déterminer le type d'arythmie observée chez les mouches âgées surexprimant *Mp*, nous avons utilisé comme seuil la moyenne des périodes cardiaques dans les mouches contrôles *UAS-Mp-3HNC1* âgées de 5 semaines. Nous avons considéré que les arythmies avec des périodes cardiaques d'une durée supérieure à 0.8 secondes sont considérées comme une arythmie de type « bradycardie », et les arythmies avec des périodes cardiaques d'une durée inférieure à 0.8 secondes sont considérées comme une arythmie de type « tachycardie ».

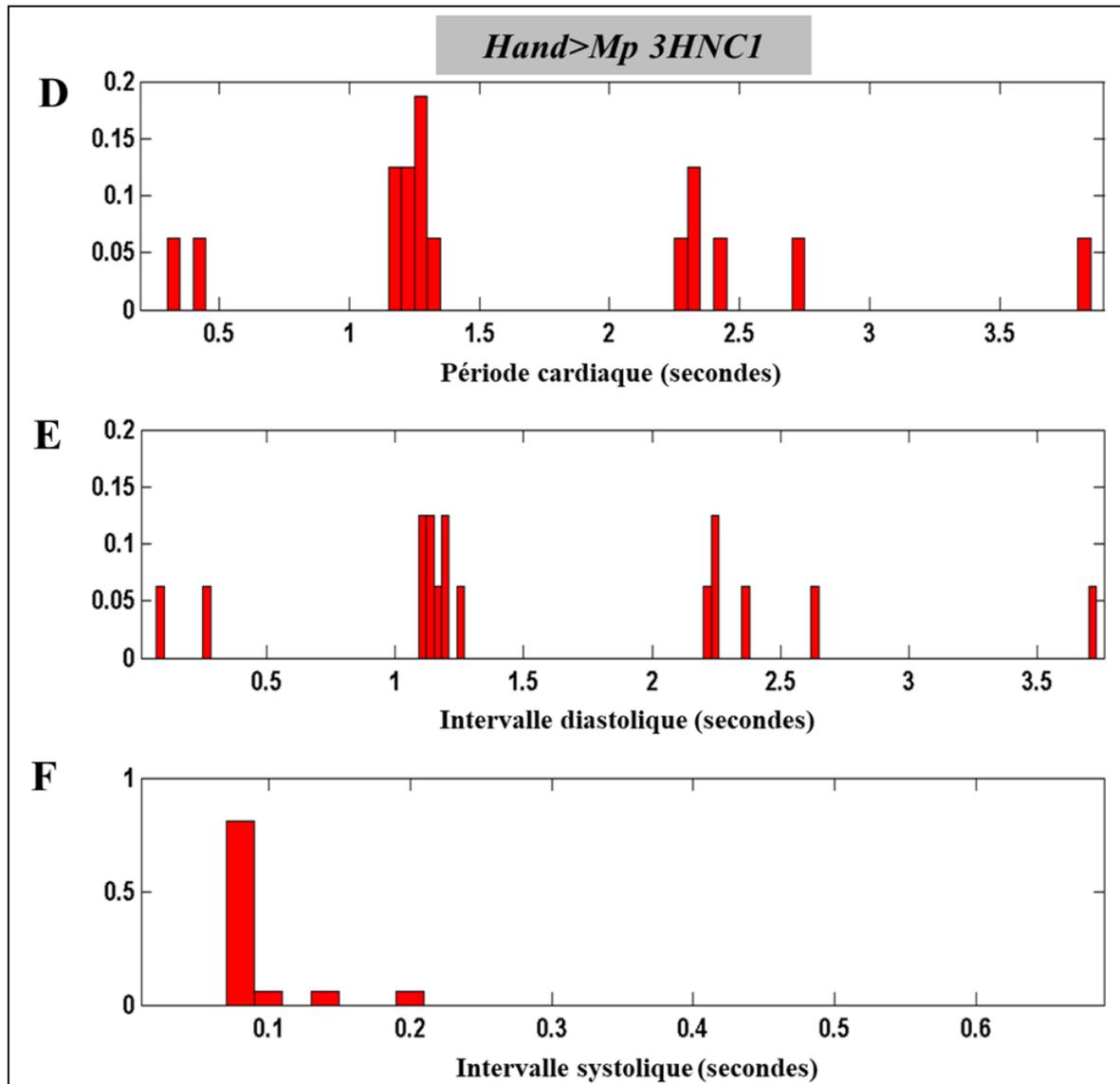
Similaire à ce qui a été observé chez les mouches *Hand>Mp-3HNC1* âgées d'une semaine, la prévalence de la bradycardie était élevée (45%) par rapport à la tachycardie (22%) chez les mouches *Hand>Mp-3HNC1* âgées de 5 semaines (Figure 28).



**Figure 28. Distribution des arythmies cardiaques dans la lignée gain de fonction de *Mp* à l'âge de 5 semaines.** 67% des mouches *Hand>Mp-3HNC1* présentent une arythmie cardiaque : 22% de type accélération de battement cardiaque (tachycardie) et 45% de type ralentissement de battement cardiaque (bradycardie). n=20 cœurs.

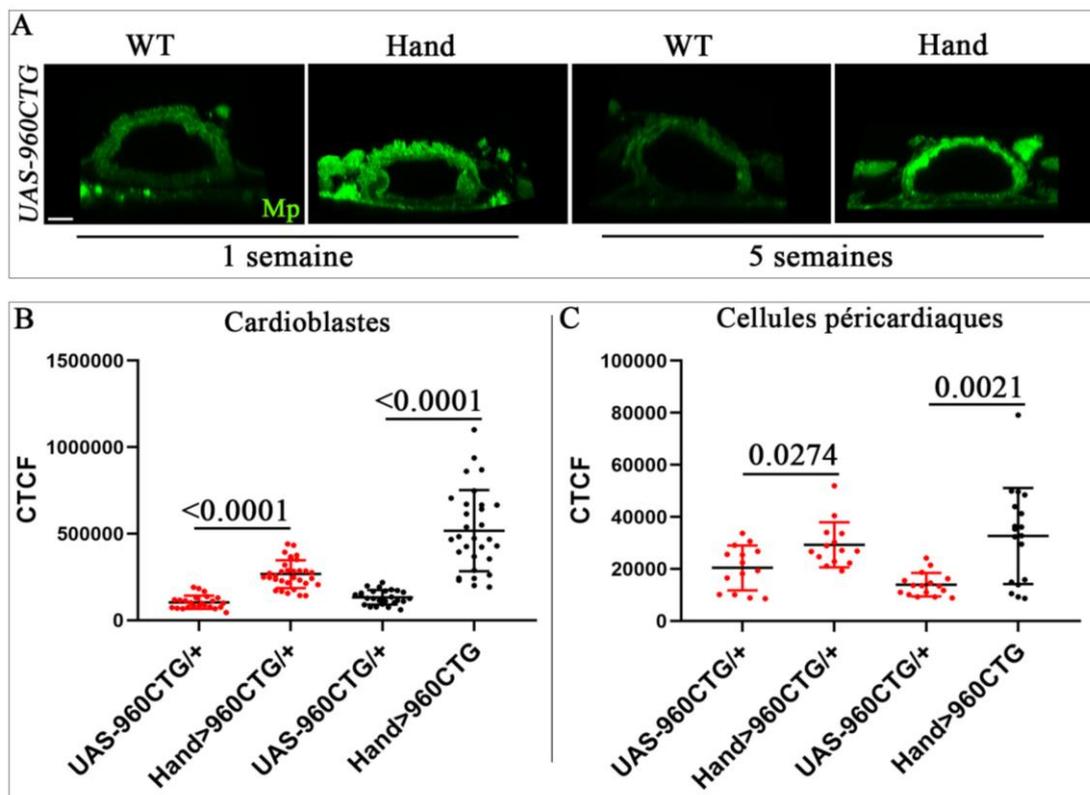
Les arythmies peuvent être visualisée sur la distribution des périodes cardiaques sur des films de battements cardiaques de 30 secondes. La figure 29 montre un exemple de rythme cardiaque d'une mouche *Hand>Mp-3HNC1* qui présente une arythmie de type bradycardie. Nous observons que les périodes cardiaques de la lignée *Hand>Mp-3HNC1* présentent une durée très variable et très longue allant de 0.5 secondes à 5 secondes qui se manifeste par un rythme cardiaque irrégulier avec un ralentissement des battements cardiaques, mais dans le contrôle (*UAS-Mp-3HNC1*) les périodes cardiaques sont homogènes avec une durée moyenne de 0.5 secondes. Cette distribution hétérogène des périodes cardiaques dans *Hand>Mp-3HNC1* est accompagnée par une perturbation des intervalles diastoliques qui sont d'une durée variable allant de 0 à 4 secondes dans *Hand>Mp-3HNC1* en comparaison avec le contrôle qui présente des intervalles diastoliques d'une moyenne de 0.2 secondes (Figure 29).





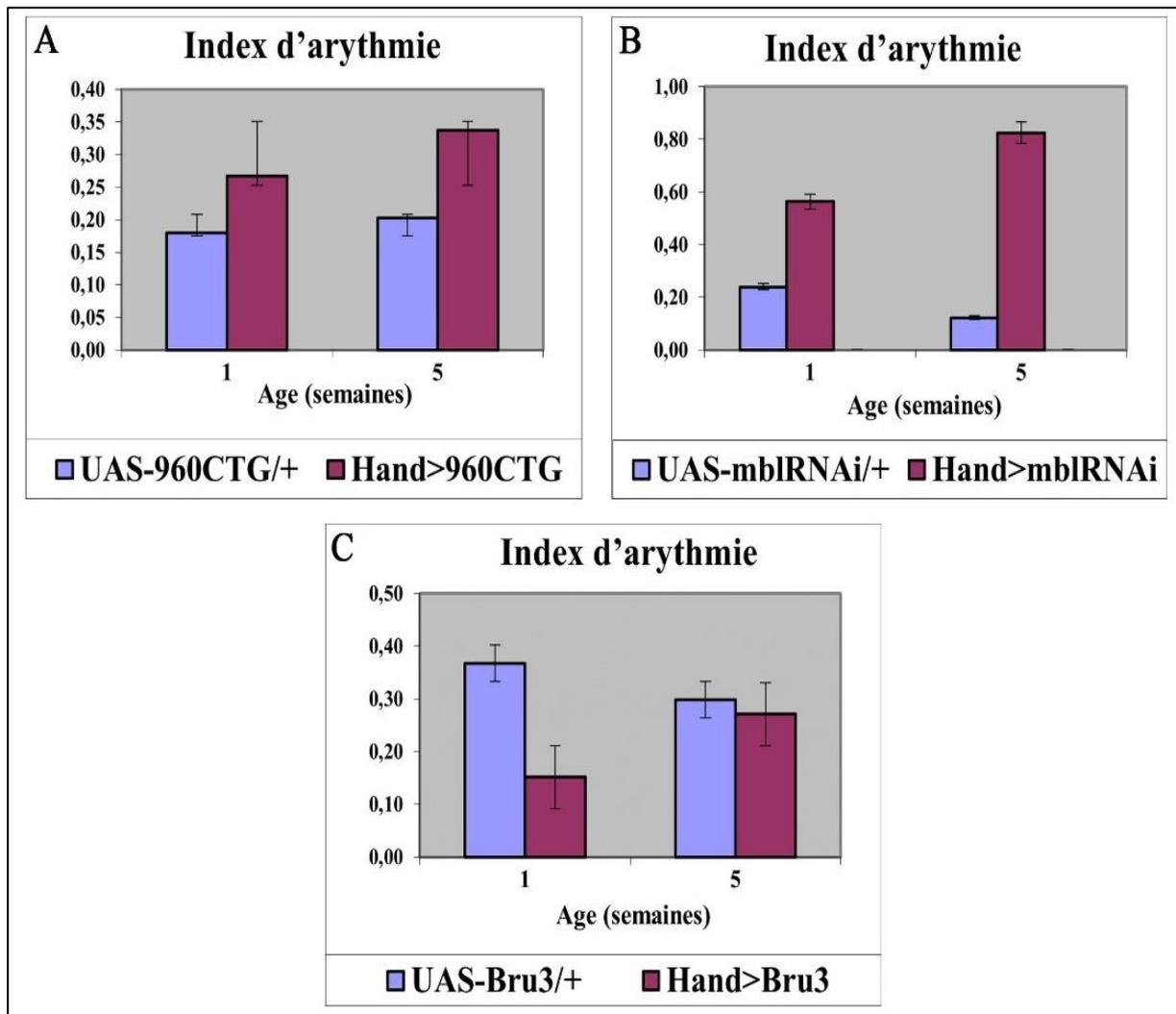
**Figure 29 : Analyse de paramètres de rythme cardiaque dans une lignée gain de fonction *Mp* âgée d'1 semaine.** Distribution des périodes cardiaques sur un film de 30 sec pour la lignée contrôle *UAS-Mp-3HNC1* (A) illustrant une homogénéité des périodes cardiaques avec une durée moyenne de 0.4 sec. (D) Les périodes cardiaques dans la lignée *Hand>Mp-3HNC1* sont hétérogènes et longues allant de 0 à 4 sec illustrant une arythmie de type bradycardie. (B) Distribution homogène des intervalles diastoliques dans la lignée contrôle *UAS-Mp-3HNC1* avec une durée moyenne de 0.2 sec. (E) Distribution hétérogène des intervalles diastoliques dans la lignée *Hand>Mp-3HNC1* avec des durées longues allant de 0 à 4 sec. (C) Distribution des intervalles systoliques homogènes du contrôle *UAS-Mp-3HNC1* d'une valeur de 0.3 sec. (F) Distribution des intervalles systoliques de la lignée *Hand>Mp-3HNC1* avec une durée moyenne courte de 0.1 sec.

Les analyses de rythmicité des deux lignées gain de fonction de Mp ont permis de mettre en évidence l'implication de la surexpression de Mp dans les arythmies de type bradycardie. Donc nous avons cherché à savoir si nos modèles Drosophile DM1, surexprimant Mp, présentent ce type de défaut cardiaque. Pour répondre à cette question nous avons analysé les paramètres de rythmicité chez les lignées *Hand>Bru3* et *Hand>mblARNi* qui présentent une surexpression de Mp qui a été suggérée comme associée à la cardiomyopathie dilatée (données présentées dans l'article). Nous avons également analysé la rythmicité de la lignée *Hand>960CTG* qui a été éliminée de notre étude concernant la cardiomyopathie dilatée, car elle ne la présente pas, mais c'est une lignée qui présente également une surexpression de Mp au niveau de tissu cardiaque (Figure 30).



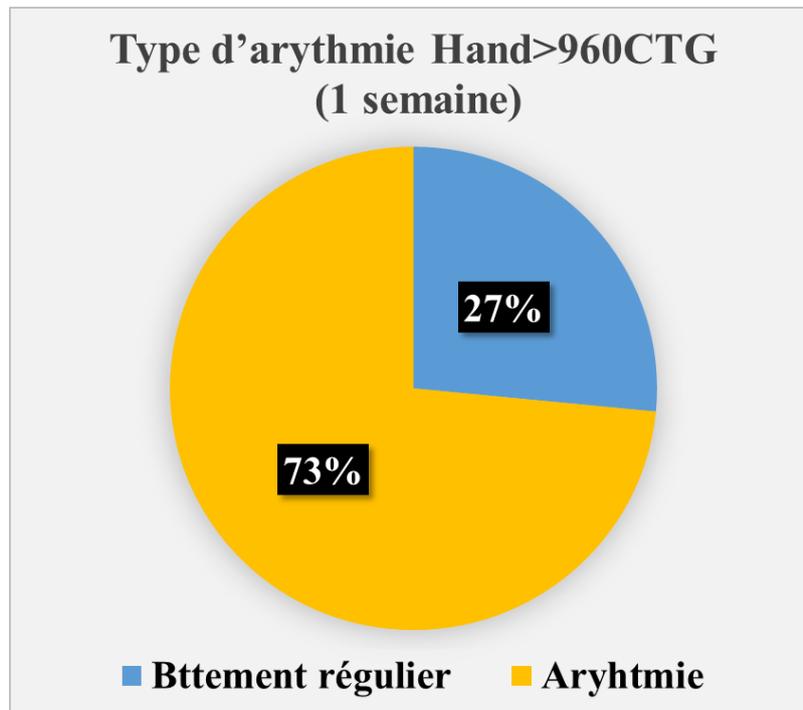
**Figure 30 : Expression de Multiplexin dans le modèle DM1 exprimant des expansions CTG.** (A) Immunomarquage de cœurs adultes de la lignée *Hand>960CTG* avec *UAS-960CTG* comme contrôle (anticorps primaires anti-Mp) à l'âge d'1 et de 5 semaines, coupes transversales des tubes cardiaques après reconstruction en 3D par le logiciel Imaris. Graphes d'intensité de signal de la fluorescence au niveau des cardioblastes (B) et des cellules péricardiaques (C) dans le contrôle *UAS-960CTG* et le contexte DM1 *Hand>960CTG* à 1 (graphes en rouge) et 5 (graphes en noir) semaines (mesures par méthode CTCF). n=9 cœurs. Barre d'échelle =10 µm.

Les analyses par SOHA montrent une augmentation de l'index d'arythmie de la lignée *Hand>960CTG* à 27% et 34% à 1 et à 5 semaines respectivement (Figure 31 A). Cet index est plus important dans la lignée *Hand>mblARNi* et présente 56% et 82% à 1 et à 5 semaines respectivement (Figure 33 B). La lignée *Hand>Bru3* n'est pas retenue pour les analyses de rythmicité car le contrôle *UAS-Bru3* présente une arythmie élevée (Figure 31 C).



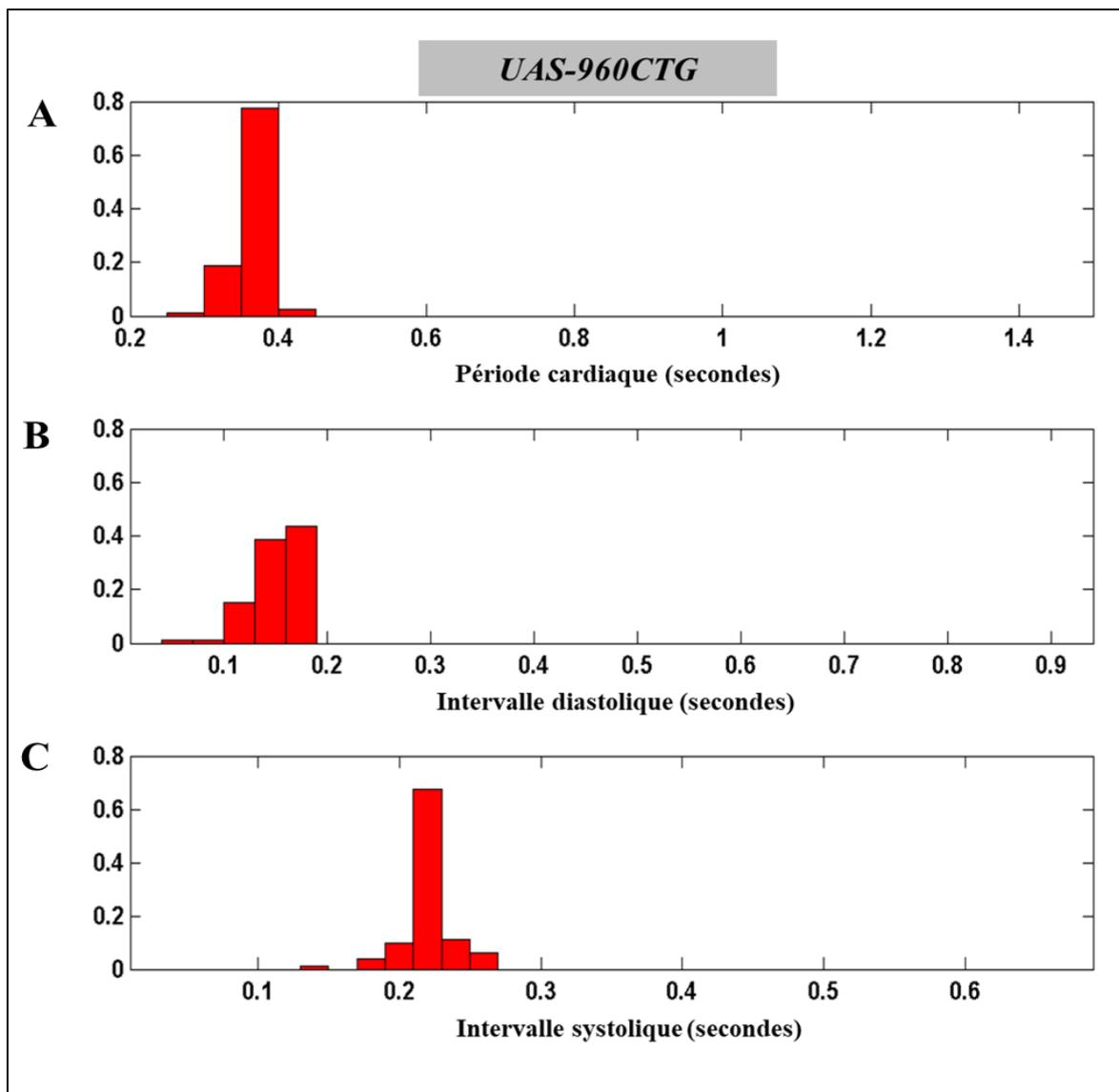
**Figure 31 : Analyse de l'arythmie cardiaque dans les modèles DM1.** Index d'arythmie mesuré par SOHA pour les lignées DM1 (*Hand>960CTG*, *Hand>mblARNi*, *Hand>Bru3*) et leurs contrôles (*UAS-960CTG*, *UAS-mblARNi*, *UAS-Bru3*) à l'âge d'1 et de 5 semaines. n=20 cœurs.

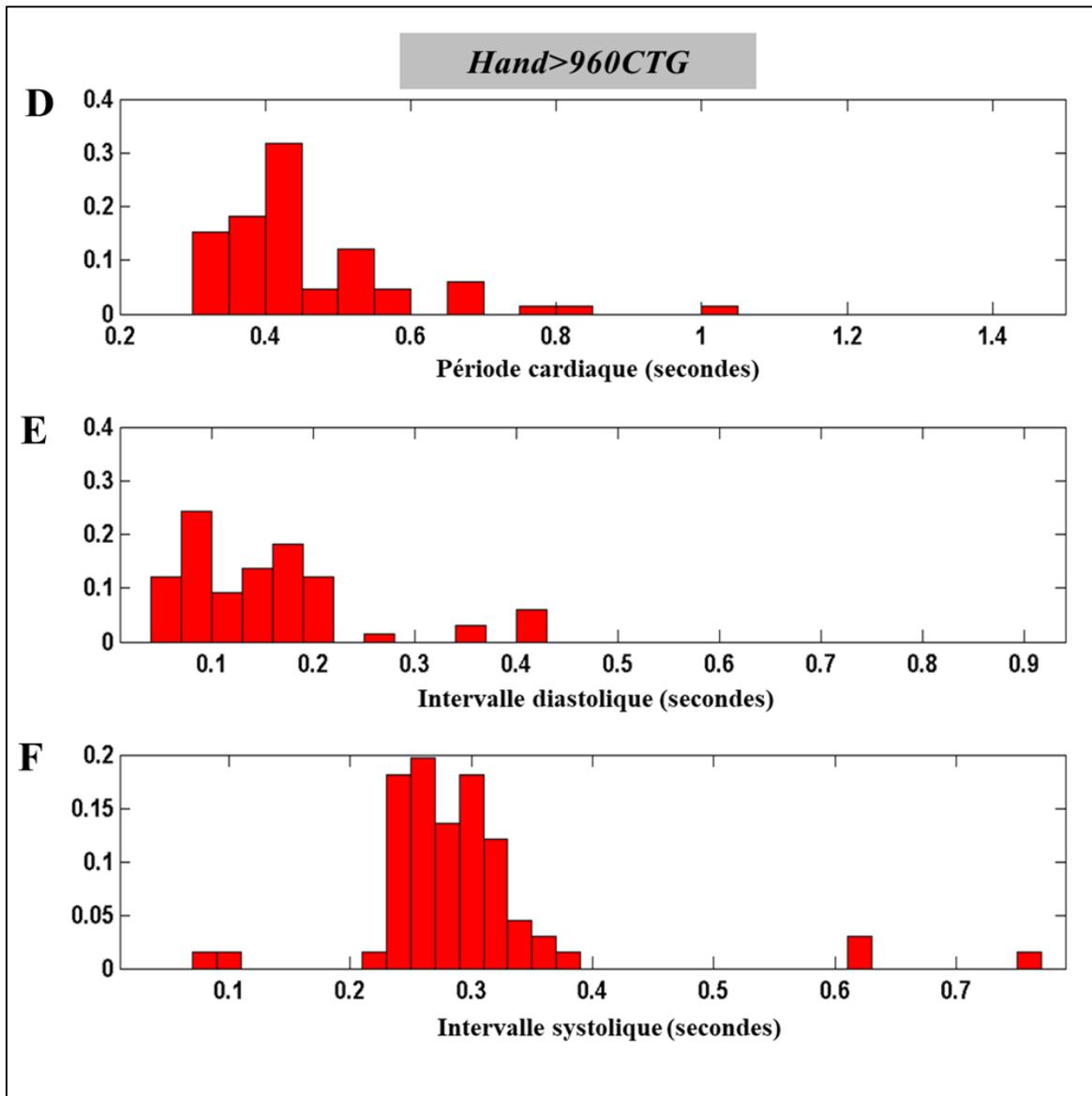
Une fois que le phénotype d'arythmie est présent dans nos lignées DM1, j'ai posé la question sur le type d'arythmie observée. Pour répondre à cette question nous avons procédé à classifier les arythmies en bradycardie et tachycardie. Concernant la lignée *Hand>960CTG*, nous avons observé que à l'âge d'une semaine, 73% des mouches analysées présentent une arythmie et 27 % présentent un rythme cardiaque régulier (Figure 32). Cependant, les arythmies observées dans cette lignée présentent une distribution des périodes cardiaques irrégulière avec des valeurs majoritairement allant de 0.3 secondes à 0.5 secondes ce qui est très proche du contrôle *UAS-960CTG* (0.4 secondes), et ne peuvent être classé ni en bradycardie ni en tachycardie.



**Figure 32. Prévalence des arythmies dans la lignée DM1 exprimant des expansion CTG âgée d'1 semaine.** 73% des mouches *Hand>960CTG* présentent une arythmie et 27% présentent un rythme cardiaque régulier. n=20 cœurs.

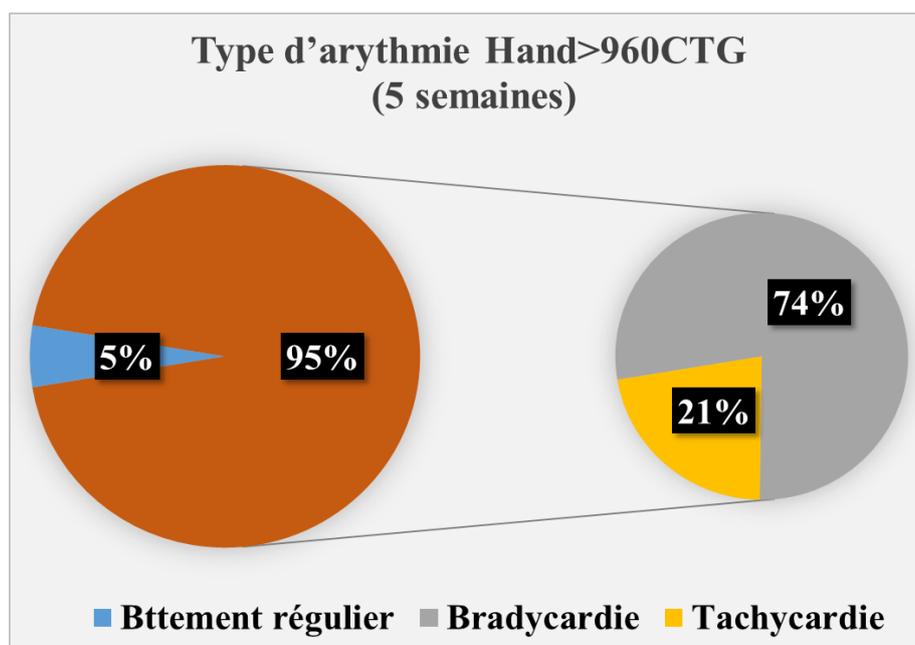
La figure 33 montre une distribution des périodes cardiaques pour des films de 30 secondes. Nous observons que les périodes cardiaques du cœur control *UAS-960CTG* âgé d'une semaine sont homogènes d'une durée moyenne de 0.4 secondes avec des intervalles diastoliques et systoliques régulières d'une durée moyenne de 0.1-0.2 secondes et 0.2 secondes respectivement (Figure 33 A,B,C). Cependant, les périodes cardiaques de la mouche *Hand>960CTG* âgée d'une semaine sont irrégulières et présentent une durée variable allant de 0.3 secondes à 1 seconde (Figure 33 D). Ce défaut est associé à une irrégularité des intervalles diastoliques avec une durée allant de 0 seconde à 0.4 secondes et des intervalles systoliques d'une durée allant de 0.1 secondes à 0.8 secondes (Figure 33 E,F).





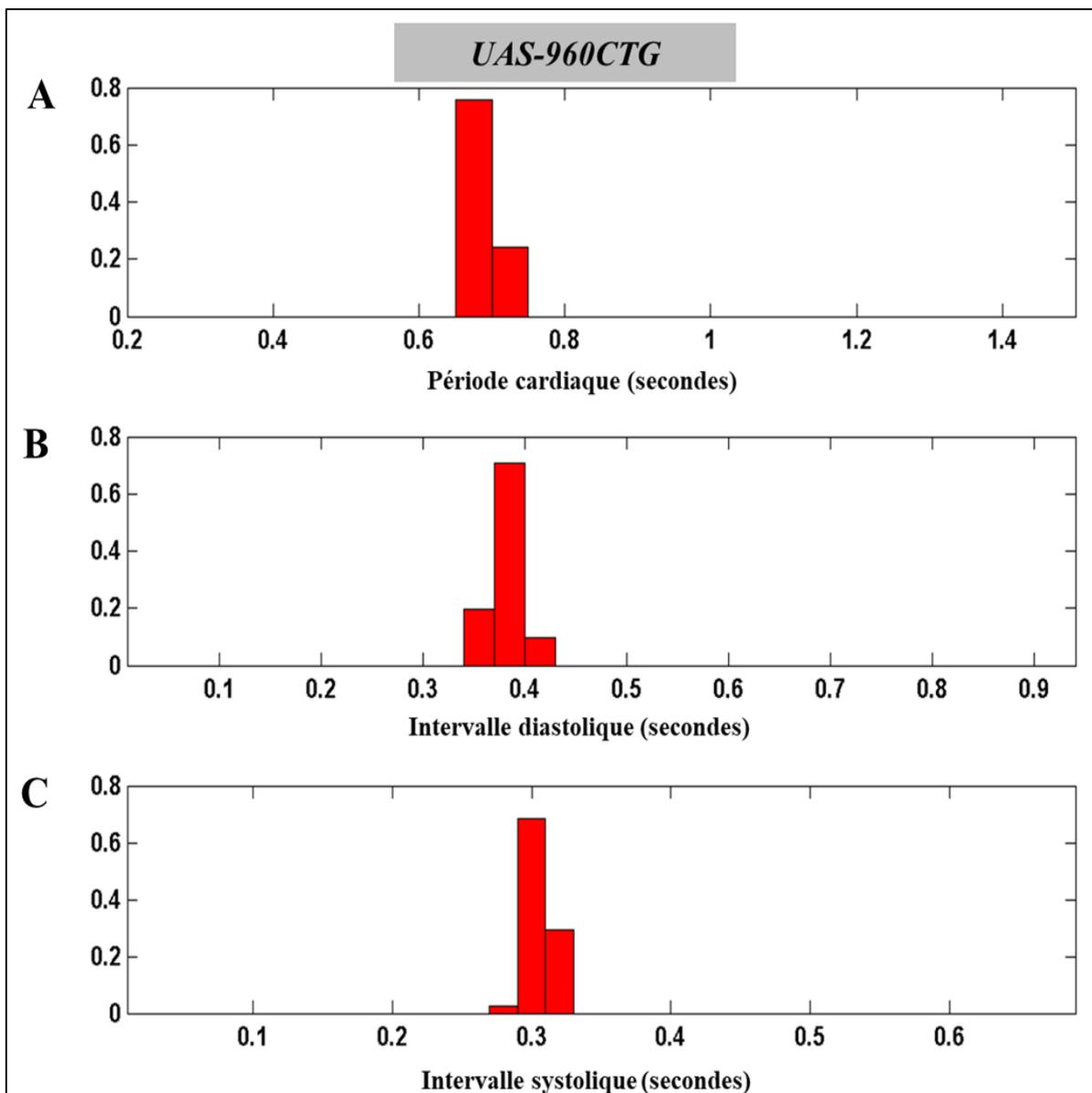
**Figure 33 : Analyse de paramètres de rythme cardiaque dans une lignée DM1 exprimant des expansions CTG âgée d'1 semaine.** Exemple de distribution des périodes cardiaques sur un film de 30 sec pour la lignée contrôle *UAS-960CTG* (A) illustrant une homogénéité des périodes cardiaques avec une durée moyenne de 0.4 sec. (D) Les périodes cardiaques dans la lignée DM1 *Hand>960CTG* sont hétérogènes allant de 0.3 à 0.7 sec illustrant une arythmie. (B) Distribution homogène des intervalles diastoliques dans la lignée contrôle *UAS-960CTG* avec une durée moyenne d'environ 0.2 sec. (E) Distribution hétérogène des intervalles diastoliques dans la lignée *Hand>960CTG* avec des durées variables allant de 0 à 0.4 sec. (C) Distribution des intervalles systoliques homogènes du contrôle *UAS-960CTG* d'une valeur d'environ 0.2 sec. (F) Distribution des intervalles systoliques de la lignée *Hand>960CTG* illustrant un défaut du paramètre systolique avec des intervalles variable allant de 0.1 à 0.4 sec.

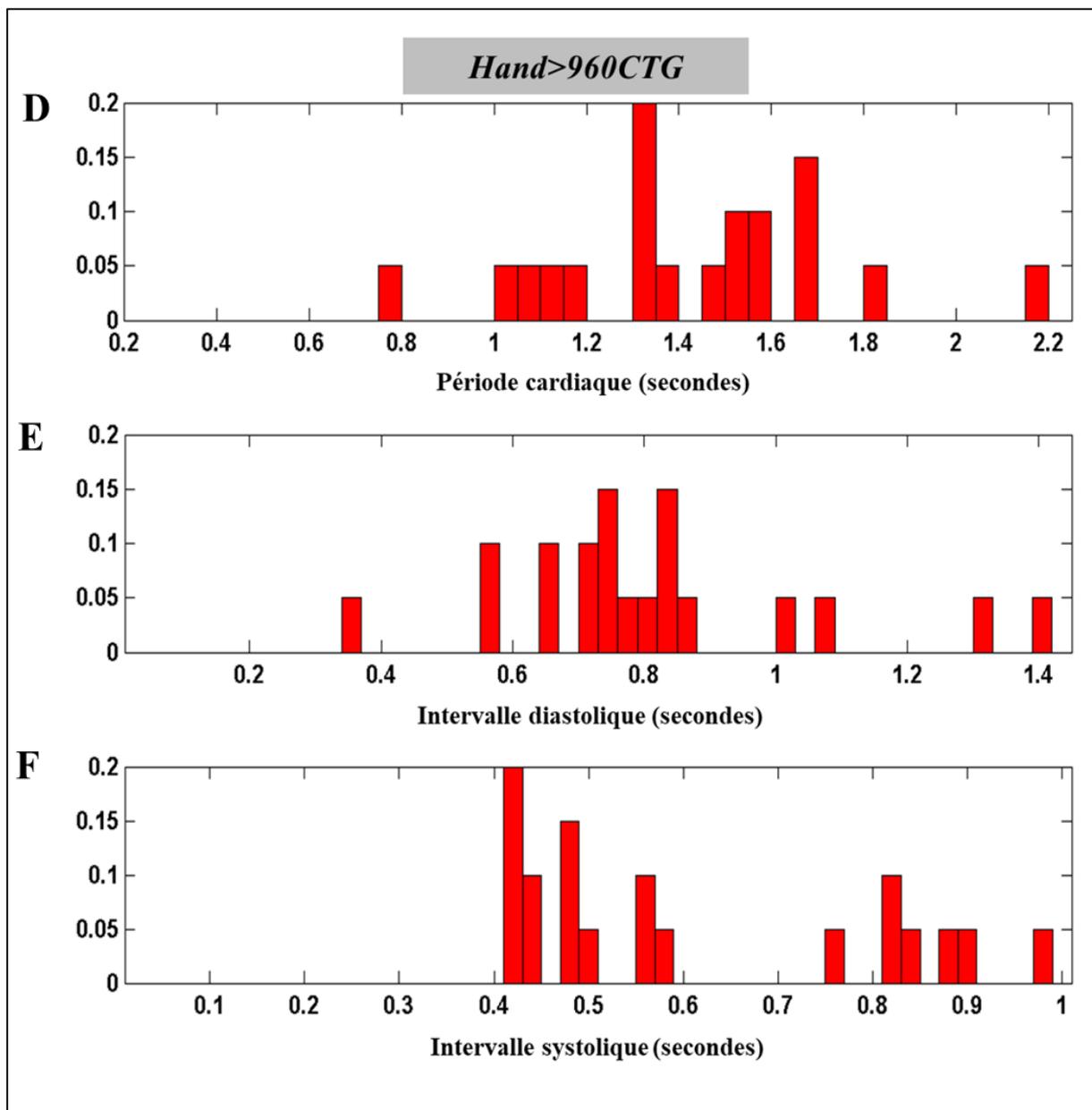
A l'âge plus avancé (5 semaines), nous avons observé que 95% des mouches *Hand>960CTG* présentent des arythmies cardiaques (Figure 34). La distribution des périodes cardiaques étant largement variable dans ces mouches nous avons pu classifier les arythmies observées en tachycardie ou bradycardie. En se basant sur la moyenne des périodes cardiaques du contrôle *UAS-960CTG* à 5 semaines (0.7 secondes), nous avons considéré que les arythmies avec des périodes cardiaques d'une durée supérieure à 0.7 secondes sont considérées comme bradycardie, et les arythmies avec des périodes cardiaques d'une durée inférieure à 0.7 secondes sont considérées comme tachycardie. En se basant sur cette classification nous avons observé que 74% des mouches *Hand>960CTG* arythmiques âgées de 5 semaines présentent une bradycardie et 21% présentent une tachycardie (Figure 34).



**Figure 34 : Distribution des arythmies cardiaques dans la lignée DM1 exprimant des expansions CTG à 5 semaines.** 95% des mouches *Hand>960CTG* présentent une arythmie cardiaque : 21% de type accélération de battement cardiaque (tachycardie) et 74% de type ralentissement de battement cardiaque (bradycardie). n =20 cœurs

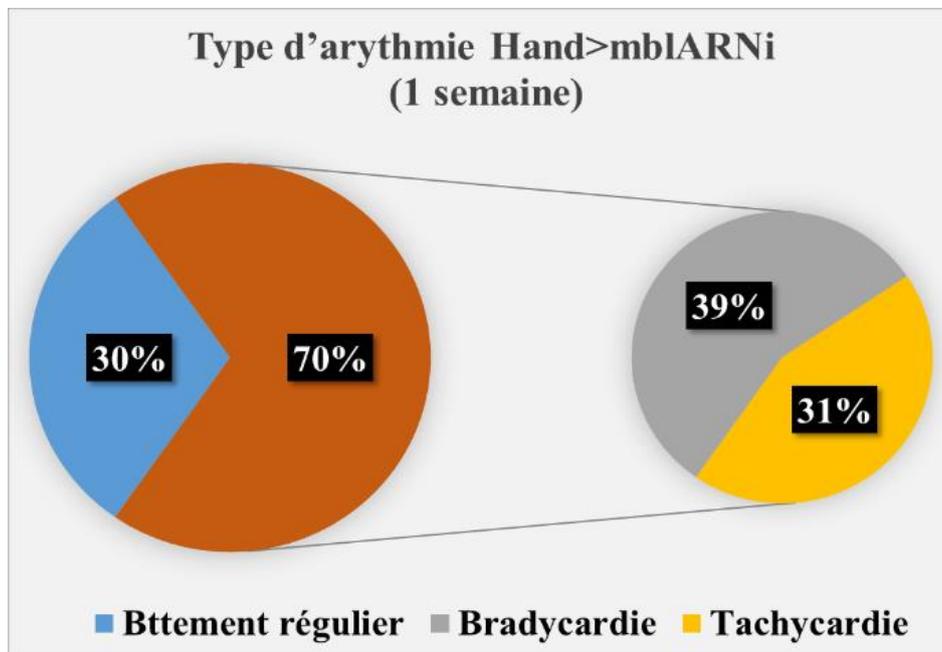
La figure 35 montre un exemple de la distribution des périodes cardiaques pour des films de 30 secondes. Nous observons que la distribution des périodes cardiaques dans la lignée *Hand>960CTG* âgée de 5 semaines est hétérogène et très variable mais la majorité des périodes cardiaques sont longues allant de 0.8 secondes à 2.2 secondes (Figure 35 D). Cette perturbation des périodes cardiaques est associée à des intervalles diastoliques et systoliques longues et irrégulières allant de 0.4 secondes à 1.4 secondes et de 0.4 secondes à 1 seconde respectivement (Figure 35 E,F).





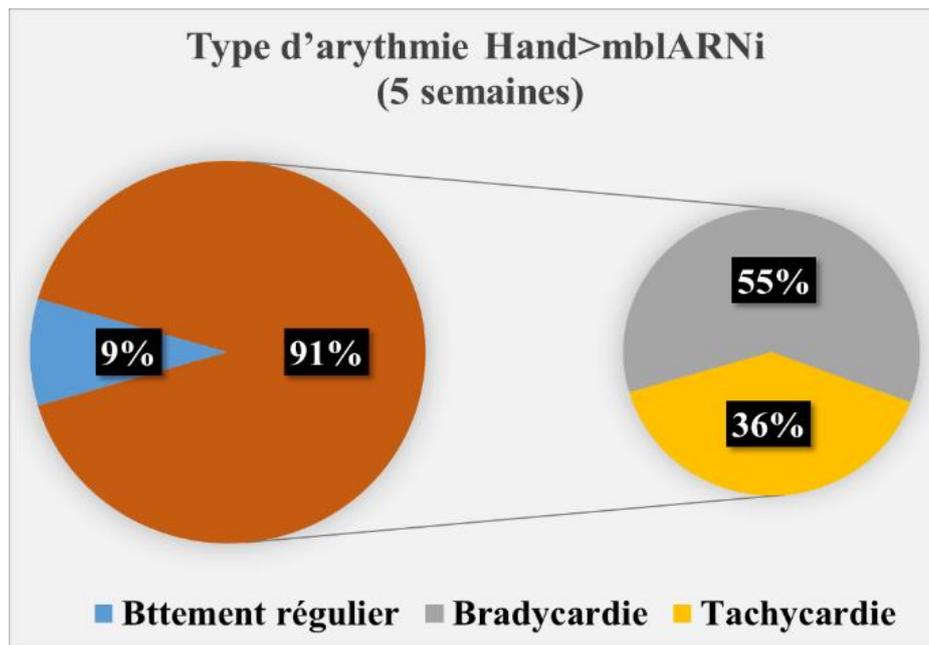
**Figure 35 : Analyse de paramètres de rythme cardiaque dans une lignée DM1 exprimant des expansions CTG âgée de 5 semaines.** Exemple de distribution des périodes cardiaques sur un film de 30 sec pour la lignée contrôle *UAS-960CTG* (A) illustrant une homogénéité des périodes cardiaques avec une durée moyenne de 0.7 sec. (D) Les périodes cardiaques dans la lignée DM1 *Hand>960CTG* sont hétérogènes et très longues allant de 0.8 à 2.2 sec illustrant une arythmie de type bradycardie (ralentissement de battement cardiaque). (B) Distribution homogène des intervalles diastoliques dans la lignée contrôle *UAS-960CTG* avec une durée moyenne d'environ 0.4 sec. (E) Distribution hétérogène des intervalles diastoliques dans la lignée *Hand>960CTG* avec des durées variables et longues allant de 0.3 à 1.4 sec. (C) Distribution des intervalles systoliques homogènes du contrôle *UAS-960CTG* d'une valeur d'environ 0.3 sec. (F) Distribution des intervalles systoliques de la lignée *Hand>960CTG* illustrant un défaut du paramètre systolique avec des intervalles variables et longues allant de 0.4 à 1 sec.

Nous avons effectué les mêmes analyses sur le modèle atténué pour *mbl*, et nous avons observé que 70% des mouches *Hand>mblARNi* âgées d'une semaine présentent une arythmie et 30% présentent un rythme cardiaque régulier (Figure 36). En se basant sur la moyenne des périodes cardiaques du contrôle *UAS-mblARNi* âgé d'une semaine, nous avons considéré les arythmies avec des périodes cardiaques inférieures à 0.4 secondes comme tachycardie et les arythmies avec des périodes cardiaques supérieures à 0.4 secondes comme bradycardie. Nous observons que 39% des mouches *Hand>mblARNi* présentent une bradycardie et 31% présentent une tachycardie (Figure 36).



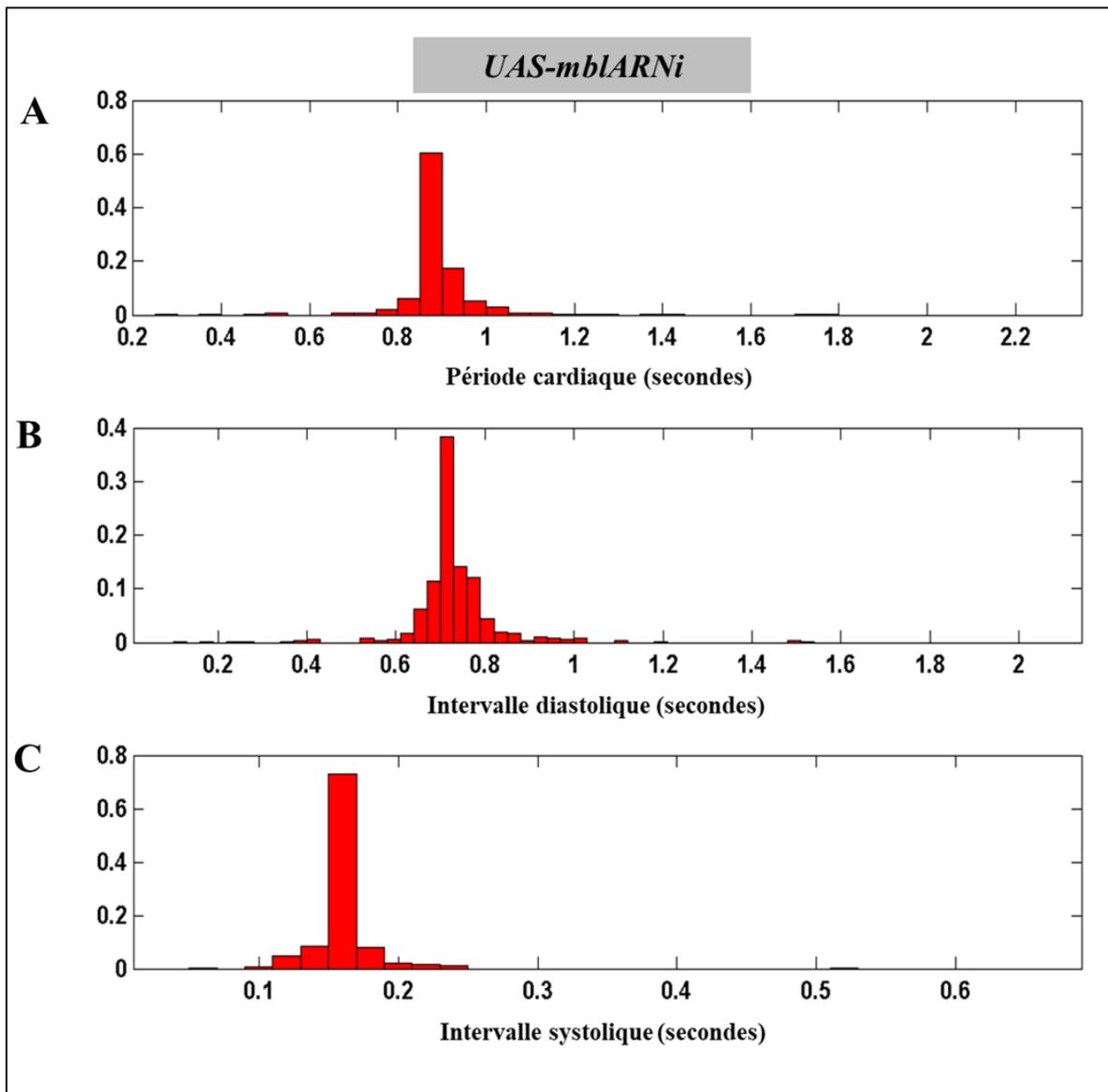
**Figure 36 : Distribution des arythmies cardiaques dans la lignée DM1 atténuée pour *mbl*, mouches âgées d'1 semaine.** 70% des mouches *Hand>mblARNi* présentent une arythmie cardiaque : 31% de type accélération de battement cardiaque (tachycardie) et 39% de type ralentissement de battement cardiaque (bradycardie). n= 20 cœurs.

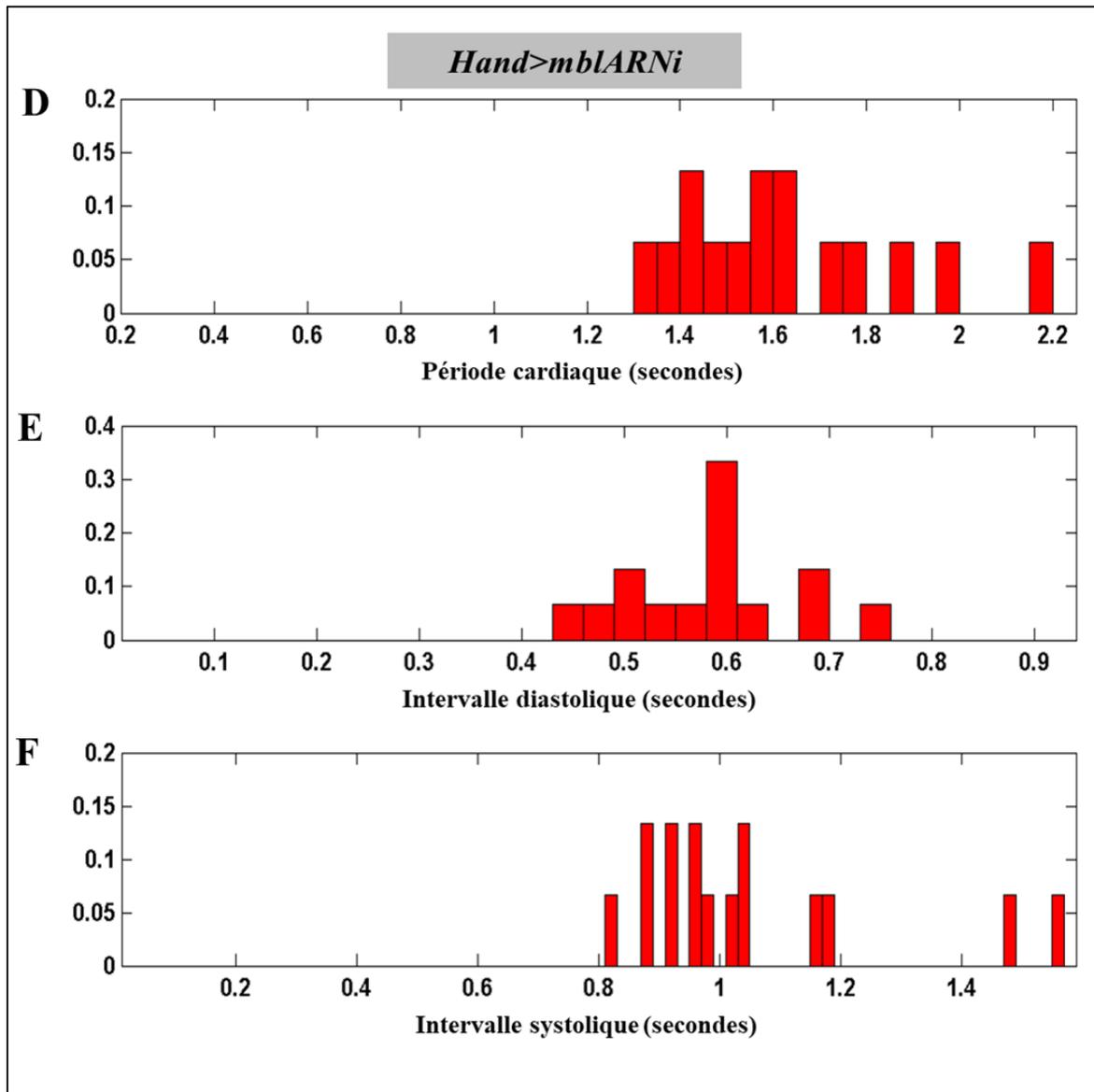
A 5 semaines d'âge, le pourcentage de mouche avec des arythmies augmentent et 91% des mouches *Hand>mblARNi* présentent une arythmie. En se basant sur la moyenne des périodes cardiaques du contrôle *UAS-mblARNi* âgé de 5 semaines qui est de 0.9 secondes, nous observons que 55% des arythmies observées sont de type bradycardie et 36% sont de type tachycardie (Figure 37).



**Figure 37 : Distribution des arythmies cardiaques dans la lignée DM1 atténuée pour *mbl*, mouches âgées de 5 semaines.** 91% des mouches *Hand>mblARNi* présentent une arythmie cardiaque : 36% de type accélération de battement cardiaque (tachycardie) et 55% de type ralentissement de battement cardiaque (bradycardie). n=20 cœurs.

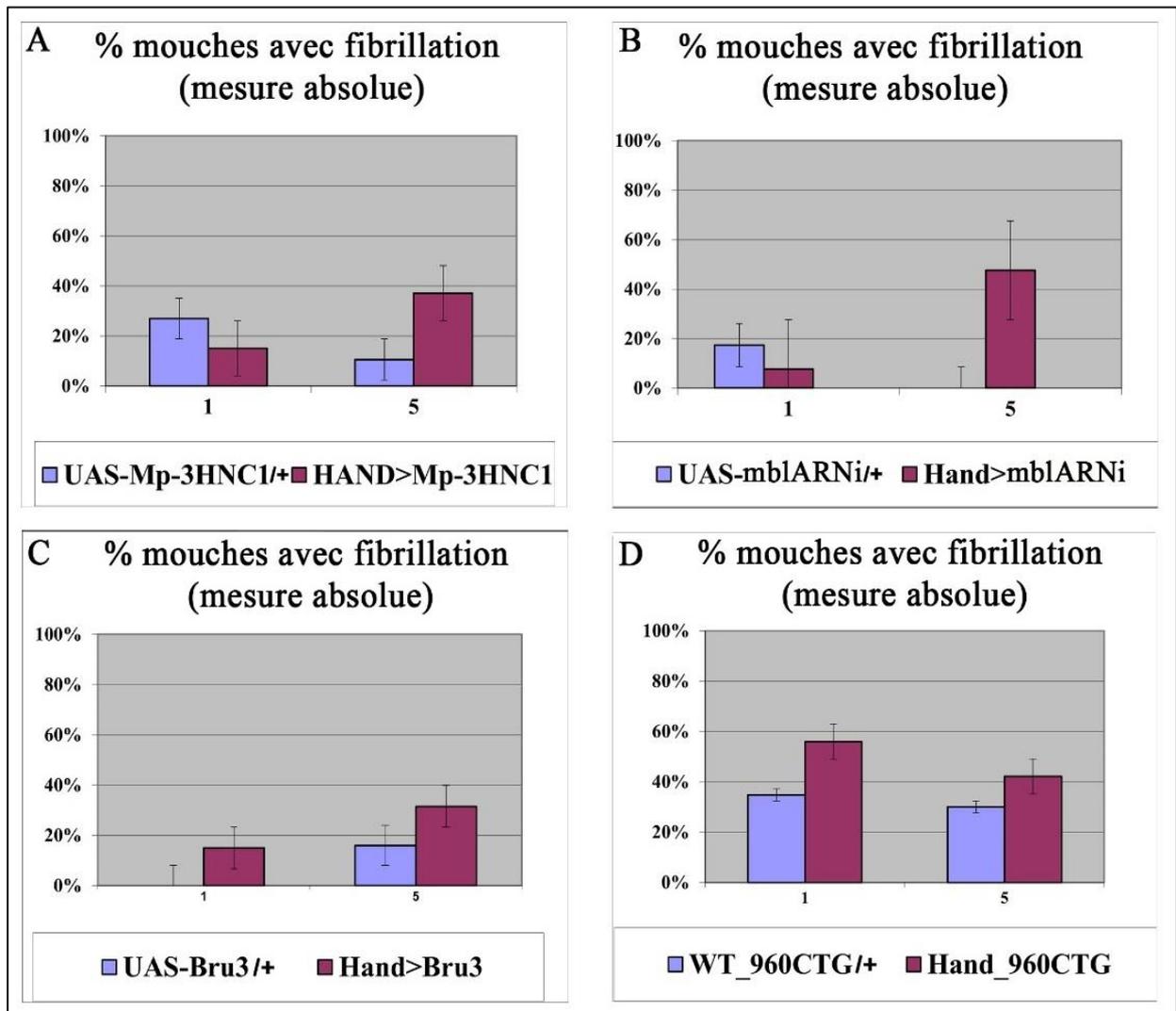
La figure 38 montre un exemple de la distribution des paramètres du rythme cardiaques sur des films de 38 secondes pour une lignée atténuée pour *mbl* et son contrôle. Nous observons dans la lignée *Hand>mblARNi* âgée de 5 semaines une distribution de périodes cardiaques de manière irrégulière avec des durées variables et longues allant de 1.2 secondes à 2.2 secondes (Figure 38 D) en comparaison au contrôle *UAS-mblARNi* qui présente des périodes cardiaques d'une durée moyenne de 0.9secondes (Figure 38 A). L'élongation des périodes cardiaques dans la lignée *Hand>mblARNi* se manifeste par des intervalles diastoliques (Figure 38 E) et systoliques (Figure 38 F) irrégulières et longues en comparaison avec ceux du contrôle *UAS-mblARNi* (Figure 38 B,C).





**Figure 38 : Analyse de paramètres de rythme cardiaque dans une lignée DM1 atténuée pour *mbl* âgée de 5 semaines.** Exemple de distribution des périodes cardiaques sur un film de 30 sec pour la lignée contrôle *UAS-mblARNi* (A) illustrant une homogénéité des périodes cardiaques avec une durée moyenne de 0.9 sec. (D) Les périodes cardiaques dans la lignée *Hand>mblARNi* sont hétérogènes et très longues allant de 1.3 à 2.2 sec illustrant une arythmie de type bradycardie (ralentissement de battement cardiaque). (B) Distribution homogène des intervalles diastoliques dans la lignés contrôle *UAS-mblARNi* avec une durée moyenne d'environ 0.7 sec. (E) Distribution hétérogène des intervalles diastoliques dans la lignée *Hand>mblARNi* avec des durées variables et longues allant de 0.4 à 0.8 sec. (C) Distribution des intervalles systoliques homogènes du contrôle *UAS-mblARNi* d'une valeur d'environ 0.15 sec. (F) Distribution des intervalles systoliques de la lignée *Hand>mblARNi* illustrant un défaut du paramètre systolique avec des intervalles variables et longues allant de 0.8 à 1.5 sec.

Dans la lignée surexprimant Mp, nous avons également observé un autre type d'arythmie cardiaque c'est la fibrillation qui est augmentée à 37% dans la lignée *Hand>Mp-3HNC1* âgée de 5 semaines en comparaison avec le contrôle *UAS-Mp-3HNC1* (10%) (Figure 39 A), similaires aux résultats observés dans *Hand>mblARNi* et *Hand>Bru3* âgées de 5 semaines dans lesquelles la fibrillation était augmentée à 47% et 31% respectivement (Figure 39 B,C) et également la lignée *Hand>960CTG* qui présentent des fibrillations à 1 et 5 semaines (Figure 39 D).



**Figure 39 : Pourcentage de mouches qui fibrillent mesuré par SOHA.** Pourcentage des mouches avec des fibrillations dans la lignée gain de fonction Mp (*Hand>Mp-3HNC1*) et son contrôle (*UAS-Mp-3HNC1*), et les trois lignées DM1 (*Hand>mblARNi*, *Hand>Bru3*, *Hand>960CTG*) et leurs contrôles (*UAS-mblARNi*, *UAS-Bru3*, *UAS-960CTG*) à 1 et 5 semaines d'âge. n=20 cœurs.

D'après l'ensemble de ces résultats nous avons pu conclure que *Mp* joue un rôle important non seulement dans le développement cardiaque mais également dans la fonction et la rythmicité du cœur adulte sans être indispensable pour la viabilité de la Drosophile. La perte de fonction de *Mp* spécifiquement dans le tissu cardiaque réduit la taille du cœur, ce qui est associé à des arythmies cardiaques de type accélération (tachycardie), et au contraire, la surexpression de *Mp* induit une cardiomyopathie dilatée (résultats de l'article) ce qui affecte la contractilité cardiaque et aussi induit une arythmie cardiaque de type ralentissement (bradycardie). Ces résultats indiquent que le niveau d'expression de *Mp* est critique dans le maintien de la fonction cardiaque et la structure cardiaque chez la mouche adulte et suggèrent l'implication de la surexpression de *Mp* dans la bradycardie observée dans nos lignées *Hand>960CTG* et *Hand>mblARNi*.

### III. Matériel et méthodes

#### 1. Lignées de Drosophiles

Tous les stocks de Drosophiles utilisés dans cette étude ont été cultivés et croisés à 25 °C sur un milieu de culture standard. Concernant l'étude fonctionnelle de *Mp*, nous avons utilisé une lignée invalidée pour *Mp* « *Dmp*<sup>f07253/ f07253</sup> » et deux lignées UAS-MpARNi-TRIP: *P{TRiP.HMJ21668}attP40* et *P{TRiP.JF02929}attP2* ; et deux lignées UAS-MpARNiKK: *P{KK103713}* et *P{KK108613}* et deux lignées gain de fonction *Mp* *UAS-3HNC1* et *UAS-NCI* (Meyer and Moussian, 2009). Comme décrit dans l'article, toutes les lignées inductibles ont été croisées avec la lignée pilote *Hand-Gal4* afin d'induire l'expression des transgènes d'intérêt spécifiquement dans le cœur (cardiomyocytes et cellules péricardiaques). Les lignées contrôles pour chaque contexte ont été générées par le croisement de chaque lignée inductible avec la lignée *w*<sup>118</sup>.

#### 2. Hybridation *in situ* Stellaris

Pour la détection des transcrits *Mp*, les mouches ont été disséquées et fixées pendant 20 min avec le paraformaldéhyde 4 %, rincées au PBS 1X -Tween 0,1 % trois fois, 10 min chaque lavage. Ensuite, les échantillons ont été perméabilisés avec l'éthanol à 75 % à 4 °C pendant une nuit. Puis incubé 5 min dans le tampon de lavage ARN FISH (5mL Formamide,

0.5mL ssc 20X, 100  $\mu$ L SS DNA, 5  $\mu$ L Heparin 100ng/  $\mu$ L, 10  $\mu$ L Tween). L'hybridation in situ a été réalisée avec 100  $\mu$  de tampon d'hybridation (5mL Formamide, 0.5mL ssc 20X, 100  $\mu$ L SS DNA, 20  $\mu$ L tARN 50ng/  $\mu$ L, 5  $\mu$ L Heparin 100ng/  $\mu$ L, 10  $\mu$ L Tween) contenant 2  $\mu$  de la sonde Stellaris FISH contre *Multiplexin* marqué par CAL Fluor Red 635 Dye (Biosearch Technologies), puis les échantillons ont été incubés à 37°C pendant une nuit. Pour la FISH à molécule unique, des sondes Stellaris FISH personnalisées ont été conçues par rapport au Mp en utilisant le Stellaris FISH Probe Designer (Biosearch Technologies, Petaluma, CA, USA) disponible en ligne sur le site [www.biosearchtech.com/stellarisdesigner](http://www.biosearchtech.com/stellarisdesigner). Pour éliminer l'hybridation d'ARN non spécifique, les échantillons ont été lavés deux fois avec un tampon de lavage ARN FISH pendant 30 min à 37°C.

L'incubation avec l'anticorps primaire a été effectuée pendant une nuit à 4 ° C avec des anticorps de lapine anti-Bru-3 (1:150) et souris anti-FMRP (1/150). Les cœurs ont ensuite été lavés trois fois pendant 10 min avec PBT 1X et incubés avec des anticorps secondaires fluorescents anti-lapin Alexa 488 (1/150) ou anti-souris cy3 (1/150) pendant 2 h à température ambiante. Les échantillons ont été montés dans du Vectashield avec DAPI. Après lavages, les préparations sont montées dans un milieu Vectashield + DAPI. Les préparations de marquage par immunofluorescence ont été ensuite analysées à l'aide d'un microscope confocale Leica SP8. Ensuite la quantification de la colocalisation entre deux composants : ARN Mp/ Bru3, ARN Mp/ FMRP ou FMRP/ Bru3 a été effectué sur Imaris version 9.1.

### 3. RT-qPCR pour ARN Mp

La RT-qPCR a été effectuée comme décrit dans l'article. Pour l'ARNm de *Mp* nous avons utilisé le couple d'amorces : sens CATGAAGATGGTCTGGCACG et antisens GGATGATCAGCTTGCTGTCG. Et pour les transcrits *Mp* naissants nous avons utilisé le couple d'amorces : sens TACACGCACAATTAGGTACG et antisens TTGCTCCAC ATCGCCAACT.

#### IV. Discussion

La dystrophie myotonique de type 1 est une maladie à expansion CTG au niveau de région 3'UTR du gène *DMPK*. En effet, l'expression des expansions CUG induit un effet d'ARN toxique pour la cellule caractérisé principalement par des changements de la disponibilité de deux facteurs d'épissage alternatif clé impliqués dans le développement musculaire et cardiaque : MBNL1 et CELF1. Les répétitions CUG induisent la séquestration des protéines de la famille MBNL (MBNL1, 2 et 3), et la stabilisation de la protéine CELF1. Ces deux facteurs jouent un rôle antagoniste dans la régulation de l'épissage alternatif des transcrits communs responsables de la transition des isoformes de la forme fœtale à la forme adulte. Le déséquilibre de la balance entre MBNL1 et CELF1 conduit à l'apparition des isoformes de la forme fœtale chez la personne adulte associées à plusieurs symptômes de la DM1. Bien que la majorité des analyses transcriptomiques faites dans les modèles animaux et chez les patients DM1 s'intéressent aux défauts d'épissage alternatif pour expliquer les symptômes observés dans la DM1, une analyse de transcriptome cardiaque effectuée dans notre équipe par Emilie Plantié (doctorat obtenu en 2016) a révélé un nombre important de gènes dérégulés dans les modèles de *Drosophile* DM1 qui codent pour des transcrits uniques, ce qui implique que la dérégulation de ces gènes est indépendante de l'épissage alternatif. Cela met en jeu d'autres mécanismes comme la régulation en 3'UTR par les facteurs se liant aux ARN mais également via les miARN. En fait, ces dernières années, la dérégulation des miARN et leur implication dans les symptômes observés chez les patients DM1 sont de plus en plus étudiés puisque des analyses des biopsies de patients DM1 ont révélé une dérégulation importante de plusieurs miARN dans les tissus les plus touchés dans la maladie, à savoir le tissu musculaire et cardiaque. Nous citons par exemple la dérégulation de *miR-7*, *miR-10*, *miR-133a/b*, *miR-33*, *miR-29b/c*, *miR-206*, *miR-335* dans les muscles squelettiques et la dérégulation de *miR-30b*, *miR-29b*, *miR-145*, *let7-g*, *miR-26a*, *miR-328*, *miR-23*, *miR-365*, *miR-499*, *miR-125b*, *miR-148a*, *miR-133a*, *miR194*, *let-7d*, *miR-127a*, *miR-22*, *miR-100* dans le cœur (Koehorst et al., 2020). *miR-1* représente le miARN le plus étudié et il est retrouvé également dérégulé dans le muscle cardiaque et squelettique chez les patients DM1 (Koehorst et al., 2020).

### 1. *miR-1* est dérégulé dans le modèle de *Drosophile* DM1

L'importance de *miR-1* dans le développement et le fonctionnement cardiaque nous a conduit à étudier son implication dans les défauts cardiaques observés chez les patients DM1. En effet, *miR-1* est un miARN conservé en séquence et en fonction entre la *Drosophile* et l'Homme. Il est impliqué dans la cardiogenèse et retrouvé faiblement exprimé dans les biopsies cardiaques des patients DM1 et sa faible expression a été associée aux défauts de la conduction cardiaque et aux arythmies causés principalement par la surexpression de ses gènes cibles : *GJAI* et *CACNA1C* respectivement (Rau et al., 2011).

Dans un premier temps nous avons entrepris d'analyser l'expression de *dmiR-1* dans le tissu cardiaque de nos trois modèles DM1 : un modèle exprimant 960 CTG, un modèle atténué pour *mbl* (orthologue de *MBNL1*) et un modèle surexprimant *Bru3* (orthologue de *CELF1*). Des expériences de FISH montrent une diminution de l'expression de *dmiR-1* dans les cardioblastes et les cellules péricardiaques de la lignée *Hand>960CTG*, *Hand>Bru3* et *Hand>mblARNi*, qui persiste dans le temps. Cependant l'analyse par RT-qPCR de *pre-dmiR-1* montre son augmentation dans le modèle *Hand>960CTG* et *Hand>mblARNi*. Nous suggérant que dans le modèle *Hand>960CTG* et *Hand>mblARNi*, la protéine *mbl* est incapable d'assurer la maturation de *pre-dmiR-1*, soit parce qu'elle est séquestrée par les répétitions CUG dans la lignée *Hand>960CTG* ou elle est atténuée par ARN interférence dans la lignée *Hand>mblARNi* conduisant à l'accumulation de *pre-dmiR-1* concomitante à la diminution des niveaux de *dmiR-1* mature. Ces résultats sont similaires aux données observées dans la culture cellulaire de cellules surexprimant 960 répétitions CUG ou atténuées pour *MBNL1* (Rau et al., 2011) et aussi dans le modèle de *Drosophile* exprimant 480 répétitions CUG ou atténuée pour *mbl* qui présentent des niveaux faibles de *miR-1* mature mais une quantité inchangée de son précurseur *pre-miR-1* suggérant un défaut de la maturation (Fernandez-Costa et al., 2013).

Le niveau faible de *dmiR-1* observé dans la lignée *Hand>Bru3* reste inexpliqué par le fait que l'implication du facteur *Bru3* dans la biogenèse de *dmiR-1* est inconnue à ce jour. Cependant des expériences de la surexpression et de la déplétion de *CELF1* dans des cellules HeLa exprimant *pri-miR-1* de manière exogène a permis d'exclure son rôle dans la maturation de *miR-1* parce que le gain de fonction et la perte de fonction de *CELF1* n'avait aucun effet sur la quantité de *miR-1* mature (Rau et al., 2011). Cela laisse suggérer l'implication d'un autre mécanisme moléculaire pour expliquer le niveau faible de *dmiR-1* observé dans la lignée *Hand>Bru3* comme un mécanisme de déstabilisation/ dégradation de *miR-1* mature. En fait,

chez les mammifères le facteur CELF1 se lie aux *miARNs* riches en UG et favorise le recrutement de la ribonucléase poly(A)-spécifique (PARN) au niveau de la région 3'NT de miARN ce qui induit une déadénylation et une déstabilisation de miARN cible conduisant à sa dégradation (Kato et al., 2015). Le fait que la séquence de *pri-miR-1*, *pré-miR-1* et *miR-1* mature présente des motifs UGU pouvant être reconnus par CELF1 suggèrent la possibilité de CELF1 à se lier à *miR-1* pour réguler sa stabilité/ dégradation (Teplova et al., 2010). Cependant la conservation de ce mécanisme chez la Drosophile reste incertaine.

Afin de déterminer la conséquence de la diminution de l'expression de *dmiR-1* sur la structure et la physiologie du cœur adulte chez la Drosophile, nous avons analysé une lignée atténuée pour *dmiR-1* (*Hand>dmiR-1 sponge*) qui mime le contexte DM1, rappelant que le KO *dmiR-1* est létal aux stades embryonnaires. Nos résultats de l'analyse de la physiologie cardiaque montrent que la diminution de l'expression de *dmiR-1* spécifiquement dans le tissu cardiaque induit une cardiomyopathie dilatée, similaire à ce qui est observé dans le modèle de souris invalidée pour *miR-1* (Wei et al., 2014). Ce phénotype est observé également dans les deux modèles DM1 *Hand>Bru3* et *Hand>mblARNi*. Ces résultats apportent un appui fonctionnel aux études qui ont révélé une diminution de l'expression de *miR-1* dans le cœur de modèle de souris avec une cardiomyopathie dilatée (Isserlin et al., 2014) et chez les patients avec une cardiomyopathie dilatée en stade terminale (Ikeda et al., 2007).

## 2. *Mp* est surexprimée dans les modèles DM1 via une régulation 3'UTR dépendante

Afin d'identifier les gènes cibles de *dmiR-1* qui peuvent être associés à la cardiomyopathie dilatée observée dans le modèle surexprimant *Bru3* et le modèle atténué pour *mbl*, nous avons combiné les données d'une analyse de transcriptome cardiaque dans le contexte DM1 chez la Drosophile (données du laboratoire) avec les données d'analyse *in silico* des régions 3'UTR des gènes différentiellement exprimés dans les modèles de Drosophile DM1. Cela nous a permis d'identifier le gène *Multiplexin* (*Mp*) comme étant à la fois dérégulé dans les deux contextes DM1 (*Hand>Bru3* et *Hand>mblARNi*) et cible potentielle de *dmiR-1*.

D'après les données de l'équipe sur le transcriptome cardiaque obtenu par TU-tagging à partir des deux modèles de Drosophile DM1 inductibles (*Hand>mblARNi* et *Hand>Bru3*), le niveau des transcrits du gène *Mp* a été augmenté par rapport au contrôle (*Hand>LacZ*) dans les deux contextes DM1, mais de manière significative (FC>1.7) uniquement dans la condition *Hand>Bru3* à 5 semaines. La technique de TU-tagging pour l'extraction des ARN

spécifiquement cardiaques consiste à croiser la lignée pilote *Hand-GALA* avec la lignée *UAS-UPRT* permettant de donner des descendants (F1) avec une expression de l'enzyme UPRT (*Uracile PhosphoRibosyl Transferase*) uniquement dans le tissu cardiaque. Après l'ajout de l'uracile modifié le 4-thio Uracile (4-TU) dans la nourriture des mouches, uniquement les ARN cardiaques sont modifiés par l'incorporation de cette base uracile modifiée (4-TU) dans l'ARN néo synthétisé, mécanisme médié par l'enzyme UPRT. Après extraction des ARN néo synthétisés totaux de la mouche, les ARN spécifiquement cardiaques qui ont été modifiés par l'incorporation de l'uracile 4-TU sont purifiés à l'aide du système Biotine-Streptavidine puis séquencés et les gènes différentiellement exprimés sont identifiés.

Pour tester si le niveau d'expression de la protéine Mp est cohérent avec les données transcriptomiques de TU-tagging, nous avons analysé l'expression de la protéine Mp par immunomarquage dans les deux contextes DM1. Les résultats obtenus montrent que dans le contexte physiologique, Mp est exprimée dans le cœur adulte au niveau des fibres circulaires (cardioblastes) et détectée au niveau de la matrice extracellulaire de la paroi interne et externe de tube cardiaque, ce qui est cohérent avec la littérature (Harpaz et al., 2013). De manière intéressante, nos données montrent que la protéine Mp est augmentée dans les deux modèles DM1 : *Hand>Bru3* et *Hand>mblARNi* âgés d'une et de cinq semaines. Cela indique que les niveaux de la protéine Mp dans le cœur des mouches DM1 sont différents des niveaux de transcrits Mp neo-synthétisés révélés par TU-tagging, où l'expression du gène Mp n'était pas significativement augmentée dans le contexte *Hand>mblARNi* à 1 et à 5 semaines et *Hand>Bru3* à 1 semaine. Cette divergence reste néanmoins compréhensible soulignant que l'expression du gène au niveau du transcrit ne reflète pas l'expression protéique ce qui suggère une régulation post-transcriptionnelle soit au niveau de la traduction de l'ARNm, soit au niveau de la stabilité des transcrits.

La surexpression de Mp dans la lignée *Hand>mblARNi* est probablement due à la diminution des niveaux de *dmiR-1* mature visualisé par FISH. En fait, l'analyse de lignées transgéniques avec la séquence 3'UTR de Mp (avec ou sans séquence cible de *dmiR-1*) clonée en 3' NT du gène *GFP* a permis de valider *in vivo* la régulation directe de Mp par *dmiR-1* ce qui explique que l'atténuation de *mbl* affecte la maturation de *pre-dmiR-1* conduisant à la surexpression de sa cible directe Mp.

Cependant, dans le contexte *Hand>Bru3*, l'augmentation des niveaux de Mp pourrait être liée à deux mécanismes différents. D'un côté, le niveau faible de *dmiR-1* observé dans le tissu

cardiaque de la lignée *Hand>Bru3* nous laisse supposer que c'est aussi la perte de fonction de *dmiR-1* qui induit une surexpression de sa cible *Mp* dans le tissu cardiaque de ce modèle.

D'un autre côté, le mécanisme que nous proposons pour expliquer les niveaux élevés de *Mp* dans le modèle *Hand>Bru3* est le mécanisme de régulation de *Mp* par *Bru3* via 3'UTR. Des données récentes de notre équipe dans le muscle larvaire de *Drosophile* ont permis de mettre en évidence un nouveau rôle de *Bru3* dans la libération des transcrits sarcomériques à partir des granules de stockages cytoplasmiques appelés P-bodies favorisant ainsi leur transport vers les ribosomes pour activer leur traduction. Ainsi *Bru3* induit la dégradation rapide de ces transcrits une fois que leur traduction est achevée (Picchio et al., 2018). Ceci nous a laissé supposer que *Bru3* jouerait un rôle similaire dans le cœur adulte, ce qui expliquerai la différence entre le niveau des transcrits *Mp* quantifiés par RT-qPCR et le niveau de la protéine *Mp* observé en immunomarquage dans le modèle *Hand>Bru3*. Le fait que dans la partie 3'UTR du gène *Mp* nous avons retrouvé des séquences cibles de *Bru3* (données *in silico*) renforce cette possibilité. Cette réflexion nous a encouragé à tester le rôle double de *Bru3* d'un côté dans l'activation de la traduction immédiate (*in situ translation*) de *Mp* et d'un autre côté dans la dégradation rapide des transcrits *Mp*. Nos résultats d'hybridation *in situ* (Stellaris) pour *Mp* suivie de double marquage pour le marqueur des P-bodies (FMRP) et pour la protéine *Bru3* suggèrent une colocalisation entre les transcrits de *Mp*, le facteur *Bru3* et les granules de P-bodies au niveau de cytoplasme de cardioblastes. Après quantification de ces colocalisations, nous avons suggéré que *Bru3* interagit avec les transcrits de *Mp* dans les granules de P-bodies puis favorise leur libération de ces sites de stockage pour les transporter vers le cytoplasme pour être traduit. Enfin, la diminution des niveaux des ARNm de *Mp* concomitante avec l'augmentation des niveaux des ARN naissants de *Mp* observés par RT-qPCR dans les cœurs de la lignée *Hand>Bru3*, nous laisse suggérer une dégradation des ARNm de *Mp* après leur traduction.

L'ensemble de ces données a parmi de mettre en évidence la régulation en 3'UTR de gène *Mp*, d'un côté par *dmiR-1* et d'un autre côté par le facteur *Bru3*, comme un mécanisme principal induisant la surexpression de la protéine *Mp* dans le contexte DM1.

### 3. La surexpression de Mp est impliquée dans les défauts cardiaques associés à la DM1

Chez l'Homme, les principaux composants du myocarde sont les cardiomyocytes et la matrice extracellulaire qui représentent environ 76% et 24% du volume totale de myocarde, respectivement (Kapelko, 2001). Cela fait du réseau de collagène un composant essentiel pour le fonctionnement cardiaque en assurant la transmission des forces mécaniques générées par les cardiomyocytes aux cavités cardiaques et inversement. Le même mécanisme semble d'être conservé chez la Drosophile où le réseau de la matrice extracellulaire qui maintient les fibres circulaires (cardioblastes) assure le bon fonctionnement mécanique de tube cardiaque pendant la contraction et la relaxation cardiaque. Rappelant que la Mp/ Col XV est une protéine de la matrice extracellulaire sécrétée par les cardioblastes et les cellules péricardiaques, nous proposons que sa surexpression observée au niveau de la membrane externe et interne de tube cardiaque dans les lignées DM1 pourrait être associée à un remodelage important du cœur conduisant à une altération de la structure et/ou la contractilité cardiaque.

#### A. Implication de Mp dans la cardiomyopathie dilatée

Etant la protéine Mp surexprimée dans la DM1, dans un premier temps nous avons tenté de caractériser l'implication de cette surexpression dans les défauts cardiaques associés à la DM1. Pour cela nous avons effectué une analyse de gain de fonction de Mp dans le cœur de la mouche suivie des expériences de sauvetage génétique. Nos résultats montrent que la surexpression de Mp dans le tissu cardiaque cause la cardiomyopathie dilatée qui a été observée dans les deux modèles DM1 : *Hand>Bru3* et *Hand>mblARNi*, similaire aux résultats observés dans le modèle de souris surexprimant CELF1 dans les cardiomyocytes (Koshelev et al., 2010) et le modèle de souris mutant pour MBNL (*MBNL1<sup>-/-</sup>;MBNL2<sup>+/-</sup>*) (Lee et al., 2013).

Au contraire, l'analyse de perte de fonction de Mp spécifiquement dans le tissu cardiaque montre une diminution dans les diamètres cardiaques (diamètre diastolique et systolique) mais sans effet sur la contractilité cardiaque. Ces résultats apportent un volet fonctionnel à une étude menée par Harpez, dans laquelle il a été démontré que les embryons mutants *Mp<sup>-/-</sup>* présentent des diamètres cardiaques plus petits contrairement aux embryons avec une surexpression de Mp où le diamètre a été significativement plus grand (Harpaz et al., 2013).

Les expériences de sauvetage de phénotype de la cardiomyopathie dilatée par l'atténuation de l'expression de *Mp* dans le cœur surexprimant *Bru3* en utilisant une lignée ARNi a permis de valider l'implication de *Mp* dans ce phénotype. En fait, nous avons observé que lorsque *Mp* est atténuée par ARNi dans la lignée *Hand>Bru3*, qui présente une surexpression de *Mp*, le diamètre diastolique et systolique sont diminués et reviennent à la normale. La restauration de la dilatation cardiaque a été accompagnée par une restauration de la contractilité cardiaque, donc lorsque *Mp* est atténuée dans le cœur des mouches malades (*Hand>Bru3, Mp ARNi*), le cœur se contracte mieux que dans la lignée DM1 (*Hand>Bru3;UPRT*), et cette contractilité devient comparable à celle de la mouche normale (*UAS-Bru3 ;UPRT*). Ces résultats nous ont permis de confirmer que la surexpression de *Mp* est le facteur principal induisant la cardiomyopathie dilatée dans le contexte DM1.

Enfin, les analyses des niveaux de Col XV dans les biopsies cardiaques des patients DM1 ont permis de valider nos données obtenues sur le modèle de *Drosophile* par le fait que les patients DM1 avec une cardiomyopathie dilatée présentent des niveaux d'expression très élevés de la protéine Col15A1 (orthologue *Mp*) en comparaison avec le niveau de Col15A1 dans les biopsies cardiaques des donateurs sains. Cependant nous avons également observé que les patients DM1 qui ne présentent pas de cardiomyopathie dilatée présentent aussi une augmentation significative des niveaux de Col15A1 en comparaison avec le contrôle, mais cette augmentation est moins importante par rapport aux niveaux de Col15A1 observés dans les biopsies cardiaques des patients DM1 avec cardiomyopathie dilatée. Cela nous laisse suggérer que la cardiomyopathie dilatée causée par la surexpression de Col15A1 est dose-dépendante et elle apparaît lorsque le niveau de *Mp/ Col XV* est très élevé.

En fin, nous avons cherché à comprendre le mécanisme moléculaire expliquant la cardiomyopathie dilatée induite par la surexpression de *Mp*. L'étude de Harpez a mis en évidence l'implication de la *Mp* dans la formation de la lumière du cœur « propre » chez l'embryon de la *Drosophile* par son interaction avec le complexe Slit/Robot au niveau de la paroi interne de tube cardiaque. Il est alors possible que le même type d'interaction soit impliqué dans la cardiomyopathie dilatée chez la mouche adulte DM1 notamment que les données de transcriptome cardiaque obtenues dans notre équipe montrent une surexpression des transcrits de *Robo2* dans la lignée *Hand>mblARNi* et *Hand>Bru3* à 5 semaines d'âge (Tableau I de l'article). En plus l'analyse *in silico* a révélé une séquence cible de *dmiR-1* sur la région 3'UTR de *Robo2*. La surexpression de *Robo* dans le cœur de l'embryon de *Drosophile* induit une dilatation cardiaque similaire au phénotype observé en surexprimant

Mp. Cette observation permet de supposer l'implication de la voie Slit/Robo dans la cardiomyopathie dilatée observée dans les lignées DM1 (*Hand>Bru3* et *Hand>mblARNi*) (Harpaz et al., 2013; Zhao and Mommersteeg, 2018).

Cependant, comme la Mp est une protéine de la matrice extracellulaire, nous supposons que sa surexpression provoque une rigidité des parois du cœur ce qui rend difficile la contractilité de tube cardiaque chez la Drosophile. De manière similaire, chez l'Homme, il est possible que le niveau élevé de Col15A1 dans le cœur de patients DM1 induit une rigidité des parois cardiaques entraînant un remplissage insuffisant du ventricule gauche et en conséquence une insuffisance dans l'apport du sang.

Enfin, selon la littérature, le phénotype de cardiomyopathie dilatée apparaît généralement plusieurs années après les premiers symptômes de la DM1 et elle est moins fréquente que les défauts de la conduction et arythmies fréquemment décrits chez les patients DM1 (Lin et al., 1989; H. H. Nguyen et al., 1988). En prenant l'exemple d'une étude clinique menée sur un patient de 44 ans, présentant 500 répétitions CTG, le phénotype de cardiomyopathie dilatée apparaissait plusieurs années après les premiers signes cliniques (myotonie, atrophie légère des muscles squelettiques distaux, cataracte, troubles gastro-intestinaux et déficit endocrinien). Au fil des années, plusieurs symptômes cardiaques sont apparus chez ce patient tels qu'un bloc auriculo-ventriculaire du premier degré puis du deuxième degré, puis une tachycardie ventriculaire et une fibrillation auriculaire. La cardiomyopathie dilatée a été observée 13 ans après le diagnostic et elle a présenté une évolution rapide et sévère nécessitant une transplantation cardiaque deux ans plus tard (Papa et al., 2018).

## **B. Implication de Mp dans les arythmies cardiaques**

Comme chez l'Homme, chez la Drosophile la fréquence cardiaque a tendance à diminuer avec l'âge. Cela est complètement physiologique étant associé au processus de vieillissement. La diminution de la fréquence cardiaque est caractérisée principalement par un ralentissement du rythme cardiaque identifié par des périodes cardiaques longues. Nous avons observé que le niveau de la protéine Mp est crucial dans le maintien d'un rythme cardiaque régulier avec des périodes cardiaques normales.

En fait, l'analyse des périodes cardiaques dans le contexte gain et perte de fonction de Mp semble mettre en évidence l'implication de la surexpression de Mp dans l'accélération du vieillissement cardiaque de la mouche. Les lignées gain de fonction de Mp (*Hand>Mp-3HNC1* et *Hand>Mp-NC1*) présentent une élongation des périodes cardiaques chez les mouches jeunes âgées d'une semaine. Au contraire, les mouches atténuées pour Mp (*Hand>Mp ARNi*) âgées de 5 semaines présentent des périodes cardiaques plus courtes que les mouches contrôles âgées de 5 semaines (*UAS-Mp ARNi*) et comparables aux périodes cardiaques des mouches contrôles âgées d'une semaine. Par homologie, ces résultats suggèrent l'implication de la surexpression de Col15A1 dans l'élongation des fréquences cardiaques observée chez les patients DM1 caractérisée principalement par l'élongation du complexe QT. On remarque également que l'inhibition de la Péricardine, Laminine A et Vikings, gènes codant des protéines de la matrice extracellulaire prévient des dysfonctionnements de tube cardiaque associés à l'âge et augmentent la contractilité cardiaque chez la mouche âgée (Sessions et al., 2017).

En outre, l'analyse des paramètres de rythmicité a également montré que les lignées surexprimant Mp présentent une arythmie avec un ralentissement des battements cardiaques (bradycardie). Les bradycardies sont le type d'arythmie majoritaires dans les lignées DM1 *Hand>960CTG* et *Hand>mblARNi*. Au contraire, les lignées atténuées pour Mp présentent des arythmies avec une accélération des battements cardiaques (tachycardie).

Le mécanisme moléculaire expliquant l'implication de la Mp dans la régulation du rythme cardiaque est encore inconnu. Cependant des données de la littérature montrent que l'invalidation de la Mp chez la Drosophile induit des altérations structurelles de la membrane basale de cardiomyocytes et des anomalies structurelles et fonctionnelles des mitochondries dans le tissu cardiaque. Ces altérations sont dues à l'ouverture de pore de transition de perméabilité mitochondriale mPTP, entraînant une diminution de la production d'ATP et une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Momota et al., 2013). Ces données indiquent l'importance de la régulation de Mp dans le maintien de la mitochondrie au niveau de tissu cardiaque.

#### **4. La lignée *Hand>960CTG* représente un modèle de la forme tardive DM1**

La lignée surexprimant 960 répétitions CTG a été créé dans notre équipe par Lucie Picchio. C'est une lignée inductible avec 960 répétitions CTG interrompues par un motif CTCGA tous

les (CTG)<sup>20</sup>. Ce modèle présente les principales caractéristiques moléculaires de la DM1 impliquant la formation de foci nucléaires, la séquestration de mbl et les défauts d'épissage alternatif (Picchio et al., 2013). Il présente également les altérations musculaires majeures observées chez les patients DM1 comme la myopathie, l'hypercontraction musculaire, la division des fibres musculaires (*splitting*), la réduction de la taille des fibres liée aux défauts de la fusion des myoblastes. Ainsi, la sévérité de ces phénotypes était dépendante du nombre de répétitions CTG (Picchio et al., 2013).

Concernant l'utilisation de ce modèle dans l'étude des défauts cardiaques associés à la DM1, bien que le cœur de la lignée *Hand>960CTG* présente une diminution de *dmiR-1* et une surexpression de *Mp*, il ne présente pas de cardiomyopathie dilatée. Différentes raisons peuvent expliquer les résultats différents de *Hand>960CTG* par rapport aux résultats obtenus avec *Hand>Bru3* et *Hand>mblARNi*. Premièrement, d'une manière générale le modèle exprimant 960 CTG présente des phénotypes musculaires et cardiaques plus faibles par rapport aux deux autres lignées DM1 (*Hand>mblARNi* et *Hand>Bru3*) (Auxerre-Plantié et al., 2019; Picchio et al., 2013). Des analyses effectuées précédemment dans notre équipe ont révélé des défauts de conduction cardiaque dans la lignée *Hand>mblARNi* et *Hand>Bru3* mais pas dans la lignée *Hand>960CTG* (Auxerre-Plantié et al., 2019). De même manière le phénotype de cardiomyopathie dilatée, décrit dans ce manuscrit de thèse, n'est pas visible dans la lignée *Hand>960CTG* mais présent dans le contexte *Hand>mblARNi* et *Hand>Bru3*.

Concernant l'analyse des diamètres cardiaques dans la lignée *Hand>960CTG*, nous avons observé une dilatation cardiaque caractérisée principalement par une augmentation significative de diamètre diastolique et systolique qui apparaît à 5 semaines d'âge. Cela suggère que la cardiomyopathie dilatée nécessite plus de temps dans ce modèle pour être visible.

Une explication de ces différences de phénotypes que nous favorisons est que le modèle *Hand>960CTG* présente une séquestration de mbl et une surexpression de *Bru3* moins importantes par rapport aux modèles *Hand>mblARNi* et *Hand>Bru3*, respectivement. La dérégulation plus importante de mbl et de *Bru3* peut mettre en jeu de nouveaux facteurs / voies dans le contexte *Hand>Bru3* et *Hand>mblARNi* mais pas dans *Hand>960CTG*.

Contrairement à l'expression de 960 répétitions CTG spécifiquement dans le tissu cardiaque de la mouche qui ne donne pas de cardiomyopathie dilatée, le modèle de souris DM1 exprimant 960 répétitions CUG présente la cardiomyopathie dilatée (Wang et al., 2007).

Nos analyses de la physiologie cardiaque des mouches adultes *Hand>960CTG* ont également montré la présence des arythmies et des phénotypes cardiaques tardives tandis que chez les souris EpA960, le dysfonctionnement cardiaque est plus sévère et apparaît environ 1 semaine après l'induction de l'expression des répétitions CUG (Wang et al., 2007). Ces différences de résultats pourraient être liées aux différences de niveau d'expression de répétitions toxiques, induit chez la Drosophile par le pilote *Hand>GALA* et chez le modèle de souris EpA960 par une induction systémique.

L'analyse de trois modèles de souris exprimant 960 répétitions CUG avec des niveaux d'expression différents dans le cœur et le muscle squelettique a montré une corrélation importante entre le niveau d'expression des répétitions CUG et la sévérité des phénotypes musculaires et cardiaques. En fait, les souris EpA960 avec une expression très élevée de répétitions CUG sont capables de survivre généralement 2 semaines après l'induction de CUG, tandis que les souris avec une expression CUG moins importante commencent à avoir des phénotypes qu'à 6 mois après l'induction CUG. Finalement, les souris avec une expression faible de répétitions CUG présentent une durée de vie normale et commencent à présenter des phénotypes cardiaques et musculaires 1 an plus tard (Wang et al., 2007). Ces observations suggèrent que les phénotypes cardiaques, y compris la cardiomyopathie dilatée, sont corrélés à la gravité de la maladie et que cette gravité dépend des niveaux d'expression de CUG toxiques et non seulement au nombre de répétitions CUG. L'analyse de tissu cardiaque et musculaire de souris EpA960 présentant la plus forte expression de répétitions CUG a montré que la colocalisation de MBNL1 dans les foci d'ARN toxique et l'augmentation de l'expression de la protéine CELF1 se produisaient très tôt, environ 6 heures après l'induction de CUG (Wang et al., 2007). Ceci explique les phénotypes cardiaques observés une semaine après l'induction du CUG dans ce modèle.

En prenant en compte l'ensemble des observations obtenues après l'analyse cardiaque de la lignée *Hand>960CTG*, nous supposant que cette lignée est un bon modèle pour étudier la forme tardive de la DM1 qui est caractérisée par des défauts cardiaques modérés.

# Conclusions et perspectives

Les modèles Drosophiles (avec tous les avantages et limites) ont été largement appliqués dans la compréhension des mécanismes pathogéniques de la DM1 au niveau musculaire et cardiaque (Auxerre-Plantié et al., 2019; Bargiela et al., 2015; de Haro et al., 2006; Fernandez-Costa et al., 2013; Garcia-Lopez et al., 2008; García-López et al., 2011; Mée et al., 2008; Picchio et al., 2018, 2013).

Durant ma thèse, en utilisant le modèle de Drosophile nous avons mis en évidence l'implication de la surexpression de Mp dans les défauts cardiaques associés à la DM1. Cette dérégulation met en jeu un mécanisme de régulation génique en région 3'UTR impliquant d'un côté un miARN conservé, le *miR-1*, et d'un autre côté une régulation potentielle par le facteur Bru3. Cela apporte une nouvelle information sur l'implication de la dérégulation 3'UTR dans la pathogénicité de la DM1 et ouvre l'horizon pour chercher d'autres gènes dérégulés dans le contexte DM1 via leurs 3'UTR pour expliquer les causes de certains phénotypes cardiaques qui sont encore inexpliqués.

Premièrement l'analyse fonctionnelle de Mp dans la physiologie cardiaque nous a permis de mettre en évidence l'importance de cette protéine dans le maintien de la structure et de la fonction cardiaque chez la Drosophile. Ainsi, nous avons montré que la surexpression de Mp dans le tissu cardiaque conduit à la cardiomyopathie dilatée. Nous avons ensuite confirmé cette implication par une expérience de sauvetage de phénotype dans la lignée DM1. Nos résultats ont été validés chez l'Homme par le fait que les biopsies cardiaques des patients DM1 avec une cardiomyopathie dilatée présentent une expression très élevée de Col15A1.

Afin de comprendre l'effet précis de la surexpression de Mp sur la contractilité cardiaque, nous avons envisagé en collaboration avec Docteur Vincent Gache de l'Institut NeuroMyoGène à Lyon, de surexprimer le Col XV dans des cellules iPS différenciées en cardiomyocytes *in vitro*. Cette expérience va nous permettre de voir l'effet de la surexpression de Col15A1 sur la contractilité des cardiomyocytes, leur taille et leur prolifération qui peuvent être altérés pour augmenter la taille de myocarde dans la cardiomyopathie dilatée.

Nos résultats suggèrent qu'en plus du collagène 1, 3, 4, 5, 8, 14 et 21 qui sont retrouvés surexprimés dans le modèle animale ainsi que chez l'Homme avec une cardiomyopathie dilatée (Louzao-Martinez et al., 2016) et aussi COL4A5, COL9A1, COL21A1, COL23A1, COL8A1 et COL16A1 qui sont surexprimés dans les biopsies cardiaques des patients avec cardiomyopathie dilatée (Gil-Cayuela et al., 2016), Mp/Col15A1 représente un nouveau

collagène surexprimé spécifiquement dans le contexte DM1 et impliqué dans la cardiomyopathie dilatée.

Dans un second temps, nous avons observé que la surexpression de Mp induit également un autre phénotype cardiaque observé dans la DM1 qui est le phénotype des arythmies et plus particulièrement les arythmies avec un ralentissement de battement cardiaque (bradycardie). Cependant afin de confirmer le rôle de Mp dans ce phénotype, une expérience de sauvetage de phénotype par l'atténuation de Mp dans le tissu cardiaque de la lignée DM1 *Hand>mblARNi*, qui présente des bradycardies, est nécessaire. Il faudra aussi valider l'implication de Mp dans les arythmies dans un modèle DM1 vertébré comme le modèle de souris EpA960 présentant des arythmies cardiaques, et chez les patients DM1.

La conservation de la dérégulation de *miR-1* dans le contexte DM1, aussi bien chez les patients que dans le modèle DM1 de Drosophile est un point important pour envisager une application de nos résultats. Cela permettrait, dans le futur, l'identification des petites molécules capables de restaurer la maturation de *miR-1* et/ou diminuer le niveau de sa cible « *Mp* » dans le but d'améliorer le phénotype de la cardiomyopathie dilatée.

En plus, l'étude de l'implication d'autres gènes candidats cibles de *miR-1* identifiés par l'analyse *in silico* des données de transcriptome cardiaque dans le contexte DM1 (données de l'équipe), permettrait d'élargir notre compréhension de l'impact de *miR-1* dans les défauts cardiaques observés chez les patients DM1. Parmi ces gènes deux candidats peuvent s'avérer intéressants pour une analyse physiologique dans le cœur. Le gène *Nepriylisin 4 (Nep4)* et le gène *Robo2*.

En effet, le gène *Nep4* est retrouvé surexprimé dans les conditions *Hand>960CTG* et *Hand>Bru3* à l'âge de 5 semaines. Ainsi par une analyse *in silico* de sa région 3'UTR nous avons observé qu'il possède une séquence cible de *dmiR-1* et aussi de Bru3. La Néprilysine est une métallo-endorpeptidase. Dans le système cardiovasculaire, la Néprilysine hydrolyse de nombreux peptides vasoactifs ce qui réduit leurs actions. Certains de ces peptides ont des effets vasodilatateurs (dont les peptides natriurétiques, l'adrénomédulline et la bradykinine), et d'autres ont des effets vasoconstricteurs (l'angiotensine I et II, et l'endothéline-1) (Bayes-Genis and Lupón, 2016). L'augmentation de la concentration de Nep a été associée à des troubles cardiovasculaires et des arrêts cardiaques ainsi que son inhibition a été considérée comme une cible thérapeutique clé pour améliorer la durée de vie des patients souffrant de

l'insuffisance cardiaque (Bayés-Genís et al., 2015). Cela laisse suggérer que la Néprilysine soit impliquée dans les symptômes cardiaques de la DM1.

Concernant *Robo2*, les niveaux des transcrits sont retrouvés augmentés dans les deux modèles DM1 *Hand>mblARNi* et *Hand>Bru3* à 5 semaines d'âge (données transcriptomiques de l'équipe). *Robo2* code pour le récepteur de Slit. Ce complexe Slit/Robo est impliqué dans le guidage axonal dans le système nerveux central ainsi que dans la migration et l'adhésion des cellules cardiaques et la formation de tube cardiaque chez la Drosophile, et dans la cardiogenèse chez les vertébrés. La surexpression de Robo provoque une dilatation cardiaque importante caractérisée par une lumière de tube cardiaque large (Harpaz et al., 2013; Zhao and Mommersteeg, 2018). Ces données de la littérature nous laissent suggérer l'implication de Robo dans les défauts cardiaques observés dans la DM1.

## Références

- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., George, R.A., Lewis, S.E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S.N., Sutton, G.G., Wortman, J.R., Yandell, M.D., Zhang, Q., Chen, L.X., Brandon, R.C., Rogers, Y.H., Blazej, R.G., Champe, M., Pfeiffer, B.D., Wan, K.H., Doyle, C., Baxter, E.G., Helt, G., Nelson, C.R., Gabor, G.L., Abril, J.F., Agbayani, A., An, H.J., Andrews-Pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, R.M., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, E.M., Beeson, K.Y., Benos, P.V., Berman, B.P., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M.R., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, K.C., Busam, D.A., Butler, H., Cadieu, E., Center, A., Chandra, I., Cherry, J.M., Cawley, S., Dahlke, C., Davenport, L.B., Davies, P., de Pablos, B., Delcher, A., Deng, Z., Mays, A.D., Dew, I., Dietz, S.M., Dodson, K., Doup, L.E., Downes, M., Dugan-Rocha, S., Dunkov, B.C., Dunn, P., Durbin, K.J., Evangelista, C.C., Ferraz, C., Ferreira, S., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, A.E., Garg, N.S., Gelbart, W.M., Glasser, K., Glodek, A., Gong, F., Gorrell, J.H., Gu, Z., Guan, P., Harris, M., Harris, N.L., Harvey, D., Heiman, T.J., Hernandez, J.R., Houck, J., Hostin, D., Houston, K.A., Howland, T.J., Wei, M.H., Ibegwam, C., Jalali, M., Kalush, F., Karpen, G.H., Ke, Z., Kennison, J.A., Ketchum, K.A., Kimmel, B.E., Kodira, C.D., Kraft, C., Kravitz, S., Kulp, D., Lai, Z., Lasko, P., Lei, Y., Levitsky, A.A., Li, J., Li, Z., Liang, Y., Lin, X., Liu, X., Mattei, B., McIntosh, T.C., McLeod, M.P., McPherson, D., Merkulov, G., Milshina, N.V., Mobarry, C., Morris, J., Moshrefi, A., Mount, S.M., Moy, M., Murphy, B., Murphy, L., Muzny, D.M., Nelson, D.L., Nelson, D.R., Nelson, K.A., Nixon, K., Nusskern, D.R., Pacleb, J.M., Palazzolo, M., Pittman, G.S., Pan, S., Pollard, J., Puri, V., Reese, M.G., Reinert, K., Remington, K., Saunders, R.D., Scheeler, F., Shen, H., Shue, B.C., Sidén-Kiamos, I., Simpson, M., Skupski, M.P., Smith, T., Spier, E., Spradling, A.C., Stapleton, M., Strong, R., Sun, E., Svirskas, R., Tector, C., Turner, R., Venter, E., Wang, A.H., Wang, X., Wang, Z.Y., Wassarman, D.A., Weinstock, G.M., Weissenbach, J., Williams, S.M., WoodageT, null, Worley, K.C., Wu, D., Yang, S., Yao, Q.A., Ye, J., Yeh, R.F., Zaveri, J.S., Zhan, M., Zhang, G., Zhao, Q., Zheng, L., Zheng, X.H., Zhong, F.N., Zhong, W., Zhou, X., Zhu, S., Zhu, X., Smith, H.O., Gibbs, R.A., Myers, E.W., Rubin, G.M., Venter, J.C., 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185–2195.
- Ai, D., Fu, X., Wang, J., Lu, M.-F., Chen, L., Baldini, A., Klein, W.H., Martin, J.F., 2007. Canonical Wnt signaling functions in second heart field to promote right ventricular growth. *PNAS* 104, 9319–9324.
- Alwazzan, M., Newman, E., Hamshere, M.G., Brook, J.D., 1999. Myotonic dystrophy is associated with a reduced level of RNA from the DMWD allele adjacent to the expanded repeat. *Hum. Mol. Genet.* 8, 1491–1497.
- Amack, J.D., Paguio, A.P., Mahadevan, M.S., 1999. Cis and Trans Effects of the Myotonic Dystrophy (DM) Mutation in a Cell Culture Model. *Human Molecular Genetics* 8, 1975–1984. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.11.1975>
- Amack, J.D., Reagan, S.R., Mahadevan, M.S., 2002. Mutant DMPK 3'-UTR transcripts disrupt C2C12 myogenic differentiation by compromising MyoD. *Journal of Cell Biology* 159, 419–429. <https://doi.org/10.1083/jcb.200206020>
- Artero, R., Prokop, A., Paricio, N., Begemann, G., Pueyo, I., Mlodzik, M., Perez-Alonso, M., Baylies, M.K., 1998. The muscleblind gene participates in the organization of Z-bands and epidermal attachments of *Drosophila* muscles and is regulated by Dmef2. *Dev. Biol.* 195, 131–143. <https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8833>

- Ashizawa, T., Anvret, M., Baiget, M., Barceló, J.M., Brunner, H., Cobo, A.M., Dallapiccola, B., Fenwick, R.G., Grandell, U., Harley, H., 1994. Characteristics of intergenerational contractions of the CTG repeat in myotonic dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 54, 414–423.
- Auxerre-Plantié, E., Nakamori, M., Renaud, Y., Huguet, A., Choquet, C., Dondi, C., Miquerol, L., Takahashi, M.P., Gourdon, G., Junion, G., Jagla, T., Zmojdzian, M., Jagla, K., 2019. Straightjacket/ $\alpha$ 2 $\delta$ 3 deregulation is associated with cardiac conduction defects in myotonic dystrophy type 1. *eLife* 8, e51114. <https://doi.org/10.7554/eLife.51114>
- Axford, M.M., Castel, A.L., Nakamori, M., Thornton, C.A., Pearson, C.E., 2011. Replacement of the myotonic dystrophy type 1 CTG repeat with “non-CTG repeat” insertions in specific tissues. *J Med Genet* 48, 438–443. <https://doi.org/10.1136/jmg.2010.085944>
- Bargiela, A., Cerro-Herreros, E., Fernandez-Costa, J.M., Vilchez, J.J., Llamusi, B., Artero, R., 2015. Increased autophagy and apoptosis contribute to muscle atrophy in a myotonic dystrophy type 1 *Drosophila* model. *Dis Model Mech* 8, 679–690. <https://doi.org/10.1242/dmm.018127>
- Bartel, D.P., 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215–233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>
- Bassez, G., Lazarus, A., Desguerre, I., Varin, J., Laforêt, P., Bécane, H.M., Meune, C., Arne-Bes, M.C., Ounnoughene, Z., Radvanyi, H., Eymard, B., Duboc, D., 2004. Severe cardiac arrhythmias in young patients with myotonic dystrophy type 1. *Neurology* 63, 1939–1941. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000144343.91136.CF>
- Batten, F.E., Gibb, H.P., 1909. Two Cases of Myotonia Atrophica, showing a peculiar Distribution of Muscular Atrophy. *Proc R Soc Med* 2, 32–33.
- Bayés-Genís, A., Barallat, J., Galán, A., de Antonio, M., Domingo, M., Zamora, E., Urrutia, A., Lupón, J., 2015. Soluble neprilysin is predictive of cardiovascular death and heart failure hospitalization in heart failure patients. *J Am Coll Cardiol* 65, 657–665. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.11.048>
- Bayes-Genis, A., Lupón, J., 2016. Neprilysin: Indications, Expectations, and Challenges. *Rev Esp Cardiol* 69, 647–649. <https://doi.org/10.1016/j.rec.2016.04.020>
- Begemann, G., Paricio, N., Artero, R., Kiss, I., Pérez-Alonso, M., Mlodzik, M., 1997. muscleblind, a gene required for photoreceptor differentiation in *Drosophila*, encodes novel nuclear Cys3His-type zinc-finger-containing proteins. *Development* 124, 4321–4331.
- Benders, A.A., Groenen, P.J., Oerlemans, F.T., Veerkamp, J.H., Wieringa, B., 1997. Myotonic dystrophy protein kinase is involved in the modulation of the Ca<sup>2+</sup> homeostasis in skeletal muscle cells. *J Clin Invest* 100, 1440–1447.
- Benhayon, D., Lugo, R., Patel, R., Carballeira, L., Elman, L., Cooper, J.M., 2015. Long-term arrhythmia follow-up of patients with myotonic dystrophy. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 26, 305–310. <https://doi.org/10.1111/jce.12604>
- Bhakta, D., Lowe, M.R., Groh, W.J., 2004. Prevalence of structural cardiac abnormalities in patients with myotonic dystrophy type I. *American Heart Journal* 147, 224–227. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2003.08.008>
- Bienias, P., Łusakowska, A., Ciurzyński, M., Rymarczyk, Z., Irzyk, K., Kurnicka, K., Kamińska, A., Pruszczyk, P., 2016. Supraventricular and Ventricular Arrhythmias Are Related to the Type of Myotonic Dystrophy but Not to Disease Duration or Neurological Status. *Pacing Clin Electrophysiol* 39, 959–968. <https://doi.org/10.1111/pace.12924>

- Bier, E., 2005. *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nat. Rev. Genet.* 6, 9–23. <https://doi.org/10.1038/nrg1503>
- Blice-Baum, A.C., Guida, M.C., Hartley, P.S., Adams, P.D., Bodmer, R., Cammarato, A., 2019. As time flies by: Investigating cardiac aging in the short-lived *Drosophila* model. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, Genetic and epigenetic regulation of aging and longevity 1865, 1831–1844.* <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.11.010>
- Bodmer, R., 1995. Heart development in *Drosophila* and its relationship to vertebrates. *Trends Cardiovasc. Med.* 5, 21–28. [https://doi.org/10.1016/1050-1738\(94\)00032-Q](https://doi.org/10.1016/1050-1738(94)00032-Q)
- Bodmer, R., 1993. The gene *tinman* is required for specification of the heart and visceral muscles in *Drosophila*. *Development* 118, 719–729.
- Bodmer, R., Venkatesh, T.V., 1998. Heart development in *Drosophila* and vertebrates: Conservation of molecular mechanisms. *Developmental Genetics* 22, 181–186. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6408\(1998\)22:3<181::AID-DVG1>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6408(1998)22:3<181::AID-DVG1>3.0.CO;2-2)
- Boucher, C.A., King, S.K., Carey, N., Krahe, R., Winchester, C.L., Rahman, S., Creavin, T., Meghji, P., Bailey, M.E., Chartier, F.L., 1995. A novel homeodomain-encoding gene is associated with a large CpG island interrupted by the myotonic dystrophy unstable (CTG)<sub>n</sub> repeat. *Hum. Mol. Genet.* 4, 1919–1925.
- Brand, A.H., Perrimon, N., 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401–415.
- Brembilla-Perrot, B., Schwartz, J., Huttin, O., Frikha, Z., Sellal, J.M., Sadoul, N., Blangy, H., Olivier, A., Louis, S., Kaminsky, P., 2014. Atrial flutter or fibrillation is the most frequent and life-threatening arrhythmia in myotonic dystrophy. *Pacing Clin Electrophysiol* 37, 329–335. <https://doi.org/10.1111/pace.12260>
- Brook, J.D., McCurrach, M.E., Harley, H.G., Buckler, A.J., Church, D., Aburatani, H., Hunter, K., Stanton, V.P., Thirion, J.P., Hudson, T., 1992. Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 68, 799–808.
- Bulatovic, I., Månsson-Broberg, A., Sylvén, C., Grinnemo, K.-H., 2016. Human fetal cardiac progenitors: The role of stem cells and progenitors in the fetal and adult heart. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology, Perinatal Regenerative Medicine* 31, 58–68. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2015.08.008>
- Buxton, J., Shelbourne, P., Davies, J., Jones, C., Tongeren, T.V., Aslanidis, C., Jong, P. de, Jansen, G., Anvret, M., Riley, B., Williamson, R., Johnson, K., 1992. Detection of an unstable fragment of DNA specific to individuals with myotonic dystrophy. *Nature* 355, 547–548. <https://doi.org/10.1038/355547a0>
- Chakraborty, M., Selma-Soriano, E., Magny, E., Couso, J.P., Pérez-Alonso, M., Charlet-Berguerand, N., Artero, R., Llamusi, B., 2015. Pentamidine rescues contractility and rhythmicity in a *Drosophila* model of myotonic dystrophy heart dysfunction. *Disease Models & Mechanisms* 8, 1569–1578. <https://doi.org/10.1242/dmm.021428>
- Charizanis, K., Lee, K.-Y., Batra, R., Goodwin, M., Zhang, C., Yuan, Y., Shiue, L., Cline, M., Scotti, M.M., Xia, G., Kumar, A., Ashizawa, T., Clark, H.B., Kimura, T., Takahashi, M.P., Fujimura, H., Jinnai, K., Yoshikawa, H., Gomes-Pereira, M., Gourdon, G., Sakai, N., Nishino, S., Foster, T.C., Ares, M., Darnell, R.B., Swanson, M.S., 2012. Muscleblind-like 2-mediated alternative splicing in the developing brain and dysregulation in myotonic dystrophy. *Neuron* 75, 437–450. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.05.029>
- Charlet-B., N., Savkur, R.S., Singh, G., Philips, A.V., Grice, E.A., Cooper, T.A., 2002. Loss of the Muscle-Specific Chloride Channel in Type 1 Myotonic Dystrophy Due to

- Misregulated Alternative Splicing. *Molecular Cell* 10, 45–53. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00572-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00572-5)
- Chong-Nguyen, C., Wahbi, K., Algalarrondo, V., Bécane, H.M., Radvanyi-Hoffman, H., Arnaud, P., Furling, D., Lazarus, A., Bassez, G., Béhin, A., Fayssoil, A., Laforêt, P., Stojkovic, T., Eymard, B., Duboc, D., 2017. Association Between Mutation Size and Cardiac Involvement in Myotonic Dystrophy Type 1. *Circulation: Cardiovascular Genetics* 10, e001526. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.116.001526>
- Corrales, E., Vásquez, M., Zhang, B., Santamaría-Ulloa, C., Cuenca, P., Krahe, R., Monckton, D.G., Morales, F., 2019. Analysis of mutational dynamics at the DMPK (CTG)<sub>n</sub> locus identifies saliva as a suitable DNA sample source for genetic analysis in myotonic dystrophy type 1. *PLOS ONE* 14, e0216407. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216407>
- Courel, M., Bénard, M., Ernoult-Lange, M., Chouaib, R., Hubstenberger, A., Kress, M., Weil, D., 2018. Les P-bodies - Des gouttelettes microscopiques pour stocker les messagers de protéines régulatrices. *Med Sci (Paris)* 34, 306–308. <https://doi.org/10.1051/medsci/20183404009>
- Curtis, N.J., Ringo, J.M., Dowse, H.B., 1999. Morphology of the pupal heart, adult heart, and associated tissues in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*. *Journal of Morphology* 240, 225–235. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4687\(199906\)240:3<225::AID-JMOR2>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4687(199906)240:3<225::AID-JMOR2>3.0.CO;2-V)
- Dansithong, W., Paul, S., Comai, L., Reddy, S., 2005. MBNL1 is the primary determinant of focus formation and aberrant insulin receptor splicing in DM1. *J Biol Chem* 280, 5773–5780. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410781200>
- Dansithong, W., Wolf, C.M., Sarkar, P., Paul, S., Chiang, A., Holt, I., Morris, G.E., Branco, D., Sherwood, M.C., Comai, L., Berul, C.I., Reddy, S., 2008. Cytoplasmic CUG RNA foci are insufficient to elicit key DM1 features. *PLoS One* 3, e3968. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003968>
- Dasgupta, T., Ladd, A.N., 2012. The importance of CELF control: molecular and biological roles of the CUG-BP, Elav-like family of RNA binding proteins. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 3, 104–121. <https://doi.org/10.1002/wrna.107>
- Davis, B.M., McCurrach, M.E., Taneja, K.L., Singer, R.H., Housman, D.E., 1997. Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of myotonic dystrophy protein kinase transcripts results in nuclear retention of transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 7388–7393.
- De Antonio, M., Dogan, C., Hamroun, D., Mati, M., Zerrouki, S., Eymard, B., Katsahian, S., Bassez, G., 2016. Unravelling the myotonic dystrophy type 1 clinical spectrum: A systematic registry-based study with implications for disease classification. *Revue Neurologique, Muscular pathologies / Peripheral nerve pathologies* 172, 572–580. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2016.08.003>
- de Haro, M., Al-Ramahi, I., De Gouyon, B., Ukani, L., Rosa, A., Faustino, N.A., Ashizawa, T., Cooper, T.A., Botas, J., 2006. MBNL1 and CUGBP1 modify expanded CUG-induced toxicity in a *Drosophila* model of myotonic dystrophy type 1. *Hum. Mol. Genet.* 15, 2138–2145. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl137>
- Dhaenens, C.M., Schraen-Maschke, S., Tran, H., Vingtdoux, V., Ghanem, D., Leroy, O., Delplanque, J., Vanbrussel, E., Delacourte, A., Vermersch, P., Maurage, C.A., Gruffat, H., Sergeant, A., Mahadevan, M.S., Ishiura, S., Buée, L., Cooper, T.A., Caillet-Boudin, M.L., Charlet-Berguerand, N., Sablonnière, B., Sergeant, N., 2008. Overexpression of MBNL1 fetal isoforms and modified splicing of Tau in the DM1 brain: two individual consequences of CUG trinucleotide repeats. *Exp Neurol* 210, 467–478. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.11.020>

- Dixon, D.M., Choi, J., El-Ghazali, A., Park, S.Y., Roos, K.P., Jordan, M.C., Fishbein, M.C., Comai, L., Reddy, S., 2015. Loss of muscleblind-like 1 results in cardiac pathology and persistence of embryonic splice isoforms. *Sci Rep* 5. <https://doi.org/10.1038/srep09042>
- Du, H., Cline, M.S., Osborne, R.J., Tuttle, D.L., Clark, T.A., Donohue, J.P., Hall, M.P., Shiue, L., Swanson, M.S., Thornton, C.A., Ares, M., 2010. Aberrant alternative splicing and extracellular matrix gene expression in mouse models of myotonic dystrophy. *Nat Struct Mol Biol* 17, 187–193. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1720>
- Ebralidze, A., Wang, Y., Petkova, V., Ebralidse, K., Junghans, R.P., 2004. RNA leaching of transcription factors disrupts transcription in myotonic dystrophy. *Science* 303, 383–387. <https://doi.org/10.1126/science.1088679>
- Eisenberg, I., Eran, A., Nishino, I., Moggio, M., Lamperti, C., Amato, A.A., Lidov, H.G., Kang, P.B., North, K.N., Mitrani-Rosenbaum, S., Flanigan, K.M., Neely, L.A., Whitney, D., Beggs, A.H., Kohane, I.S., Kunkel, L.M., 2007. Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 17016–17021. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708115104>
- Eklund, L., Pihola, J., Komulainen, J., Sormunen, R., Ongvarrasopone, C., Fässler, R., Muona, A., Ilves, M., Ruskoaho, H., Takala, T.E.S., Pihlajaniemi, T., 2001. Lack of type XV collagen causes a skeletal myopathy and cardiovascular defects in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1194–1199.
- Facenda-Lorenzo, M., Hernández-Afonso, J., Rodríguez-Esteban, M., de León-Hernández, J.C., Grillo-Pérez, J.J., 2013. Cardiac Manifestations in Myotonic Dystrophy Type 1 Patients Followed Using a Standard Protocol in a Specialized Unit. *Rev Esp Cardiol* 66, 193–197. <https://doi.org/10.1016/j.rec.2012.08.011>
- Fardaei, M., Larkin, K., Brook, J.D., Hamshere, M.G., 2001. In vivo co-localisation of MBNL protein with DMPK expanded-repeat transcripts. *Nucleic Acids Res* 29, 2766–2771.
- Fernandez-Costa, J.M., Garcia-Lopez, A., Zuñiga, S., Fernandez-Pedrosa, V., Felipe-Benavent, A., Mata, M., Jaka, O., Aiastui, A., Hernandez-Torres, F., Aguado, B., Perez-Alonso, M., Vilchez, J.J., Lopez de Munain, A., Artero, R.D., 2013. Expanded CTG repeats trigger miRNA alterations in *Drosophila* that are conserved in myotonic dystrophy type 1 patients. *Hum Mol Genet* 22, 704–716. <https://doi.org/10.1093/hmg/dd5478>
- Fernandez-Costa Juan M., Llamusi M. Beatriz, Garcia-Lopez Amparo, Artero Ruben, 2011. Alternative splicing regulation by Muscleblind proteins: from development to disease. *Biological Reviews* 86, 947–958. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2011.00180.x>
- Finsterer, J., Stöllberger, C., 2008. Atrial fibrillation/flutter in myopathies. *International Journal of Cardiology* 128, 304–310. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2007.12.041>
- Firulli, A.B., McFadden, D.G., Lin, Q., Srivastava, D., Olson, E.N., 1998. Heart and extra-embryonic mesodermal defects in mouse embryos lacking the bHLH transcription factor Hand1. *Nat Genet* 18, 266–270. <https://doi.org/10.1038/ng0398-266>
- Fleg, J.L., O'Connor, F., Gerstenblith, G., Becker, L.C., Clulow, J., Schulman, S.P., Lakatta, E.G., 1995. Impact of age on the cardiovascular response to dynamic upright exercise in healthy men and women. *J Appl Physiol* (1985) 78, 890–900. <https://doi.org/10.1152/jappl.1995.78.3.890>
- Forsberg, H., Olofsson, B.O., Andersson, S., Henriksson, A., Bjerle, P., 1988. 24-hour electrocardiographic study in myotonic dystrophy. *Cardiology* 75, 241–249. <https://doi.org/10.1159/000174380>
- Frasch, M., 2016. Genome-Wide Approaches to *Drosophila* Heart Development. *Journal of Cardiovascular Development and Disease* 3, 20. <https://doi.org/10.3390/jcdd3020020>

- Fu, Y.H., Friedman, D.L., Richards, S., Pearlman, J.A., Gibbs, R.A., Pizzuti, A., Ashizawa, T., Perryman, M.B., Scarlato, G., Fenwick, R.G., 1993. Decreased expression of myotonin-protein kinase messenger RNA and protein in adult form of myotonic dystrophy. *Science* 260, 235–238.
- Fugier, C., Klein, A.F., Hammer, C., Vassilopoulos, S., Ivarsson, Y., Toussaint, A., Tosch, V., Vignaud, A., Ferry, A., Messaddeq, N., Kokunai, Y., Tsuburaya, R., de la Grange, P., Dembele, D., Francois, V., Precigout, G., Boulade-Ladame, C., Hummel, M.-C., Lopez de Munain, A., Sergeant, N., Laquerrière, A., Thibault, C., Deryckere, F., Auboeuf, D., Garcia, L., Zimmermann, P., Udd, B., Schoser, B., Takahashi, M.P., Nishino, I., Bassez, G., Laporte, J., Furling, D., Charlet-Berguerand, N., 2011. Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy. *Nat Med* 17, 720–725. <https://doi.org/10.1038/nm.2374>
- Furling, D., Coiffier, L., Mouly, V., Barbet, J.P., Lacau St Guily, J., Taneja, K., Gourdon, G., Junien, C., Butler-Browne, G.S., 2001a. Defective satellite cells in congenital myotonic dystrophy. *Human Molecular Genetics* 10, 2079–2087. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.19.2079>
- Furling, D., Lemieux, D., Taneja, K., Puymirat, J., 2001b. Decreased levels of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) and delayed differentiation in human myotonic dystrophy myoblasts. *Neuromuscul Disord* 11, 728–735. [https://doi.org/10.1016/s0960-8966\(01\)00226-7](https://doi.org/10.1016/s0960-8966(01)00226-7)
- Gambardella, S., Rinaldi, F., Lepore, S.M., Viola, A., Loro, E., Angelini, C., Vergani, L., Novelli, G., Botta, A., 2010. Overexpression of microRNA-206 in the skeletal muscle from myotonic dystrophy type 1 patients. *J Transl Med* 8, 48. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-8-48>
- García-López, A., Llamusi, B., Orzáez, M., Pérez-Payá, E., Artero, R.D., 2011. In vivo discovery of a peptide that prevents CUG-RNA hairpin formation and reverses RNA toxicity in myotonic dystrophy models. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 11866–11871. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018213108>
- Garcia-Lopez, A., Monferrer, L., Garcia-Alcover, I., Vicente-Crespo, M., Alvarez-Abril, M.C., Artero, R.D., 2008. Genetic and Chemical Modifiers of a CUG Toxicity Model in *Drosophila*. *PLOS ONE* 3, e1595. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001595>
- Gil-Cayuela, C., Roselló-Lletí, E., Ortega, A., Tarazón, E., Triviño, J.C., Martínez-Dolz, L., González-Juanatey, J.R., Lago, F., Portolés, M., Rivera, M., 2016. New Altered Non-Fibrillar Collagens in Human Dilated Cardiomyopathy: Role in the Remodeling Process. *PLoS One* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168130>
- Gomes-Pereira, M., Cooper, T.A., Gourdon, G., 2011. Myotonic dystrophy mouse models: towards rational therapy development. *Trends in Molecular Medicine* 17, 506–517. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.05.004>
- Gomes-Pereira, M., Foiry, L., Nicole, A., Huguet, A., Junien, C., Munnich, A., Gourdon, G., 2007. CTG trinucleotide repeat “big jumps”: large expansions, small mice. *PLoS Genet* 3, e52. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030052>
- Good, P.J., Chen, Q., Warner, S.J., Herring, D.C., 2000. A Family of Human RNA-binding Proteins Related to the *Drosophila* Bruno Translational Regulator. *J. Biol. Chem.* 275, 28583–28592. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003083200>
- Gratz, S.J., Harrison, M.M., Wildonger, J., O’Connor-Giles, K.M., 2015. Precise Genome Editing of *Drosophila* with CRISPR RNA-Guided Cas9. *Methods Mol Biol* 1311, 335–348. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2687-9\\_22](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2687-9_22)

- Griffiths-Jones, S., Grocock, R.J., van Dongen, S., Bateman, A., Enright, A.J., 2006. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 34, D140–D144. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj112>
- Grimby, G., Hedberg, M., Henriksson, K.-G., Johansson, G., Wigerstad-Lossing, I., Selldén, U., Örndahl, G., 1988. Muscle Function and Morphology in Myotonic Dystrophy. *Acta Medica Scandinavica* 224, 349–356. <https://doi.org/10.1111/j.0954-6820.1988.tb19594.x>
- Groh, W.J., Groh, M.R., Saha, C., Kincaid, J.C., Simmons, Z., Ciafaloni, E., Pourmand, R., Otten, R.F., Bhakta, D., Nair, G.V., Marashdeh, M.M., Zipes, D.P., Pascuzzi, R.M., 2008. Electrocardiographic Abnormalities and Sudden Death in Myotonic Dystrophy Type 1. *New England Journal of Medicine* 358, 2688–2697. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa062800>
- Groh, W.J., Lowe, M.R., Zipes, D.P., 2002. Severity of cardiac conduction involvement and arrhythmias in myotonic dystrophy type 1 correlates with age and CTG repeat length. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 13, 444–448.
- Haack, T., Schneider, M., Schwendele, B., Renault, A.D., 2014. Drosophila heart cell movement to the midline occurs through both cell autonomous migration and dorsal closure. *Developmental Biology* 396, 169–182. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.08.033>
- Hamshere, M., Harley, H., Harper, P., Brook, J., Brookfield, J., 1999. Myotonic dystrophy: the correlation of (CTG) repeat length in leucocytes with age at onset is significant only for patients with small expansions. *J Med Genet* 36, 59–61.
- Harmon, E.B., Harmon, M.L., Larsen, T.D., Paulson, A.F., Perryman, M.B., 2008. Myotonic dystrophy protein kinase is expressed in embryonic myocytes and is required for myotube formation. *Dev. Dyn.* 237, 2353–2366. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21653>
- Harmon, E.B., Harmon, M.L., Larsen, T.D., Yang, J., Glasford, J.W., Perryman, M.B., 2011. Myotonic dystrophy protein kinase is critical for nuclear envelope integrity. *J. Biol. Chem.* 286, 40296–40306. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.241455>
- Harpaz, N., Ordan, E., Ocorr, K., Bodmer, R., Volk, T., 2013. Multiplexin Promotes Heart but Not Aorta Morphogenesis by Polarized Enhancement of Slit/Robo Activity at the Heart Lumen. *PLOS Genetics* 9, e1003597. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003597>
- Harper, P., Dyken, P., 1972. EARLY-ONSET DYSTROPHIA MYOTONICA EVIDENCE SUPPORTING A MATERNAL ENVIRONMENTAL FACTOR. *The Lancet*, Originally published as Volume 2, Issue 7767 300, 53–55. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(72\)91548-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(72)91548-6)
- Harper, P.S., 1975. Congenital myotonic dystrophy in Britain. I. Clinical aspects. *Arch Dis Child* 50, 505–513.
- Harvey, R.P., Rosenthal, N., 1999. *Heart Development*. Gulf Professional Publishing.
- Hermans, M.C., Faber, C.G., Bekkers, S.C., de Die-Smulders, C.E., Gerrits, M.M., Merkies, I.S., Snoep, G., Pinto, Y.M., Schalla, S., 2012. Structural and functional cardiac changes in myotonic dystrophy type 1: a cardiovascular magnetic resonance study. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance* 14, 48. <https://doi.org/10.1186/1532-429X-14-48>
- Ho, T.H., Bundman, D., Armstrong, D.L., Cooper, T.A., 2005. Transgenic mice expressing CUG-BP1 reproduce splicing mis-regulation observed in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 14, 1539–1547. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi162>
- Housden, Hu, Y., Perrimon, N., 2016. Design and Generation of Drosophila Single Guide RNA Expression Constructs. *Cold Spring Harb Protoc* 2016. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot090779>

- Houseley, J.M., Wang, Z., Brock, G.J.R., Soloway, J., Artero, R., Perez-Alonso, M., O'Dell, K.M.C., Monckton, D.G., 2005. Myotonic dystrophy associated expanded CUG repeat muscleblind positive ribonuclear foci are not toxic to *Drosophila*. *Hum Mol Genet* 14, 873–883. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi080>
- Huguet, A., Medja, F., Nicole, A., Vignaud, A., Guiraud-Dogan, C., Ferry, A., Decostre, V., Hogrel, J.-Y., Metzger, F., Hoeflich, A., Baraibar, M., Gomes-Pereira, M., Puymirat, J., Bassez, G., Furling, D., Munnich, A., Gourdon, G., 2012. Molecular, Physiological, and Motor Performance Defects in DMSXL Mice Carrying >1,000 CTG Repeats from the Human DM1 Locus. *PLoS Genet* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003043>
- Igarashi, H., Momoi, M.Y., Yamagata, T., Shiraishi, H., Eguchi, I., 1998. Hypertrophic Cardiomyopathy in Congenital Myotonic Dystrophy. *Pediatric Neurology* 18, 366–369. [https://doi.org/10.1016/S0887-8994\(97\)00216-6](https://doi.org/10.1016/S0887-8994(97)00216-6)
- Ikeda, S., Kong, S.W., Lu, J., Bisping, E., Zhang, H., Allen, P.D., Golub, T.R., Pieske, B., Pu, W.T., 2007. Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiological Genomics* 31, 367–373. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00144.2007>
- Inui, M., Martello, G., Piccolo, S., 2010. MicroRNA control of signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 252–263. <https://doi.org/10.1038/nrm2868>
- Isrie, M., Wong, L., van Hagen, J.M., Houweling, A.C., 2019. Myotonic dystrophy presenting as severely dilated cardiomyopathy with out-of-hospital cardiac arrest. *Neth Heart J* 27, 54–55. <https://doi.org/10.1007/s12471-018-1207-0>
- Isserlin, R., Merico, D., Wang, D., Vuckovic, D., Bousette, N., Gramolini, A.O., Bader, G.D., Emili, A., 2014. Systems analysis reveals down-regulation of a network of pro-survival miRNAs drives the apoptotic response in dilated cardiomyopathy. *Mol. BioSyst.* 11, 239–251. <https://doi.org/10.1039/C4MB00265B>
- Jagla, K., Frasch, M., Jagla, T., Dretzen, G., Bellard, F., Bellard, M., 1997. ladybird, a new component of the cardiogenic pathway in *Drosophila* required for diversification of heart precursors. *Development* 124, 3471–3479. <https://doi.org/10.1242/dev.124.18.3471>
- Jansen, G., Groenen, P.J., Bächner, D., Jap, P.H., Coerwinkel, M., Oerlemans, F., van den Broek, W., Gohlsch, B., Pette, D., Plomp, J.J., Molenaar, P.C., Nederhoff, M.G., van Echteld, C.J., Dekker, M., Berns, A., Hameister, H., Wieringa, B., 1996. Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice. *Nat. Genet.* 13, 316–324. <https://doi.org/10.1038/ng0796-316>
- Jansen, G., Willems, P., Coerwinkel, M., Nillesen, W., Smeets, H., Vits, L., Höweler, C., Brunner, H., Wieringa, B., 1994. Gonosomal mosaicism in myotonic dystrophy patients: involvement of mitotic events in (CTG)<sub>n</sub> repeat variation and selection against extreme expansion in sperm. *Am. J. Hum. Genet.* 54, 575–585.
- Jiang, H., Mankodi, A., Swanson, M.S., Moxley, R.T., Thornton, C.A., 2004. Myotonic dystrophy type 1 is associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of muscleblind proteins and deregulated alternative splicing in neurons. *Hum Mol Genet* 13, 3079–3088. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh327>
- Kahrizi, K., Moradin, N., Azimian, M., Shojasaffar, B., Alavi, K., Nafisi, S., Hasanzad, M., Moosavi, S.M.E., Shirazian, A., Najmabadi, H., 2010. Genotype–Phenotype Correlations in Iranian Myotonic Dystrophy Type I Patients. *Iranian Rehabilitation Journal* 8, 8–12.
- Kaliman, P., Catalucci, D., Lam, J.T., Kondo, R., Gutiérrez, J.C.P., Reddy, S., Palacín, M., Zorzano, A., Chien, K.R., Ruiz-Lozano, P., 2005. Myotonic dystrophy protein kinase phosphorylates phospholamban and regulates calcium uptake in cardiomyocyte sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 280, 8016–8021. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412845200>

- Kalsotra, A., Singh, R.K., Gurha, P., Ward, A.J., Creighton, C.J., Cooper, T.A., 2014. The Mef2 transcription network is disrupted in myotonic dystrophy heart tissue dramatically altering miRNA and mRNA expression. *Cell Rep* 6, 336–345. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.025>
- Kalsotra, A., Xiao, X., Ward, A.J., Castle, J.C., Johnson, J.M., Burge, C.B., Cooper, T.A., 2008. A postnatal switch of CELF and MBNL proteins reprograms alternative splicing in the developing heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 20333–20338. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809045105>
- Kanadia, R.N., Johnstone, K.A., Mankodi, A., Lungu, C., Thornton, C.A., Esson, D., Timmers, A.M., Hauswirth, W.W., Swanson, M.S., 2003. A Muscleblind Knockout Model for Myotonic Dystrophy. *Science* 302, 1978–1980. <https://doi.org/10.1126/science.1088583>
- Kanadia, R.N., Shin, J., Yuan, Y., Beattie, S.G., Wheeler, T.M., Thornton, C.A., Swanson, M.S., 2006. Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscleblind overexpression in a mouse poly(CUG) model for myotonic dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 11748–11753. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604970103>
- Kapelko, V.I., 2001. Extracellular matrix alterations in cardiomyopathy: The possible crucial role in the dilative form. *Exp Clin Cardiol* 6, 41–49.
- Katoh, T., Hojo, H., Suzuki, T., 2015. Destabilization of microRNAs in human cells by 3' deadenylation mediated by PARN and CUGBP1. *Nucleic Acids Res* 43, 7521–7534. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv669>
- Kenji, J., M, M., N, F., K, K., I, F., K, I., 2013. Somatic instability of CTG repeats in the cerebellum of myotonic dystrophy type 1. *Muscle & nerve* 48. <https://doi.org/10.1002/mus.23717>
- Kim, S.Y., M.D, Kim, J.Y., M.D, Kim, G.P., M.T, Sung, J.-J., M.D, Lim, K.S., M.T, Lee, K.-W., M.D, Chae, J.H., M.D, Hong, Y.-H., M.D, Seong, M.-W., M.D, Park, and S.S., M.D, 2008. Molecular and Clinical Characteristics of Myotonic Dystrophy Type 1 in Koreans. *Annals of Laboratory Medicine* 28, 483–492. <https://doi.org/10.3343/kjlm.2008.28.6.483>
- Kim, Y.K., Mandal, M., Yadava, R.S., Paillard, L., Mahadevan, M.S., 2014. Evaluating the effects of CELF1 deficiency in a mouse model of RNA toxicity. *Hum Mol Genet* 23, 293–302. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt419>
- Kimura, T., Nakamori, M., Lueck, J.D., Pouliquin, P., Aoike, F., Fujimura, H., Dirksen, R.T., Takahashi, M.P., Dulhunty, A.F., Sakoda, S., 2005. Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 14, 2189–2200. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi223>
- King, I.N., Qian, L., Liang, J., Huang, Y., Shieh, J.T.C., Kwon, C., Srivastava, D., 2011. A Genome-wide Screen Reveals a Role for microRNA-1 in Modulating Cardiac Cell Polarity. *Dev Cell* 20, 497–510. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.03.010>
- Kino, Y., Washizu, C., Oma, Y., Onishi, H., Nezu, Y., Sasagawa, N., Nukina, N., Ishiura, S., 2009. MBNL and CELF proteins regulate alternative splicing of the skeletal muscle chloride channel CLCN1. *Nucleic Acids Res* 37, 6477–6490. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp681>
- Klesert, T.R., Cho, D.H., Clark, J.I., Maylie, J., Adelman, J., Snider, L., Yuen, E.C., Soriano, P., Tapscott, S.J., 2000. Mice deficient in Six5 develop cataracts: implications for myotonic dystrophy. *Nat. Genet.* 25, 105–109. <https://doi.org/10.1038/75490>
- Klesert, T.R., Otten, A.D., Bird, T.D., Tapscott, S.J., 1997. Trinucleotide repeat expansion at the myotonic dystrophy locus reduces expression of DMAHP. *Nat. Genet.* 16, 402–406. <https://doi.org/10.1038/ng0897-402>

- Klinedinst, S.L., Bodmer, R., 2003. Gata factor Pannier is required to establish competence for heart progenitor formation. *Development* 130, 3027–3038. <https://doi.org/10.1242/dev.00517>
- Koehorst, E., Ballester-Lopez, A., Arechavala-Gomez, V., Martínez-Piñeiro, A., Nogales-Gadea, G., 2020. The Biomarker Potential of miRNAs in Myotonic Dystrophy Type I. *J Clin Med* 9, 3939. <https://doi.org/10.3390/jcm9123939>
- Koshelev, M., Sarma, S., Price, R.E., Wehrens, X.H.T., Cooper, T.A., 2010. Heart-specific overexpression of CUGBP1 reproduces functional and molecular abnormalities of myotonic dystrophy type 1. *Hum. Mol. Genet.* 19, 1066–1075. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp570>
- Krahe, R., Ashizawa, T., Abbruzzese, C., Roeder, E., Carango, P., Giacanelli, M., Funanage, V.L., Siciliano, M.J., 1995. Effect of myotonic dystrophy trinucleotide repeat expansion on DMPK transcription and processing. *Genomics* 28, 1–14. <https://doi.org/10.1006/geno.1995.1099>
- Kroksmark, A.-K., Ekström, A.-B., Björck, E., Tulinius, M., 2005. Myotonic dystrophy: muscle involvement in relation to disease type and size of expanded CTG-repeat sequence. *Dev Med Child Neurol* 47, 478–485.
- Kumari, D., Usdin, K., 2009. Chromatin Remodeling in the Noncoding Repeat Expansion Diseases \*. *Journal of Biological Chemistry* 284, 7413–7417. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800026200>
- Kuyumcu-Martinez, N.M., Wang, G.-S., Cooper, T.A., 2007. Increased steady-state levels of CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation. *Mol. Cell* 28, 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.07.027>
- Kwon, C., Han, Z., Olson, E.N., Srivastava, D., 2005. MicroRNA1 influences cardiac differentiation in *Drosophila* and regulates Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18986–18991. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509535102>
- Ladd, A.N., Nguyen, N.H., Malhotra, K., Cooper, T.A., 2004. CELF6, a member of the CELF family of RNA-binding proteins, regulates muscle-specific splicing enhancer-dependent alternative splicing. *J. Biol. Chem.* 279, 17756–17764. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310687200>
- Ladd, A.N., Stenberg, M.G., Swanson, M.S., Cooper, T.A., 2005. Dynamic balance between activation and repression regulates pre-mRNA alternative splicing during heart development. *Dev. Dyn.* 233, 783–793. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20382>
- Lam, L.T., Pham, Y.C., Nguyen, T.M., Morris, G.E., 2000. Characterization of a monoclonal antibody panel shows that the myotonic dystrophy protein kinase, DMPK, is expressed almost exclusively in muscle and heart. *Hum Mol Genet* 9, 2167–2173. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.14.2167>
- Lamers, W.H., Moorman, A.F.M., 2002. Cardiac Septation. *Circulation Research* 91, 93–103. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000027135.63141.89>
- Lawrence, P.A., Bodmer, R., Vincent, J.-P., 1996. Segmental patterning of heart precursors in *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)* 121, 4303–8.
- Lee, J.E., Cooper, T.A., 2009. Pathogenic mechanisms of myotonic dystrophy. *Biochem Soc Trans* 37. <https://doi.org/10.1042/BST0371281>
- Lee, K.-Y., Li, M., Manchanda, M., Batra, R., Charizanis, K., Mohan, A., Warren, S.A., Chamberlain, C.M., Finn, D., Hong, H., Ashraf, H., Kasahara, H., Ranum, L.P.W., Swanson, M.S., 2013. Compound loss of muscleblind-like function in myotonic dystrophy. *EMBO Mol Med* 5, 1887–1900. <https://doi.org/10.1002/emmm.201303275>
- Lilly, B., Zhao, B., Ranganayakulu, G., Paterson, B.M., Schulz, R.A., Olson, E.N., 1995. Requirement of MADS domain transcription factor D-MEF2 for muscle formation in *Drosophila*. *Science* 267, 688–693. <https://doi.org/10.1126/science.7839146>

- Lin, A.E., Mitchell, F.M., Fitz, R.W., Doyle, J.J., 1989. Dilated cardiomyopathy in myotonic dystrophy. *Journal of the American College of Cardiology* 13, 262–263. [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(89\)90582-2](https://doi.org/10.1016/0735-1097(89)90582-2)
- Lin, X., Miller, J.W., Mankodi, A., Kanadia, R.N., Yuan, Y., Moxley, R.T., Swanson, M.S., Thornton, C.A., 2006. Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy. *Human Molecular Genetics* 15, 2087–2097. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl132>
- Llagostera, E., Catalucci, D., Marti, L., Liesa, M., Camps, M., Ciaraldi, T.P., Kondo, R., Reddy, S., Dillmann, W.H., Palacin, M., Zorzano, A., Ruiz-Lozano, P., Gomis, R., Kaliman, P., 2007. Role of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) in glucose homeostasis and muscle insulin action. *PLoS One* 2, e1134. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001134>
- Lo, P.C.H., Zaffran, S., Sénatore, S., Frasch, M., 2007. The *Drosophila* Hand gene is required for remodeling of the developing adult heart and midgut during metamorphosis. *Dev Biol* 311, 287–296. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.08.024>
- Lockwood, W.K., Bodmer, R., 2002. The patterns of wingless, decapentaplegic, and tinman position the *Drosophila* heart. *Mechanisms of Development* 114, 13–26. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(02\)00044-8](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(02)00044-8)
- López de Munain, A., Cobo, A.M., Huguet, E., Marti Massó, J.F., Johnson, K., Baiget, M., 1994. CTG trinucleotide repeat variability in identical twins with myotonic dystrophy. *Ann Neurol* 35, 374–375. <https://doi.org/10.1002/ana.410350323>
- Loria, P.M., Duke, A., Rand, J.B., Hobert, O., 2003. Two neuronal, nuclear-localized RNA binding proteins involved in synaptic transmission. *Curr. Biol.* 13, 1317–1323.
- Louzao-Martinez, L., Vink, A., Harakalova, M., Asselbergs, F.W., Verhaar, M.C., Cheng, C., 2016. Characteristic adaptations of the extracellular matrix in dilated cardiomyopathy. *International Journal of Cardiology* 220, 634–646. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.06.253>
- Lovato, T.L., Nguyen, T.P., Molina, M.R., Cripps, R.M., 2002. The Hox gene abdominal-A specifies heart cell fate in the *Drosophila* dorsal vessel. *Development* 129, 5019–5027. <https://doi.org/10.1242/dev.129.21.5019>
- Lund, M., Diaz, L.J., Ranthe, M.F., Petri, H., Duno, M., Juncker, I., Eiberg, H., Vissing, J., Bundgaard, H., Wohlfahrt, J., Melbye, M., 2014. Cardiac involvement in myotonic dystrophy: a nationwide cohort study. *European Heart Journal* 35, 2158–2164. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu157>
- Lyons, I., Parsons, L.M., Hartley, L., Li, R., Andrews, J.E., Robb, L., Harvey, R.P., 1995. Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene *Nkx2-5*. *Genes Dev.* 9, 1654–1666. <https://doi.org/10.1101/gad.9.13.1654>
- Ma, G., Wang, Y., Li, Y., Cui, L., Zhao, Y., Zhao, B., Li, K., 2015. MiR-206, a Key Modulator of Skeletal Muscle Development and Disease. *Int J Biol Sci* 11, 345–352. <https://doi.org/10.7150/ijbs.10921>
- Maeda, M., Taft, C.S., Bush, E.W., Holder, E., Bailey, W.M., Neville, H., Perryman, M.B., Bies, R.D., 1995. Identification, Tissue-specific Expression, and Subcellular Localization of the 80- and 71-kDa Forms of Myotonic Dystrophy Kinase Protein (\*). *Journal of Biological Chemistry* 270, 20246–20249. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.35.20246>
- Mahadevan, M., Tsilfidis, C., Sabourin, L., Shutler, G., Amemiya, C., Jansen, G., Neville, C., Narang, M., Barceló, J., O’Hoy, K., 1992. Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3’ untranslated region of the gene. *Science* 255, 1253–1255. <https://doi.org/10.1126/science.1546325>

- Mahadevan, M.S., Yadava, R.S., Yu, Q., Balijepalli, S., Frenzel-McCardell, C.D., Bourne, T.D., Phillips, L.H., 2006. Reversible model of RNA toxicity and cardiac conduction defects in myotonic dystrophy. *Nat Genet* 38, 1066–1070. <https://doi.org/10.1038/ng1857>
- Mankodi, A., Logigian, E., Callahan, L., McClain, C., White, R., Henderson, D., Krym, M., Thornton, C.A., 2000. Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science* 289, 1769–1773.
- Mankodi, A., Takahashi, M.P., Jiang, H., Beck, C.L., Bowers, W.J., Moxley, R.T., Cannon, S.C., Thornton, C.A., 2002. Expanded CUG Repeats Trigger Aberrant Splicing of CIC-1 Chloride Channel Pre-mRNA and Hyperexcitability of Skeletal Muscle in Myotonic Dystrophy. *Molecular Cell* 10, 35–44. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00563-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00563-4)
- Mankodi, A., Urbinati, C.R., Yuan, Q.P., Moxley, R.T., Sansone, V., Krym, M., Henderson, D., Schalling, M., Swanson, M.S., Thornton, C.A., 2001. Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2. *Hum. Mol. Genet.* 10, 2165–2170.
- Martorell, L., Johnson, K., Boucher, C.A., Baiget, M., 1997. Somatic Instability of the Myotonic Dystrophy (CTG)<sub>n</sub> Repeat during Human Fetal Development. *Human Molecular Genetics* 6, 877–880. <https://doi.org/10.1093/hmg/6.6.877>
- Martorell, L., Martinez, J.M., Carey, N., Johnson, K., Baiget, M., 1995. Comparison of CTG repeat length expansion and clinical progression of myotonic dystrophy over a five year period. *J Med Genet* 32, 593–596.
- Masuda, A., Andersen, H.S., Doktor, T.K., Okamoto, T., Ito, M., Andresen, B.S., Ohno, K., 2012. CUGBP1 and MBNL1 preferentially bind to 3' UTRs and facilitate mRNA decay. *Sci Rep* 2, 209. <https://doi.org/10.1038/srep00209>
- Mathieu, J., Allard, P., Potvin, L., Prévost, C., Bégin, P., 1999. A 10-year study of mortality in a cohort of patients with myotonic dystrophy. *Neurology* 52, 1658–1662. <https://doi.org/10.1212/wnl.52.8.1658>
- Mathieu, J., Braekeleer, M.D., Prévost, C., 1990. Genealogical reconstruction of myotonic dystrophy in the Saguenay-Lac-Saint-Jean area (Quebec, Canada). *Neurology* 40, 839–839. <https://doi.org/10.1212/WNL.40.5.839>
- Mée, G.L., Ezzeddine, N., Capri, M., Aït-Ahmed, O., 2008. Repeat Length and RNA Expression Level Are Not Primary Determinants in CUG Expansion Toxicity in *Drosophila* Models. *PLOS ONE* 3, e1466. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001466>
- Meola, G., Cardani, R., 2015. Myotonic dystrophies: An update on clinical aspects, genetic, pathology, and molecular pathomechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, Neuromuscular Diseases: Pathology and Molecular Pathogenesis* 1852, 594–606. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.05.019>
- Merino, J.L., Carmona, J.R., Fernández-Lozano, I., Peinado, R., Basterra, N., Sobrino, J.A., 1998. Mechanisms of Sustained Ventricular Tachycardia in Myotonic Dystrophy. *Circulation* 98, 541–546. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.98.6.541>
- Merlevede, K., Vermander, D., Theys, P., Legius, E., Ector, H., Robberecht, W., 2002. Cardiac involvement and CTG expansion in myotonic dystrophy. *J Neurol* 249, 693–698. <https://doi.org/10.1007/s00415-002-0692-6>
- Meyer, F., Moussian, B., 2009. *Drosophila* multiplexin (Dmp) modulates motor axon pathfinding accuracy. *Development, Growth & Differentiation* 51, 483–498. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2009.01111.x>
- Meyer, H., Panz, M., Zmojdzian, M., Jagla, K., Paululat, A., 2009. Neprilysin 4, a novel endopeptidase from *Drosophila melanogaster*, displays distinct substrate specificities

- and exceptional solubility states. *Journal of Experimental Biology* 212, 3673–3683. <https://doi.org/10.1242/jeb.034272>
- Michalowski, S., Miller, J.W., Urbinati, C.R., Paliouras, M., Swanson, M.S., Griffith, J., 1999. Visualization of double-stranded RNAs from the myotonic dystrophy protein kinase gene and interactions with CUG-binding protein. *Nucleic Acids Res* 27, 3534–3542. <https://doi.org/10.1093/nar/27.17.3534>
- Miller, J.W., Urbinati, C.R., Teng-Umuay, P., Stenberg, M.G., Byrne, B.J., Thornton, C.A., Swanson, M.S., 2000. Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy. *EMBO J* 19, 4439–4448. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.17.4439>
- Momota, R., Naito, I., Ninomiya, Y., Ohtsuka, A., 2011. Drosophila type XV/XVIII collagen, Mp, is involved in Wingless distribution. *Matrix Biology* 30, 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2011.03.008>
- Momota, R., Narasaki, M., Komiyama, T., Naito, I., Ninomiya, Y., Ohtsuka, A., 2013. Drosophila type XV/XVIII collagen mutants manifest integrin mediated mitochondrial dysfunction, which is improved by cyclosporin A and losartan. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45, 1003–1011. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.02.001>
- Monier, B., Astier, M., Sémériva, M., Perrin, L., 2005. Steroid-dependent modification of Hox function drives myocyte reprogramming in the Drosophila heart. *Development* 132, 5283–5293. <https://doi.org/10.1242/dev.02091>
- Moorman, A., Webb, S., Brown, N.A., Lamers, W., Anderson, R.H., 2003. DEVELOPMENT OF THE HEART: (1) FORMATION OF THE CARDIAC CHAMBERS AND ARTERIAL TRUNKS. *Heart* 89, 806–814.
- Morales, F., Couto, J.M., Higham, C.F., Hogg, G., Cuenca, P., Braida, C., Wilson, R.H., Adam, B., del Valle, G., Brian, R., Sittenfeld, M., Ashizawa, T., Wilcox, A., Wilcox, D.E., Monckton, D.G., 2012. Somatic instability of the expanded CTG triplet repeat in myotonic dystrophy type 1 is a heritable quantitative trait and modifier of disease severity. *Hum Mol Genet* 21, 3558–3567. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds185>
- Morgan, T.H., Sturtevant, A.H., Muller, H.J., Bridges, C.B., 1915. *The Mechanism of Mendelian Heredity*.
- Mounsey, J.P., John, J.E., Helmke, S.M., Bush, E.W., Gilbert, J., Roses, A.D., Perryman, M.B., Jones, L.R., Moorman, J.R., 2000. Phospholemman Is a Substrate for Myotonic Dystrophy Protein Kinase\*. *Journal of Biological Chemistry* 275, 23362–23367. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000899200>
- Murányi, A., Derkach, D., Erdodi, F., Kiss, A., Ito, M., Hartshorne, D.J., 2005. Phosphorylation of Thr695 and Thr850 on the myosin phosphatase target subunit: inhibitory effects and occurrence in A7r5 cells. *FEBS Lett* 579, 6611–6615. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.10.055>
- Nakamori, M., Kimura, T., Kubota, T., Matsumura, T., Sumi, H., Fujimura, H., Takahashi, M.P., Sakoda, S., 2008. Aberrantly spliced alpha-dystrobrevin alters alpha-syntrophin binding in myotonic dystrophy type 1. *Neurology* 70, 677–685. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000302174.08951.cf>
- Nakamori, M., Sobczak, K., Puwanant, A., Welle, S., Eichinger, K., Pandya, S., Dekdebrun, J., Heatwole, C.R., McDermott, M.P., Chen, T., Cline, M., Tawil, R., Osborne, R.J., Wheeler, T.M., Swanson, M.S., Moxley, R.T., Thornton, C.A., 2013. Splicing biomarkers of disease severity in myotonic dystrophy. *Ann Neurol* 74, 862–872. <https://doi.org/10.1002/ana.23992>
- Nguyen, Harold H., Wolfe, J.T., Holmes, D.R., Edwards, W.D., 1988. Pathology of the cardiac conduction system in myotonic dystrophy: A study of 12 cases. *Journal of the*

- American College of Cardiology 11, 662–671. [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(88\)91547-1](https://doi.org/10.1016/0735-1097(88)91547-1)
- Nguyen, H. H., Wolfe, J.T., Holmes, D.R., Edwards, W.D., 1988. Pathology of the cardiac conduction system in myotonic dystrophy: a study of 12 cases. *J. Am. Coll. Cardiol.* 11, 662–671.
- Nikhanj, A., Sivakumaran, S., Miskew-Nichols, B., Siddiqi, Z.A., Oudit, G.Y., 2019. Ventricular tachycardia in patients with type 1 myotonic dystrophy: a case series. *Eur Heart J Case Rep* 3, ytz095. <https://doi.org/10.1093/ehjcr/ytz095>
- Orengo, J.P., Chambon, P., Metzger, D., Mosier, D.R., Snipes, G.J., Cooper, T.A., 2008. Expanded CTG repeats within the DMPK 3' UTR causes severe skeletal muscle wasting in an inducible mouse model for myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2646–2651. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708519105>
- Paillard, L., Legagneux, V., Beverley Osborne, H., 2003. A functional deadenylation assay identifies human CUG-BP as a deadenylation factor. *Biol. Cell* 95, 107–113.
- Pantic, B., Trevisan, E., Citta, A., Rigobello, M.P., Marin, O., Bernardi, P., Salvatori, S., Rasola, A., 2013. Myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) prevents ROS-induced cell death by assembling a hexokinase II-Src complex on the mitochondrial surface. *Cell Death Dis* 4, e858–e858. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.385>
- Papa, A.A., Verrillo, F., Scutifero, M., Rago, A., Morra, S., Cassese, A., Cioppa, N.D., Magliocca, M.C., Galante, D., Palladino, A., Golino, P., Politano, L., 2018. Heart transplantation in a patient with Myotonic Dystrophy type 1 and end-stage dilated cardiomyopathy: a short term follow-up. *Acta Myol* 37, 267–271.
- Paternostro, G., Vignola, C., Bartsch, D.-U., Omens, J.H., McCulloch, A.D., Reed, J.C., 2001. Age-Associated Cardiac Dysfunction in *Drosophila melanogaster*. *Circulation Research* 88, 1053–1058. <https://doi.org/10.1161/hh1001.090857>
- Paul, S., Dansithong, W., Kim, D., Rossi, J., Webster, N.J.G., Comai, L., Reddy, S., 2006. Interaction of muscleblind, CUG-BP1 and hnRNP H proteins in DM1-associated aberrant IR splicing. *EMBO J* 25, 4271–4283. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601296>
- Paunic, T., Peric, S., Cvitan, E., Raspopovic, S., Peric, M., Mandic Stojmenovic, G., Rakocevic Stojanovic, V., 2017. Routine echocardiography in patients with myotonic dystrophy type 1. *Journal of the Chinese Medical Association* 80, 408–412. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.04.004>
- Pelargonio, G., Russo, A.D., Sanna, T., De Martino, G., Bellocchi, F., 2002. MYOTONIC DYSTROPHY AND THE HEART. *Heart* 88, 665–670.
- Perbellini, R., Greco, S., Sarra-Ferraris, G., Cardani, R., Capogrossi, M.C., Meola, G., Martelli, F., 2011. Dysregulation and cellular mislocalization of specific miRNAs in myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscular Disorders* 21, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2010.11.012>
- Perrin, L., Monier, B., Ponzelli, R., Astier, M., Semeriva, M., 2004. *Drosophila* cardiac tube organogenesis requires multiple phases of Hox activity. *Developmental Biology* 272, 419–431. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.04.036>
- Perrin, L., Röder, L., 2016. Pathologies et vieillissement cardiaque - Les leçons d'un tout petit cœur. *Med Sci (Paris)* 32, 470–477. <https://doi.org/10.1051/medsci/20163205013>
- Pešović, J., Perić, S., Brkušanić, M., Brajušković, G., Rakočević-Stojanović, V., Savić-Pavićević, D., 2018. Repeat Interruptions Modify Age at Onset in Myotonic Dystrophy Type 1 by Stabilizing DMPK Expansions in Somatic Cells. *Frontiers in Genetics* 9.
- Petri, H., Ahtarovski, K.A., Vejlsttrup, N., Vissing, J., Witting, N., Køber, L., Bundgaard, H., 2014. Myocardial fibrosis in patients with myotonic dystrophy type 1: a cardiovascular

- magnetic resonance study. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance* 16, 59. <https://doi.org/10.1186/s12968-014-0059-z>
- Petri, H., Vissing, J., Witting, N., Bundgaard, H., Køber, L., 2012. Cardiac manifestations of myotonic dystrophy type 1. *International Journal of Cardiology* 160, 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2011.08.037>
- Philips, A.V., Timchenko, L.T., Cooper, T.A., 1998. Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science* 280, 737–741. <https://doi.org/10.1126/science.280.5364.737>
- Phillips, M.F., Harper, P.S., 1997. Cardiac disease in myotonic dystrophy. *Cardiovascular Research* 33, 13–22. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(96\)00163-0](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(96)00163-0)
- Picchio, L., Legagneux, V., Deschamps, S., Renaud, Y., Chauveau, S., Paillard, L., Jagla, K., 2018. Bruno-3 regulates sarcomere component expression and contributes to muscle phenotypes of myotonic dystrophy type 1. *Dis Model Mech* 11. <https://doi.org/10.1242/dmm.031849>
- Picchio, L., Plantie, E., Renaud, Y., Poovthumkadavil, P., Jagla, K., 2013. Novel *Drosophila* model of myotonic dystrophy type 1: phenotypic characterization and genome-wide view of altered gene expression. *Hum Mol Genet* 22, 2795–2810. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt127>
- Plantie, E., Nakamori, M., Renaud, Y., Huguet, A., Choquet, C., Dondi, C., Miquerol, L., Takahashi, M., Gourdon, G., Junion, G., Jagla, T., Zmojdzian, M., Jagla, K., 2018. Straightjacket/ $\alpha$  2 $\delta$  3 deregulation is associated with cardiac conduction defects in Myotonic Dystrophy type 1. *bioRxiv* 431569. <https://doi.org/10.1101/431569>
- Port, F., Strein, C., Stricker, M., Rauscher, B., Heigwer, F., Zhou, J., Beyersdörffer, C., Frei, J., Hess, A., Kern, K., Lange, L., Langner, N., Malamud, R., Pavlović, B., Räddecke, K., Schmitt, L., Voos, L., Valentini, E., Boutros, M., 2020. A large-scale resource for tissue-specific CRISPR mutagenesis in *Drosophila*. *eLife* 9, e53865. <https://doi.org/10.7554/eLife.53865>
- Premawardhana, L.D., Thirunavakarasu, G., 1992. Myotonia dystrophica--first presentation as severe left ventricular failure complicating dilated cardiomyopathy. *Postgraduate Medical Journal* 68, 67–67. <https://doi.org/10.1136/pgmj.68.795.67>
- Qian, L., Wythe, J.D., Liu, J., Cartry, J., Vogler, G., Mohapatra, B., Otway, R.T., Huang, Y., King, I.N., Maillet, M., Zheng, Y., Crawley, T., Taghli-Lamalle, O., Semsarian, C., Dunwoodie, S., Winlaw, D., Harvey, R.P., Fatkin, D., Towbin, J.A., Molkentin, J.D., Srivastava, D., Ocorr, K., Bruneau, B.G., Bodmer, R., 2011. Tinman/Nkx2-5 acts via miR-1 and upstream of Cdc42 to regulate heart function across species. *J Cell Biol* 193, 1181–1196. <https://doi.org/10.1083/jcb.201006114>
- Rasi Karolina, Piuhola Jarkko, Czabanka Marcus, Sormunen Raija, Ilves Mika, Leskinen Hanna, Rysä Jaana, Kerkelä Risto, Janmey Paul, Heljasvaara Ritva, Peuhkurinen Keijo, Vuolteenaho Olli, Ruskoaho Heikki, Vajkoczy Peter, Pihlajaniemi Taina, Eklund Lauri, 2010. Collagen XV Is Necessary for Modeling of the Extracellular Matrix and Its Deficiency Predisposes to Cardiomyopathy. *Circulation Research* 107, 1241–1252. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.222133>
- Rau, F., Freyermuth, F., Fugier, C., Villemin, J.-P., Fischer, M.-C., Jost, B., Dembele, D., Gourdon, G., Nicole, A., Duboc, D., Wahbi, K., Day, J.W., Fujimura, H., Takahashi, M.P., Auboeuf, D., Dreumont, N., Furling, D., Charlet-Berguerand, N., 2011. Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy. *Nature Structural & Molecular Biology* 18, 840. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2067>
- Reddy, S., Smith, D.B., Rich, M.M., Leferovich, J.M., Reilly, P., Davis, B.M., Tran, K., Rayburn, H., Bronson, R., Cros, D., Balice-Gordon, R.J., Housman, D., 1996. Mice

- lacking the myotonic dystrophy protein kinase develop a late onset progressive myopathy. *Nat. Genet.* 13, 325–335. <https://doi.org/10.1038/ng0796-325>
- Reim, I., Frasch, M., 2005. The Dorsocross T-box genes are key components of the regulatory network controlling early cardiogenesis in *Drosophila*. *Development* 132, 4911–4925. <https://doi.org/10.1242/dev.02077>
- Reiter, L.T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M., Bier, E., 2001. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* 11, 1114–1125. <https://doi.org/10.1101/gr.169101>
- Rinaldi, F., Terracciano, C., Pisani, V., Massa, R., Loro, E., Vergani, L., Di Girolamo, S., Angelini, C., Gourdon, G., Novelli, G., Botta, A., 2012. Aberrant splicing and expression of the non muscle myosin heavy-chain gene MYH14 in DM1 muscle tissues. *Neurobiol. Dis.* 45, 264–271. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.08.010>
- Roberts, R., Timchenko, N.A., Miller, J.W., Reddy, S., Caskey, C.T., Swanson, M.S., Timchenko, L.T., 1997. Altered phosphorylation and intracellular distribution of a (CUG)<sub>n</sub> triplet repeat RNA-binding protein in patients with myotonic dystrophy and in myotonin protein kinase knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 13221–13226. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.24.13221>
- Rotstein, B., Paululat, A., 2016. On the Morphology of the *Drosophila* Heart. *Journal of Cardiovascular Development and Disease* 3, 15. <https://doi.org/10.3390/jcdd3020015>
- Rugendorff, A., Younossi-Hartenstein, A., Hartenstein, V., 1994. Embryonic origin and differentiation of the *Drosophila* heart. *Roux's Arch Dev Biol* 203, 266–280. <https://doi.org/10.1007/BF00360522>
- Russo, V., Papa, A.A., Lioncino, M., Rago, A., Di Fraia, F., Palladino, A., Politano, L., Golino, P., Nigro, G., 2021. Prevalence of atrial fibrillation in myotonic dystrophy type 1: A systematic review. *Neuromuscul Disord* 31, 281–290. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2021.01.002>
- Ryan, K.M., Hoshizaki, D.K., Cripps, R.M., 2005. Homeotic selector genes control the patterning of seven-up expressing cells in the *Drosophila* dorsal vessel. *Mechanisms of Development* 122, 1023–1033. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2005.04.007>
- Salvatori, S., Fanin, M., Trevisan, C.P., Furlan, S., Reddy, S., Nagy, J.I., Angelini, C., 2005. Decreased expression of DMPK: correlation with CTG repeat expansion and fibre type composition in myotonic dystrophy type 1. *Neurol Sci* 26, 235–242. <https://doi.org/10.1007/s10072-005-0466-x>
- Sarkar, P.S., Appukuttan, B., Han, J., Ito, Y., Ai, C., Tsai, W., Chai, Y., Stout, J.T., Reddy, S., 2000. Heterozygous loss of Six5 in mice is sufficient to cause ocular cataracts. *Nat. Genet.* 25, 110–114. <https://doi.org/10.1038/75500>
- Sarkar, P.S., Paul, S., Han, J., Reddy, S., 2004. Six5 is required for spermatogenic cell survival and spermiogenesis. *Hum. Mol. Genet.* 13, 1421–1431. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh161>
- Savić, D., Rakočević-Stojanović, V., Keckarević, D., Čuljković, B., Stojković, O., Mladenović, J., Todorović, S., Apostolski, S., Romac, S., 2002. 250 CTG repeats in DMPK is a threshold for correlation of expansion size and age at onset of juvenile–adult DM1. *Human Mutation* 19, 131–139. <https://doi.org/10.1002/humu.10027>
- Savkur, R.S., Philips, A.V., Cooper, T.A., 2001. Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nature Genetics* 29, 40. <https://doi.org/10.1038/ng704>
- Schilling, L., Forst, R., Forst, J., Fujak, A., 2013. Orthopaedic Disorders in Myotonic Dystrophy Type 1: descriptive clinical study of 21 patients. *BMC Musculoskeletal Disord* 14, 338. <https://doi.org/10.1186/1471-2474-14-338>

- Schoser, B., 2020. Myotonic Dystrophy Type 2, GeneReviews® [Internet]. University of Washington, Seattle.
- Sen, S., Talukdar, I., Webster, N.J.G., 2009. SRp20 and CUG-BP1 Modulate Insulin Receptor Exon 11 Alternative Splicing. *Mol Cell Biol* 29, 871–880. <https://doi.org/10.1128/MCB.01709-08>
- Sergeant, N., Sablonnière, B., Schraen-Maschke, S., Ghestem, A., Muraige, C.A., Watzel, A., Vermersch, P., Delacourte, A., 2001. Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 10, 2143–2155. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.19.2143>
- Sertié, A.L., Sossi, V., Camargo, A.A., Zatz, M., Brahe, C., Passos-Bueno, M.R., 2000. Collagen XVIII, containing an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth, plays a critical role in the maintenance of retinal structure and in neural tube closure (Knobloch syndrome). *Hum. Mol. Genet.* 9, 2051–2058.
- Sessions, A.O., Kaushik, G., Parker, S., Raedschelders, K., Bodmer, R., Van Eyk, J.E., Engler, A.J., 2017. Extracellular Matrix Downregulation in the Drosophila Heart Preserves Contractile Function and Improves Lifespan. *Matrix Biol* 62, 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2016.10.008>
- Seznec, H., Agbulut, O., Sergeant, N., Savouret, C., Ghestem, A., Tabti, N., Willer, J.C., Ourth, L., Duros, C., Brisson, E., Fouquet, C., Butler-Browne, G., Delacourte, A., Junien, C., Gourdon, G., 2001. Mice transgenic for the human myotonic dystrophy region with expanded CTG repeats display muscular and brain abnormalities. *Hum. Mol. Genet.* 10, 2717–2726.
- Seznec, H., Lia-Baldini, A.S., Duros, C., Fouquet, C., Lacroix, C., Hofmann-Radvanyi, H., Junien, C., Gourdon, G., 2000. Transgenic mice carrying large human genomic sequences with expanded CTG repeat mimic closely the DM CTG repeat intergenerational and somatic instability. *Hum Mol Genet* 9, 1185–1194. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.8.1185>
- Shah, A.P., Nongthomba, U., Kelly Tanaka, K.K., Denton, M.L.B., Meadows, S.M., Bancroft, N., Molina, M.R., Cripps, R.M., 2011. Cardiac remodeling in Drosophila arises from changes in actin gene expression and from a contribution of lymph gland-like cells to the heart musculature. *Mech Dev* 128, 222–233. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2011.01.001>
- Shi, Y., Katsev, S., Cai, C., Evans, S., 2000. BMP Signaling Is Required for Heart Formation in Vertebrates 12.
- Sokol, N.S., Ambros, V., 2005. Mesodermally expressed Drosophila microRNA-1 is regulated by Twist and is required in muscles during larval growth. *Genes Dev* 19, 2343–2354. <https://doi.org/10.1101/gad.1356105>
- Souidi, A., Jagla, K., 2021. Drosophila Heart as a Model for Cardiac Development and Diseases. *Cells* 10, 3078. <https://doi.org/10.3390/cells10113078>
- Souidi, A., Zmojdzian, M., Jagla, K., 2018. Dissecting Pathogenetic Mechanisms and Therapeutic Strategies in Drosophila Models of Myotonic Dystrophy Type 1. *Int J Mol Sci* 19, E4104. <https://doi.org/10.3390/ijms19124104>
- Su, M.T., Fujioka, M., Goto, T., Bodmer, R., 1999. The Drosophila homeobox genes *zfh-1* and *even-skipped* are required for cardiac-specific differentiation of a *numb*-dependent lineage decision. *Development* 126, 3241–3251. <https://doi.org/10.1242/dev.126.14.3241>
- Taneja, K.L., McCurrach, M., Schalling, M., Housman, D., Singer, R.H., 1995. Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues. *J. Cell Biol.* 128, 995–1002.

- Tang, Z.Z., Yarotsky, V., Wei, L., Sobczak, K., Nakamori, M., Eichinger, K., Moxley, R.T., Dirksen, R.T., Thornton, C.A., 2012. Muscle weakness in myotonic dystrophy associated with misregulated splicing and altered gating of Ca(V)1.1 calcium channel. *Hum Mol Genet* 21, 1312–1324. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr568>
- Temmerman, N.D., Sermon, K., Seneca, S., De Rycke, M., Hilven, P., Lissens, W., Van Steirteghem, A., Liebaers, I., 2004a. Intergenerational Instability of the Expanded CTG Repeat in the DMPK Gene: Studies in Human Gametes and Preimplantation Embryos. *Am J Hum Genet* 75, 325–329.
- Temmerman, N.D., Sermon, K., Seneca, S., De Rycke, M., Hilven, P., Lissens, W., Van Steirteghem, A., Liebaers, I., 2004b. Intergenerational Instability of the Expanded CTG Repeat in the DMPK Gene: Studies in Human Gametes and Preimplantation Embryos. *Am J Hum Genet* 75, 325–329.
- Thornell, L.-E., Lindstöm, M., Renault, V., Klein, A., Mouly, V., Ansved, T., Butler-Browne, G., Furling, D., 2009. Satellite cell dysfunction contributes to the progressive muscle atrophy in myotonic dystrophy type 1. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 35, 603–613. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2009.01014.x>
- Thornton, C.A., Johnson, K., Moxley, R.T., 1994. Myotonic dystrophy patients have larger CTG expansions in skeletal muscle than in leukocytes. *Ann Neurol* 35, 104–107. <https://doi.org/10.1002/ana.410350116>
- Thum, T., Gross, C., Fiedler, J., Fischer, T., Kissler, S., Bussen, M., Galuppo, P., Just, S., Rotbauer, W., Frantz, S., Castoldi, M., Soutschek, J., Koteliansky, V., Rosenwald, A., Basson, M.A., Licht, J.D., Pena, J.T.R., Rouhanifard, S.H., Muckenthaler, M.U., Tuschl, T., Martin, G.R., Bauersachs, J., Engelhardt, S., 2008. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* 456, 980–984. <https://doi.org/10.1038/nature07511>
- Tian, Y., Cohen, E.D., Morrisey, E.E., 2010. The Importance of Wnt Signaling in Cardiovascular Development. *Pediatr Cardiol* 31, 342–348. <https://doi.org/10.1007/s00246-009-9606-z>
- Timchenko, L.T., Miller, J.W., Timchenko, N.A., DeVore, D.R., Datar, K.V., Lin, L., Roberts, R., Caskey, C.T., Swanson, M.S., 1996. Identification of a (CUG)<sub>n</sub> triplet repeat RNA-binding protein and its expression in myotonic dystrophy. *Nucleic Acids Res* 24, 4407–4414.
- Timchenko, N.A., Patel, R., Iakova, P., Cai, Z.-J., Quan, L., Timchenko, L.T., 2004. Overexpression of CUG triplet repeat-binding protein, CUGBP1, in mice inhibits myogenesis. *J. Biol. Chem.* 279, 13129–13139. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312923200>
- Tran, H., Gourrier, N., Lemercier-Neuillet, C., Dhaenens, C.-M., Vautrin, A., Fernandez-Gomez, F.J., Arandel, L., Carpentier, C., Obriot, H., Eddarkaoui, S., Delattre, L., Brussels, E.V., Holt, I., Morris, G.E., Sablonnière, B., Buée, L., Charlet-Berguerand, N., Schraen-Maschke, S., Furling, D., Behm-Ansmant, I., Branlant, C., Caillet-Boudin, M.-L., Sergeant, N., 2011. Analysis of Exonic Regions Involved in Nuclear Localization, Splicing Activity, and Dimerization of Muscleblind-like-1 Isoforms \*. *Journal of Biological Chemistry* 286, 16435–16446. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.194928>
- Venken, K.J.T., Bellen, H.J., 2005. Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Rev. Genet.* 6, 167–178. <https://doi.org/10.1038/nrg1553>
- Vignaud, A., Ferry, A., Hugué, A., Baraibar, M., Trollet, C., Hyzewicz, J., Butler-Browne, G., Puymirat, J., Gourdon, G., Furling, D., 2010. Progressive skeletal muscle weakness in transgenic mice expressing CTG expansions is associated with the

- activation of the ubiquitin-proteasome pathway. *Neuromuscul Disord* 20, 319–325. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2010.03.006>
- Vihola, A., Bachinski, L.L., Sirito, M., Olufemi, S.-E., Hajibashi, S., Baggerly, K.A., Raheem, O., Haapasalo, H., Suominen, T., Holmlund-Hampf, J., Paetau, A., Cardani, R., Meola, G., Kalimo, H., Edström, L., Krahe, R., Udd, B., 2010. Differences in aberrant expression and splicing of sarcomeric proteins in the myotonic dystrophies DM1 and DM2. *Acta Neuropathol* 119, 465–479. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0637-6>
- Vlasova, I.A., Tahoe, N.M., Fan, D., Larsson, O., Rattenbacher, B., Sternjohn, J.R., Vasdewani, J., Karypis, G., Reilly, C.S., Bitterman, P.B., Bohjanen, P.R., 2008. Conserved GU-rich elements mediate mRNA decay by binding to CUG-binding protein 1. *Mol. Cell* 29, 263–270. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.024>
- Wahbi, K., Algalarrondo, V., Bécane, H.M., Fressart, V., Beldjord, C., Azibi, K., Lazarus, A., Berber, N., Radvanyi-Hoffman, H., Stojkovic, T., Béhin, A., Laforêt, P., Eymard, B., Hatem, S., Duboc, D., 2013. Brugada syndrome and abnormal splicing of SCN5A in myotonic dystrophy type 1. *Arch Cardiovasc Dis* 106, 635–643. <https://doi.org/10.1016/j.acvd.2013.08.003>
- Wahbi, K., Porcher, R., Laforêt, P., Fayssoil, A., Bécane, H.M., Lazarus, A., Sochala, M., Stojkovic, T., Béhin, A., Leonard-Louis, S., Arnaud, P., Furling, D., Probst, V., Babuty, D., Pellieux, S., Clementy, N., Bassez, G., Péréon, Y., Eymard, B., Duboc, D., 2018. Development and Validation of a New Scoring System to Predict Survival in Patients With Myotonic Dystrophy Type 1. *JAMA Neurol* 75, 573–581. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2017.4778>
- Wakimoto, H., Maguire, C.T., Sherwood, M.C., Vargas, M.M., Sarkar, P.S., Han, J., Reddy, S., Berul, C.I., 2002. Characterization of cardiac conduction system abnormalities in mice with targeted disruption of Six5 gene. *J Interv Card Electrophysiol* 7, 127–135.
- Wang, G.-S., Kearney, D.L., De Biasi, M., Taffet, G., Cooper, T.A., 2007. Elevation of RNA-binding protein CUGBP1 is an early event in an inducible heart-specific mouse model of myotonic dystrophy. *J Clin Invest* 117, 2802–2811. <https://doi.org/10.1172/JCI32308>
- Wang, G.-S., Kuyumcu-Martinez, M.N., Sarma, S., Mathur, N., Wehrens, X.H.T., Cooper, T.A., 2009. PKC inhibition ameliorates the cardiac phenotype in a mouse model of myotonic dystrophy type 1. *J Clin Invest* 119, 3797–3806. <https://doi.org/10.1172/JCI37976>
- Wang, Y.H., Amirhaeri, S., Kang, S., Wells, R.D., Griffith, J.D., 1994. Preferential nucleosome assembly at DNA triplet repeats from the myotonic dystrophy gene. *Science* 265, 669–671.
- Ward, A.J., Rimer, M., Killian, J.M., Dowling, J.J., Cooper, T.A., 2010. CUGBP1 overexpression in mouse skeletal muscle reproduces features of myotonic dystrophy type 1. *Hum. Mol. Genet.* 19, 3614–3622. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq277>
- Warf, M.B., Diegel, J.V., von Hippel, P.H., Berglund, J.A., 2009. The protein factors MBNL1 and U2AF65 bind alternative RNA structures to regulate splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 9203–9208. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900342106>
- Wei, Y., Peng, S., Wu, M., Sachidanandam, R., Tu, Z., Zhang, S., Falce, C., Sobie, E.A., Lebeche, D., Zhao, Y., 2014. Multifaceted roles of miR-1 s in repressing the fetal gene program in the heart. *Cell Research* 24, 278–292. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.12>
- Weninger, S., Cumming, S.A., Gutschmidt, K., Okkersen, K., Jimenez-Moreno, A.C., Daidj, F., Lochmüller, H., Hogarth, F., Knoop, H., Bassez, G., Monckton, D.G., Engelen, B.G.M. van, Schoser, B., 2021. Associations Between Variant Repeat Interruptions

- and Clinical Outcomes in Myotonic Dystrophy Type 1. *Neurology Genetics* 7. <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000572>
- Westerlaken, J.H.A.M., Van der Zee, C.E.E.M., Peters, W., Wieringa, B., 2003. The DMWD protein from the myotonic dystrophy (DM1) gene region is developmentally regulated and is present most prominently in synapse-dense brain areas. *Brain Res.* 971, 116–127.
- Whiting, E.J., Waring, J.D., Tamai, K., Somerville, M.J., Hincke, M., Staines, W.A., Ikeda, J.E., Korneluk, R.G., 1995. Characterization of myotonic dystrophy kinase (DMK) protein in human and rodent muscle and central nervous tissue. *Hum. Mol. Genet.* 4, 1063–1072.
- Winchester, C.L., Ferrier, R.K., Sermoni, A., Clark, B.J., Johnson, K.J., 1999. Characterization of the Expression of DMPK and SIX5 in the Human Eye and Implications for Pathogenesis in Myotonic Dystrophy. *Human Molecular Genetics* 8, 481–492. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.3.481>
- Wu, X., Golden, K., Bodmer, R., 1995. Heart Development in *Drosophila* Requires the Segment Polarity Gene *wingless*. *Developmental Biology* 169, 619–628. <https://doi.org/10.1006/dbio.1995.1174>
- Yadava, R.S., Frenzel-McCardell, C.D., Yu, Q., Srinivasan, V., Tucker, A.L., Puymirat, J., Thornton, C.A., Prall, O.W., Harvey, R.P., Mahadevan, M.S., 2008. RNA toxicity in myotonic muscular dystrophy induces NKX2-5 expression. *Nat Genet* 40, 61–68. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.28>
- Yamashita, Y., Matsuura, T., Shinmi, J., Amakusa, Y., Masuda, A., Ito, M., Kinoshita, M., Furuya, H., Abe, K., Ibi, T., Sahashi, K., Ohno, K., 2012. Four parameters increase the sensitivity and specificity of the exon array analysis and disclose 25 novel aberrantly spliced exons in myotonic dystrophy. *J Hum Genet* 57, 368–374. <https://doi.org/10.1038/jhg.2012.37>
- Yang, Y., Mahaffey, C.L., Bérubé, N., Maddatu, T.P., Cox, G.A., Frankel, W.N., 2007. Complex seizure disorder caused by *Bruno14* deficiency in mice. *PLoS Genet.* 3, e124. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030124>
- Ylikärppä, R., Eklund, L., Sormunen, R., Muona, A., Fukai, N., Olsen, B.R., Pihlajaniemi, T., 2003. Double knockout mice reveal a lack of major functional compensation between collagens XV and XVIII. *Matrix Biology* 22, 443–448. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(03\)00074-X](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(03)00074-X)
- Yotova, V., Labuda, D., Zietkiewicz, E., Gehl, D., Lovell, A., Lefebvre, J.-F., Bourgeois, S., Lemieux-Blanchard, É., Labuda, M., Vézina, H., Houde, L., Tremblay, M., Toupance, B., Heyer, E., Hudson, T.J., Laberge, C., 2005. Anatomy of a founder effect: myotonic dystrophy in Northeastern Quebec. *Hum Genet* 117, 177–187. <https://doi.org/10.1007/s00439-005-1298-8>
- Yu, Z., Teng, X., Bonini, N.M., 2011. Triplet Repeat-Derived siRNAs Enhance RNA-Mediated Toxicity in a *Drosophila* Model for Myotonic Dystrophy. *PLOS Genetics* 7, e1001340. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001340>
- Zhao, J., Mommersteeg, M.T.M., 2018. Slit–Robo signalling in heart development. *Cardiovascular Research* 114, 794–804. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy061>
- Zhao, Y., Samal, E., Srivastava, D., 2005. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets *Hand2* during cardiogenesis. *Nature* 436, 214. <https://doi.org/10.1038/nature03817>
- Zhu, J.-Y., Heidersbach, A., Kathiriya, I.S., Garay, B.I., Ivey, K.N., Srivastava, D., Han, Z., King, I.N., 2017. The E3 ubiquitin ligase *Nedd4/Nedd4L* is directly regulated by microRNA 1. *Development* 144, 866–875. <https://doi.org/10.1242/dev.140368>

- Zikova, M., Ponte, J.-P.D., Dastugue, B., Jagla, K., 2003. Patterning of the cardiac outflow region in *Drosophila*. PNAS 100, 12189–12194. <https://doi.org/10.1073/pnas.2133156100>
- Zmojdian, M., Ponte, J.P.D., Jagla, K., 2008. Cellular components and signals required for the cardiac outflow tract assembly in *Drosophila*. PNAS 105, 2475–2480. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706402105>

# Annexes



Review

# Dissecting Pathogenetic Mechanisms and Therapeutic Strategies in *Drosophila* Models of Myotonic Dystrophy Type 1

Anissa Souidi, Monika Zmojdzian and Krzysztof Jagla \*

GRoD, INSERM U1103, CNRS, UMR6293, University of Clermont Auvergne, 28 Place Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand, France; anissa.souidi@uca.fr (A.S.); monika.zmojdzian@uca.fr (M.Z.)

\* Correspondence: christophe.jagla@uca.fr; Tel.: +33-0-473178181

Received: 11 November 2018; Accepted: 13 December 2018; Published: 18 December 2018



**Abstract:** Myotonic dystrophy type 1 (DM1), the most common cause of adult-onset muscular dystrophy, is autosomal dominant, multisystemic disease with characteristic symptoms including myotonia, heart defects, cataracts and testicular atrophy. DM1 disease is being successfully modelled in *Drosophila* allowing to identify and validate new pathogenetic mechanisms and potential therapeutic strategies. Here we provide an overview of insights gained from fruit fly DM1 models, either: (i) fundamental with particular focus on newly identified gene deregulations and their link with DM1 symptoms; or (ii) applied via genetic modifiers and drug screens to identify promising therapeutic targets.

**Keywords:** DM1; muscular dystrophy; animal model; *Drosophila*; drug screen; genetic screen; therapeutic targets

## 1. Introduction

Myotonic dystrophy type 1 (DM1, OMIM #160900), also called Steinert myotonic dystrophy, is the most common muscular dystrophy in adults, with a worldwide incidence of 1/8000 [1]. DM1 is an autosomal dominant multisystemic disease with characteristic symptoms including myotonia (inability of muscles to relax after contraction), muscular dystrophy with progressive muscle weakness, heart defects, cataracts and testicular atrophy. The genetic basis for DM1 is an expanded CTG repeat in the 3'-untranslated region of the *dystrophia myotonica protein kinase* (*DMPK*) gene, which maps to 19q13.3 [2] and encodes a putative serine/threonine protein kinase. Healthy individuals have between 5 and 37 CTG repeats, whereas the DM1-affected population carries expansions from 50 up to 4000 CTGs [1]. Longer repeat lengths correlate with early onset and increased severity of the disease [3]. There are four main categories of DM1 phenotypes dependent of CTG repeat size: congenital, childhood-onset, adult-onset and late-onset/asymptomatic [3]. Congenital form (CDM1) with more than 1000 CTG repeats, is characterized by severe neonatal hypotonia, intellectual disability and facial diplegia that appear from birth [4]. Cardiac involvement with conduction abnormalities and arrhythmia, as well as respiratory failure, are common in CDM1 and are often fatal [5]. Childhood-onset form (50–1000 CTG repeats) appear between 1 and 10 years and involves weakness in muscles of lower legs, hands, neck, face and myotonia of muscles of the tongue and forearm. Conduction defects are also commonly involved. Finally, adult onset DM1 is apparent between 10–20 years, leading to muscle weakness, myotonia, cataracts, respiratory disturbance but also to a large set of cardiac involvements including conduction abnormality, mitral valve prolapse [6] but also alterations in ventricular diastolic function [7], abnormal ventricular late potentials [8] and arrhythmias that are positively correlated with size of CTGs [9]. In addition, DM1 patients with missplicing of *insulin receptor* (*IR*) gene present

insulin resistance and mild type-2 diabetes [10]. Late onset DM1 is detected in 30–70 years old patients carrying 50–100 CTGs and is characterized by mild myotonia and cataracts whereas individuals with 38–49 CTG repeats, are in general asymptomatic.

In DM1 patients, CTG repeats are unstable and show size variation in different tissue and cell types causing somatic mosaicism. In post-mortem tissues from an adult patient, (CTG)<sub>n</sub> expansions in brain, skeletal muscle, cardiac muscle, testes and liver were all greater than in leukocytes [11]. In addition, the size of the CTG repeats appears to increase over time in the same individual and across generations, with increasing severity of the disease. Children may thus inherit considerably longer repeat lengths than those initially present in the transmitting parent. This phenomenon is known as genetic anticipation, in which disease severity increases and/or age of onset of disease decreases from one generation to the next [12]. However, CTG repeat size does not always increase in successive generations of DM1 families. Intergenerational contraction of CTG repeats also occurs in about 6.4% of transmissions, most frequently in paternal transmission (10%) [13].

To characterize molecular defects underlying DM1 pathogenesis, different vertebrate and invertebrate animal models have been successfully generated. Interestingly, *Drosophila* has been shown to mimic DM1 phenotypes. This review describes how the simple *Drosophila* model has helped us understand the complex molecular mechanisms underlying DM1 and test and identify therapeutic strategies to ameliorate the DM1 phenotype.

## 2. DM1 Pathogenesis

Essentially three models have been proposed to account for the genetic inheritance and molecular characteristics of DM1. However, given the complexity of the disorder, all three mechanisms may contribute to the DM1 phenotype, as explained below.

According to the first DM1 pathogenesis model, CTG expansion affects the level of *DMPK* expression in cis by altering its transcription or by the retention of CUG expanded transcripts, which may lead to haploinsufficiency. Decreased levels of the *DMPK* mRNA and protein were found associated with the adult form of DM1 [14]. However, *DMPK*<sup>−/−</sup> mutant mice show only minor size changes in head and neck muscle fibres at older age and do not develop other DM1 symptoms including the fibre-type dependent atrophy, myotonia, cataract and mal-infertility. Reduced *DMPK* expression is therefore not the only condition for development of DM1 [15].

In the second model, the CTG triplet expansion may alter chromatin structure and induce repression of *DMPK* neighbouring genes. The CTG expansion in the *DMPK* 3'UTR is located immediately upstream of the *SIX homeobox 5* (*SIX5*) promoter region and was shown to lower *SIX5* expression [16]. The *SIX5* gene encodes a homeodomain transcription factor involved in distal limb muscle development in mice [17] and its *Drosophila* ortholog is essential for eye development in the fly. *Six5*<sup>−/−</sup> mutant mice developed ocular cataracts and infertility but no apparent abnormalities of skeletal muscle function and failed to reproduce most of the symptoms of DM1 patients [18].

Finally, in the third model, repeat expansions, once transcribed into RNA, exert a gain-of-function toxic effect in the cells. This hypothesis is supported by the fact that the transgenic mice expressing expanded, noncoding CUG repeats under the control of the human skeletal actin promoter develop myotonia, a classical DM1 feature. Muscle histology of these mice also shows central nuclei, ringed muscle fibres and variability in fibre size similar to the histological features observed in DM1 patients. Thus toxic CTG repeats could cause DM1 phenotypes independently of reduced levels of *DMPK* [19]. Pathogenic features of transcripts carrying expanded CUG repeats rely on the formation of secondary structures with a hairpin shape that are retained in nuclear foci observed in both cultured cells [20] and in biopsy tissues from DM1 patients [21]. These nuclear foci sequester RNA-binding proteins such as muscleblind-like 1 (MBNL1) [22]. Consequently, the activity of MBNL1 as a splicing regulator is impaired, resulting in aberrant alternative splicing of its target genes [23]. Double-stranded RNA structures also abnormally activate the RNA-dependent protein kinase R (PKR),

which hyper-phosphorylates another splicing factor, CUGBP Elav-Like Factor 1 (CELF1) resulting in its stabilization and increased splicing activity in DM1 skeletal muscle and heart tissues [24].

Interestingly, MBNL1 and CELF1 play antagonistic roles. During development, the CELF proteins promote the inclusion of specific foetal exons in embryonic and neonatal tissues, whereas postnatal activation of MBNL leads to foetal exon skipping and expression of adult protein isoforms [25]. To ensure these specific functions, during heart development, CELF proteins are down-regulated more than 10-fold and MBNL1 protein is concomitantly up-regulated nearly 4-fold. This MBNL1/CELF1 balance is then reversed in adulthood. Using transgenic mice, it was demonstrated that reproducing the embryonic expression patterns for CELF1 and MBNL1 in adult heart induced the embryonic splicing patterns for more than half of the developmentally regulated alternative splicing transitions [26]. Remarkably, such a reversed, embryonic-like MBNL1/CELF1 ratio is found in the DM1 context, leading to the mis-splicing and abnormal expression of foetal isoforms of several genes in adult tissues.

The important role that MBNL1 plays in DM1 is supported by the *Mbnl1* knockout mice phenotypes, which show several DM1 features including misregulated mRNA splicing, histopathological muscle changes, cataracts and myotonia [27]. Consistently, overexpression of *Mbnl1* in skeletal muscle of the poly(CUG) mouse DM1 model rescues the myotonia phenotype concurrently with a restoration of the normal adult-splicing patterns [28]. The capacity of *Mbnl1* to rescue the main DM1 symptoms is also observed in the *Drosophila* DM1 model, where cardiac overexpression of Muscleblind (*Mbl*), the *Drosophila* *Mbnl1* ortholog, is sufficient to rescue the heart dysfunctions and reduced survival of DM1 flies [29].

The RNA-binding factor CELF1 is another key component in the development of the DM1 phenotype. CELF1 protein localizes mainly to the nuclei where it acts as a splice regulator but can also be detected in the cytoplasm. It binds to the GU-rich element (GRE) and mediates GRE-dependent mRNA decay, which regulates the expression of a large subset of human transcripts [30]. CELF1 can also act as a deadenylation factor. It has been suggested that in the DM1 context, the expanded CUG repeats can affect the activity of CELF1, leading to a trans-dominant effect on RNA processing [31]. It has also been demonstrated that unlike MBNL1, the CELF1 down-regulation was not sufficient to rescue mis-splicing in the DM1 mouse model, although deterioration of muscle function was prevented and muscle histopathology improved [32].

### 3. *Drosophila* Could Serve as a Model Organism for DM1

*Drosophila melanogaster* has long been recognized as one of the most powerful genetic systems for analysing the function of human disease genes. Comparison of human genes associated with at least one mutant allele in the Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) database against the genome sequence of *D. melanogaster* revealed that 714 distinct human disease genes (77% of disease genes searched for) matched 548 unique *Drosophila* sequences [33]. Furthermore, sequencing of the *Drosophila* and the human genomes revealed remarkably high similarities between the fly and humans [34]. Most importantly, molecular pathways required for the development and cell biology have been highly conserved since the evolutionary divergence of flies and humans. This finding has made *Drosophila* a model system well-suited to addressing molecular mechanisms of human pathologies including those, like DM1, that affect skeletal and cardiac muscles.

Several fly models of DM1 have been generated and applied to unravel mechanisms underlying expanded CUG repeat toxicity. The first model consisted of expressing 11, 48, 56 or 162 pure CTG repeats in the context of the 3'UTR of a *Green Fluorescent Protein* (*GFP*) reporter gene. Only in muscle cells expressing 162 CTGs were discrete ribonuclear foci co-localizing with *Mbl* detected without obvious locomotor activity perturbation, muscle defects or reduced lifespan of the animals [35], suggesting that repeat expansion was insufficient. Shortly afterwards, De Haro and co-workers examined the effect of an increased repeat number using 480 interrupted CTG repeats expressed in adult muscles or the eye. *Drosophila* DM1 models developed age-dependent degenerative phenotypes in muscle or eye tissue and showed accumulation of repeat carrying transcripts in nuclear foci

co-localizing with Mbl, like in muscles of DM1 patients [36]. Similar transgenic flies, expressing 480 interrupted repeats, were generated by Garcia-Lopez and co-workers. They demonstrated that CUG<sub>480</sub>-expressing flies reproduced, additional to degenerative phenotypes, a splicing misregulation and central nervous system alterations. Interestingly, the degenerative phenotype was dependent on the CUG tract length [37]. Recently, a series of fly models was generated with a non-coding, uninterrupted CTG repeat expansion of 19, 130, 200, 230, 250 and 270 in length into the 3'UTR of the *DsRed* gene. As demonstrated in previous study, the CTG-toxicity was detected in flies expressing 200 repeats or more, suggesting that the severity of phenotypes in *Drosophila* DM1 models is positively correlated with the size of the CTG repeats, similar to what has been observed in DM1 patients. Interestingly, the co-expression of CTG with expanded CAG repeat transcripts leading to generation of triplet repeat-derived siRNAs that enhance CTG toxicity [38].

As DM1 affects several organs including the heart, *Drosophila* has also been applied to generate a cardiac DM1 model. As evidence that *Drosophila* could be used for modelling human heart disorders, Cammarato and co-workers report that 73% of fly survival genes have human and/or mouse orthologs with critical heart functions and that 40% of them are associated with cardiac disorders including cardiomyopathy, myocardial infarct, cardiac arrest and heart failure. For example, *Cathepsin B1* (*CtsB1*) gene is conserved between *Drosophila* and human (*cathepsin B*) and is associated to cardiac arrest [39].

The heart of *Drosophila* (or dorsal vessel) is formed, like in vertebrates, during early stages of embryogenesis from cardiac mesoderm. Importantly, several factors necessary for cardiac development in humans such as *Nkx2.5* and *Hand* have *Drosophila* orthologs (*Tinman*, *Tin*) [40], (*dHand*) [41] exerting conserved cardiogenic functions. Moreover, the main signalling pathways and genes ensuring cardiac function are also highly conserved [42] and operating in the *Drosophila* heart. As oxygen distribution in *Drosophila* is heart-independent and ensured by tracheal system, the fruit fly heart represents an attractive model system for studying severe pathological conditions such as cardiac arrest, which does not lead to death in the fly.

The main cardiac dysfunctions associated with DM1 correspond to conduction defects [43] with potentially fatal ventricular and/or atrial arrhythmias [44] and mechanical diastolic and/or systolic dysfunction that can lead to combined systolic and diastolic heart failure [45]. Importantly, *Drosophila* DM1 models have reproduced all these cardiac disorders [46,47].

In addition to DM1, *Drosophila* has also been used to better understand molecular pathways associated with myotonic dystrophy type 2 (DM2), the second type of myotonic dystrophy. Similar to DM1, DM2 is caused by unstable, noncoding repeat expansions (CCTG)<sub>n</sub> in *CNBP* gene encoding a CCHC-type zinc finger protein. The CCTG repeat containing transcripts, like those carrying CTG repeats, sequester RNA binding proteins including MBNL1. Recently, Yenigun and co-workers generated transgenic flies expressing 106 CCUG repeats in muscle. These flies exhibit RNA foci formation and aberrant splicing of MBNL1-dependant transcripts such as *Fhos* and *TNNT2* [48] making them well adapted for studying DM2.

#### 4. Identification of New Mechanisms Underlying DM1 Using *Drosophila* Models

Several splicing defaults and transcriptional alterations have been described in DM1 patients and in different DM1 models including *Drosophila*. In adult DM1 flies expressing 480 CTGs, among genes involved in muscle development *Z band alternatively spliced PDZ-motif protein 52* (*Zasp52*), ortholog of *LDB3* in human, encoding a Z-band component was found aberrantly spliced [37] and could contribute to the disorganization of the sarcomere and Z-band disruption, also reported in DM1 patients [38]. In addition to *Zasp52*, the *troponin T* encoding another sarcomeric protein that controls the calcium-mediated interaction between actin and myosin [49] as also mis-spliced in the *Drosophila* DM1 model [37]. The aberrant splicing of *troponin T* ortholog *cardiac troponin T* (*cTNT*) is detected in DM1 patients [50] and thus appears to be an evolutionarily conserved mis-splicing event underlying DM1 pathogenesis. Interestingly, expression of abnormal splice isoforms of sarcomere components in DM1 context is consistent with the affected sarcomeric apparatus in partially paralyzed Mbl mutant

larvae [51], suggesting that Mbl could be responsible for these mis-splicing events. The alternative splicing defects are not the only mechanisms underlying DM1-associated alterations of gene expression, it was demonstrated that nuclear accumulation of toxic CUG repeats could also affect gene expression independently of splicing [52]. In this study performed in our group, several new inducible *Drosophila* DM1 lines with an increasing number of noncoding CTG repeats (240, 480, 600, 960) were generated and analysed for their pathogenic potential in larval somatic muscles [52]. Data generated from this model confirmed that the *Drosophila* larva could be used for assessing DM1 phenotypes and underlying gene deregulations. In addition to nuclear foci formation and Mbl sequestration, the DM1 larval muscles recapitulated the major DM1 symptoms in a repeat-size dependent manner. These phenotypes included muscle hypercontraction, splitting of muscle fibres, reduced fibre size or myoblast fusion defects [52].

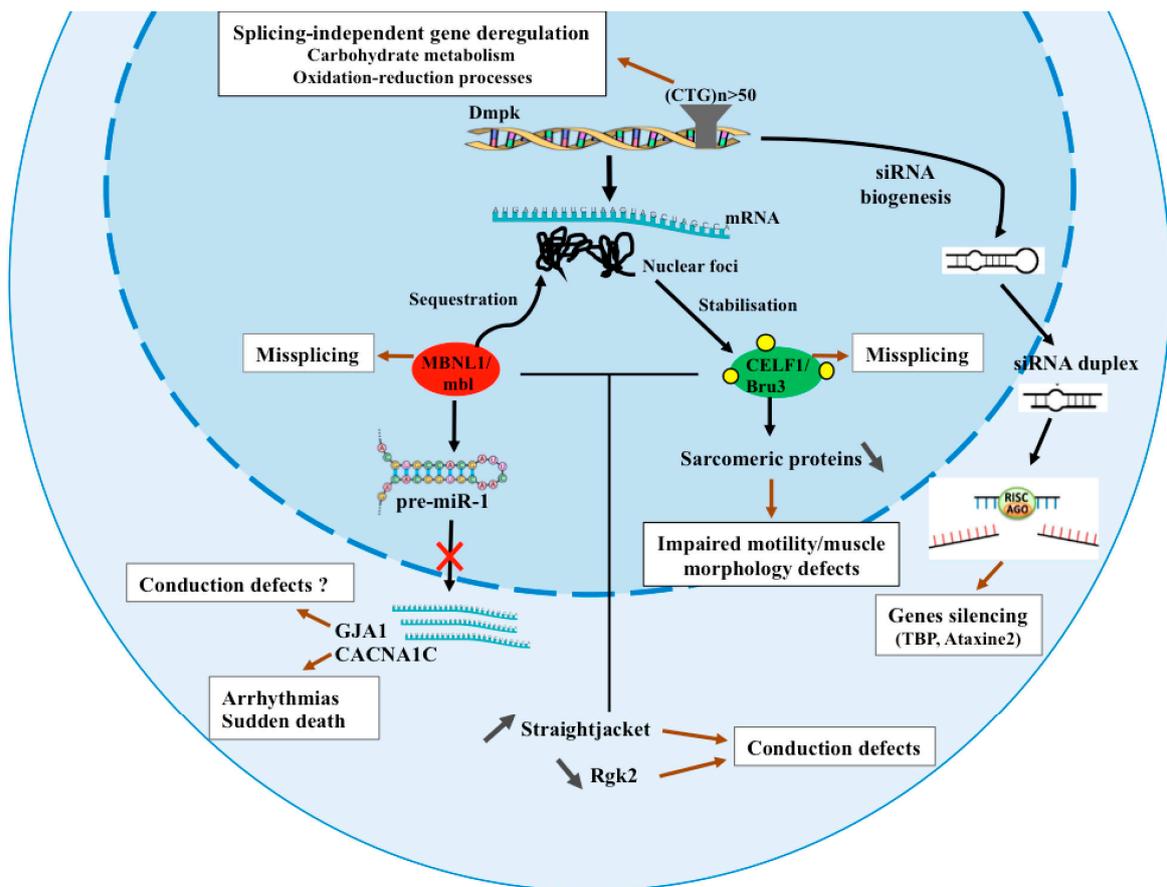
Using this model, several splice-independent deregulated genes were identified. Among candidates specifically down-regulated by CTG repeats are genes involved in metabolic processes (Figure 1), in particular in carbohydrate metabolism *amylase distal* (*Amy-d*), *amylase proximal* (*Amy-p*), *CG32444*, *CG9466* and *CG9468* and oxidation-reduction processes (*Cyp6a18*, *Cyp6w1*, *Cyp304a1* and *CG2065*) [52]. However, the link between deregulation of these genes and the DM1 phenotype remains to be determined.

Other mechanisms have been described as associated with DM1 phenotypes. These include the formation of siRNA [38] and microRNA (miRNA) deregulation [53]. The *DMPK* gene displays bi-directional transcription, generating anti-sense CAG repeat transcripts in addition to the CTG transcripts. It was shown that the co-expression of CUG together with CAG bearing repeat transcripts induced the enhancement of CTG-toxicity in the fly and was due to the biogenesis of small RNAs. These siRNAs targeted the expression of genes such as *Ataxin-2* (*ATXN2*) and *TATA binding protein* (*TBP*), which bear long CAG repeats in both the fly and humans (Figure 1) [38].

The involvement of miRNAs in DM1 is well studied. Based on biopsy analysis from DM1 patient samples, numerous miRNAs, conserved between *Drosophila* and human, were found deregulated. These include *miR-1*, *miR-7* and *miR-10*, which are down-regulated in both DM1 *Drosophila* models and in DM1 patients. Interestingly, Garcia-Lopez and co-workers demonstrated that the reduced level of *miR-1* in DM1 hearts was due to a lower MBNL1 level and its incapacity to drive *miR-1* maturation [53]. In physiological context MBNL1 binds to a UGC motif located within the loop of *pre-miR-1* and competes for the binding with LIN28. LIN28 promotes *pre-miR-1* uridylation by terminal uridylyltransferase 4 (TUT4) and blocks Dicer processing. However, in DM1 context, MBNL1 is sequestered by CUG repeats in nuclear foci, this enables LIN28 to bind into *pre-miR-1* leading to its uridylation down-regulate its processing. As a consequence, reduction of *miR-1* levels leads to an increased expression of *gap junction protein alpha 1* (*GJA1*) and *calcium voltage-gated channel subunit alpha 1 C* (*CACNA1C*) in DM1 affected hearts [54].

*CACNA1C* encodes the main calcium channel in heart tissue and its gain-of-function mutations result in arrhythmias and sudden death [55]. *GJA1* encodes the gap-junction channels in the heart and is responsible for intracardiomyocyte conductance. This finding suggests that *CACNA1C* and *GJA1* up-regulation may contribute to the cardiac dysfunctions observed in DM1 patients (Figure 1). The reduced level of *miR-7* is the result of the down-regulation of its pre-miRNA precursor [53]. The link between *miR-7* and DM1 remains to be addressed, but the fact that *miR-7* was down-regulated in patients with end-stage dilated cardiomyopathy (DCM) [56] suggests it could contribute to cardiac DM1 defects.

In addition, it was found that *miR-7a/b* down-regulation is associated to myocardial infarction (MI), injuries and cardiomyocyte apoptosis. Thus, this down regulation promotes overexpression of important genes that are involved in cell apoptosis such as *poly(ADP-ribose) polymerase* (*PARP*) [57] and *specificity protein 1* (*SP1*) [58].



**Figure 1.** Molecular mechanisms underlying DM1 pathology identified in *Drosophila*. DM1 is caused by microsatellite repeat expansions ( $n > 50$  CTG repeats) in 3'UTR region of *DMPK* gene. Mutant *DMPK* transcripts are retained in the nucleus and form nuclear foci that sequester MBNL1/Mbl and stabilize CELF1/Bru3 proteins leading to missplicing. Bru3 stabilization also induces down-regulation of sarcomeric proteins associated with impaired motility and muscle morphology defects [59], whereas loss of MBNL1/Mbl blocks *pre miR-1* processing [53] leading to up regulation of its target genes such as *GJA1* and *CACNA1C* suggested as associated with conduction defects and arrhythmias/sudden death, respectively [45]. Both Bru3 stabilization and Mbl sequestration induce up regulation of *Stj* and down regulation of *Rgk2* expression associated with conduction defects [47]. CTG repeats could be transcribed in both directions leading to CAGn–CUGn double stranded complexes and formation of siRNA duplex that interact with RISC complex to target the expression of genes containing CAG repeats, such as *Ataxin-2* (*ATXN2*) and *TATA binding protein* (*TBP*) [38]. Long CTG repeats induce down regulation of genes in a splicing independent manner including genes involved in carbohydrate metabolism and oxidation-reduction processes [52].

MBNL1 sequestration and CELF1 accumulation were the first and now the most thoroughly studied mechanisms of DM1 pathogenesis, but the specific contribution of CELF1 to DM1-associated phenotypes has not yet been entirely elucidated. Recent work by our group [59] using *Drosophila* as a model revealed new functions of the fly CELF1 counterpart, Bruno-3 (Bru-3) and its contribution to the DM1 phenotype. Our data demonstrate that the increased level of Bru-3 in muscles contribute to impaired larva motility and muscle morphology defects in DM1. Genome-wide transcriptional profiling of Bru-3 overexpressing larvae has led to identification of a set of 11 genes encoding conserved sarcomeric components whose expression is down-regulated (Figure 1). These include  $\alpha$ -Actinin (*Actn*), *Myosin heavy and light chains* (*Mhc*, *Mlc1* and *Mlc2*), *Tropomyosin 1* and *2* (*Tm1* and *Tm2*), *Troponin I* (*wupA*) and *C47D* (*TpnC47D*), *bent*, *Paramyosin* (*Prm*), *Zasp52* and *Unc-89* [59]. Interestingly, as demonstrated

for *Actn*, the down-regulation of sarcomeric genes involves the cytoplasmic Bru-3 function and its potential role in co-translational mRNA decay [59].

Another recent study reporting transcriptional profiling of the cardiac DM1 models [59] revealed that the inhibition of *mbl* or overexpression of Bru-3 specifically in the fly heart, that mimic the pathogenic MBNL1/CELF1 misbalance in DM1 patient, induce asynchronous heartbeat and cardiac arrhythmia (Figure 1). The data analysis revealed that the cardiac disorders observed in these DM1 models are the result of deregulation of genes involved in cellular calcium level and cardiac conduction. Among them are: *inactivation no afterpotential D (inaD)*, *syntrophin-like 1 (syn1)*, *Rad*, *Gem/Kir family member 2 (Rgk2)* and *straightjacket (stj)*, all conserved in humans [47]. In particular, increased expression of *stj*, ortholog of *CACNA2D3* in human, which encodes a regulatory subunit of a voltage-gated calcium channel *CACNA1C/Cav1.2* was found to influence cardiac contractions. Up-regulation of *stj* leads to increased  $Ca^{2+}$  inward current, which induces asynchronous heart beating and mimics conduction defect phenotypes observed in DM1 contexts. Interestingly, reducing the expression of *stj* in cardiomyocytes of DM1 flies ameliorates asynchronous heart beating [47] strongly suggesting a novel pathogenic mechanism underlying conduction disturbances in DM1. This is supported by the overexpression of *CACNA2D3* observed in human cardiac tissue from DM1 patients [47].

## 5. Discovering Potential Gene and Drug-Based Therapeutic Strategies Using Fly DM1 Models

In addition to its role in dissecting molecular mechanisms underlying DM1 pathogenesis, the *Drosophila* model also appears well-suited to testing gene- and drug-based therapeutic strategies. Garcia-Lopez and co-workers performed a genetic screen in their fly DM1 model to identify genetic modifiers of the rough eye phenotype, generated by eye-targeted expression of toxic CUG repeats (480 interrupted CTGs). This led to the identification of six suppressor: *cap-n-collar (cnc)*, *Nucleosome remodelling factor-38kD (Nurf-38)*, *fear-of-intimacy (foi)*, *Coronins (coro)*, *C-Src Kinase (csk)* and *spinster (spin)*; and three enhancer genes: *seven up (svp)*, *Viking (vkg)* and *CG4589* (Table 1) [37] of CTG-toxicity.

The capacity of these genes to modify DM1 phenotypes remain to be validated by testing their effects into DM1 vertebrate models. Another screen for suppressors of CUG-induced myopathy [60] identified *smaug (smg)*, which was shown to prevent muscle wasting and restore muscle function when overexpressed in *Drosophila* (Table 1). Interestingly, increased levels of human SMAUG1 have an ability to correct the abnormally high nuclear accumulation of CELF1 in myoblasts from DM1 patients and restore its translational activity [60].

Aberrantly activated apoptosis and autophagy pathways appear to be involved in muscle-loss phenotype in DM1 [61]. Genes that negatively regulate apoptosis and autophagy are down-regulated in skeletal muscle biopsies from DM1 patients, whereas autophagy-related genes such as *Atg4*, *Atg7* and *Atg12* were significantly up-regulated in fly muscles expressing CTG repeats [61], similar to what has been observed in DM2 *Drosophila* model expressing CCUG [62]. Based on these findings, Bargiela and co-workers tested the effects of inhibition of apoptosis or autophagy pathways on DM1 flies expressing 480 interrupted CTG repeats. This fly model presented muscle size reduction associated to muscle atrophy and wasting. These phenotypes were rescued by overexpression of *Drosophila* inhibitor of apoptosis 1 (DIAP1) or by reducing autophagy via overexpression of *mbl* and mTOR. Silencing of autophagy regulatory genes also led to rescue the muscle loss phenotype [61].

Cerro-Herreros and co-workers applied another strategy dedicated to boost *Mbl* expression in the DM1 context by using sponge constructs against *dme-miR-277* and *dme-miR-304*. These two *Drosophila* miRNAs negatively regulate *Mbl* transcript levels, so that their silencing allowed an increased *Mbl* expression. The inhibition *dme-miR-277* led to reduced muscle atrophy, rescued motor function and extended the lifespan of DM1 flies. In addition, the inhibition of *dme-miR-304* rescues the missplicing of *CyP6W1*, *Fhos* and *Serca1* transcripts [63].

In addition to genetic modifiers, *in vitro* and *in vivo* efforts using chemical compounds have been tested to rescue DM1 phenotypes. Attempts have been made to target each step of the pathogenesis, but the most promising therapeutic strategies have been focused on bioactive molecules that bind to

the toxic RNA target preventing its interaction with MBNL1 protein. Distinct small molecules have been found to impair the MBNL1-CUGexp complex and thus improve DM1 phenotypes [37,64,65]. In *Drosophila*, initial drug screening performed by Garcia-Lopez et al. (2008) led to the selection of ten drugs acting as suppressors of CUG-mediated neuronal toxicity. Most of these substances are inhibitors of neuronal excitation, monoamine uptake or substances that affect sodium and calcium metabolism (Table 1) [37]. Another screen was designed in order to develop therapeutic strategy that reduce the CUG-RNA hairpin formation and rescue a semi-lethal pupal phenotype induced by brain-targeted expression of 480 CUG repeats [66]. The screen identified the D-amino acid hexapeptide (ABP1) compound that is able to bind to CUG repeats, block their interaction with RNA binding proteins, leading to suppression of CUG-induced lethality and muscle degeneration. *In vitro* analysis demonstrated that ABP1 binds to CUG repeats with a high affinity and transforms double-stranded CUG RNA to single-stranded conformation, thus reducing CUG-RNA foci formation and Mbl aggregation. Importantly, the treatment of DM1 mouse model (expressing 250 CTG in the 3'UTR of the human skeletal actin open reading frame) by ABP1 rescues missplicing and improves muscle histopathology (Table 1). The conservation of the effect of ABP1 as a suppressor of RNA toxicity in both *Drosophila* and mouse DM1 models [66] suggests it could be tested to treat DM1 patients.

More recently, Ligand 3, a new compound, has been reported as an alternative treatment strategy to reduce toxic foci formation (Table 1) [67]. This Ligand 3 is able to bind three consecutive CUG repeats instead of only one. *In vitro* and *in vivo* experiments confirmed its ability to reduce ribonuclear foci and partially rescue misregulated splicing of *cardiac troponin T (cTNT)* and *insulin receptor (IR)*, two preRNAs mis-spliced in the DM1 context. More significantly, Ligand 3 partially rescued the degenerative phenotypes of DM1 flies [67]. Ligand 3 was later combined into a new bivalent ligand (Ligand 2a). In addition to inhibiting the MBNL1-CUG interaction *in vitro* and dissolving nuclear foci in DM1 cells, treatment with this substance ameliorated DM1 phenotypes in *Drosophila* including the adult external eye degeneration and larval crawling defect (Table 1) [68].

To identify potential therapeutic entities against DM1 cardiac dysfunction, Chakraborty and co-workers screened a drug library using a *Drosophila* model expressing 250 CTG repeats specifically in the heart. This led to the identification of pentamidine, which not only released Mbl from toxic foci in DM1 cardiomyocytes, but also rescued heart arrhythmicity and contractility and improved DM1 fly survival (Table 1) [46].

More recently, another drug, daunorubicin hydrochloride, was also found to bind to CUG repeats and inhibit Mbl sequestration (Table 1). Daunorubicin treatment resulted in the correction of Mbl-dependent splicing alterations and led to a better cardiac function recovery compared with pentamidine treatment [29].

All these examples thus support the DM1 fly model is an attractive system for identifying and testing genetic and substance-based DM1 treatment strategies.

**Table 1.** Gene and drug screens in fly DM1 models.

Screen	Identified Drug	<i>Drosophila</i> Model	Phenotype/Mode of Action	Ref.
<b>Genetic Modifier Screening</b>	Suppressors: cnc, Nurf-38, foi, coro, csk, spinster; Enhancers: seven up, viking, cg4589	480 interrupted CTG	CUG-induced rough-eye phenotype	[37]
	Smaug	480 interrupted CTG	Restoration of translational activity of CELF1/Bru-3, rescue of CUG-induced myopathy (prevents muscle wasting/restore muscle function)	[60]
	apoptosis/autophagy inhibitors (overexpression of DIAP1, mTOR or muscleblind)	480 interrupted CTG	Rescue of the muscle-loss phenotype (atrophy)	[61]
<b>Drug Screening</b>	Non-steroidal anti-inflammatory agents, dopamine receptors and monoamine uptake inhibitors, Na <sup>+</sup> and Ca <sup>2+</sup> metabolism, Muscarinic, cholinergic and histamine receptors inhibitors	480 interrupted CTG)	Suppression of CUG-induced lethality	[37]
	D-amino acid hexapeptide (ABP1)	480 interrupted CTG	Biding to CUG repeats, elimination of CUG-RNA hairpin formation, suppression of CUG-induced lethality and muscle degeneration	[66]
	Ligand 3	480 interrupted CTG	Inhibition of MBNL1-CUG interaction, reduction of ribonuclear foci, partial rescue of misregulated splicing and degenerative phenotypes	[67]
	Ligand 2a	480 interrupted CTG	Inhibition of MBNL1-CUG interaction, reduction of ribonuclear foci, amelioration of adult external eye degeneration and larval crawling defect	[68]
	Pentamidine	250 pure CTG repeats	Inhibition of MBNL1-CUG interaction, reduction of ribonuclear foci, rescue of heart arrhythmicity and contractility, fly survival	[46]
	Daunorubicin hydrochloride	250 pure CTG repeats	Inhibition of MBNL1-CUG interaction, rescue of Mbl-dependent missplicing/cardiac function recovery (systolic interval and diastolic interval), fly survival	[29]

## 6. Conclusion and Remarks

In this review, we have discussed how the application of the *Drosophila* model improves our understanding of the genetic and molecular bases of DM1 and helps identify therapeutic strategies. Although CTG repeat-toxicity is a principal factor that induces DM1 disease via MBNL1 sequestration and CELF1 stabilization, specific gene deregulations underlying different DM1-associated phenotypes remained poorly understood. *Drosophila* DM1 models have considerably accelerated the discovery of deregulated genes and pathways, including autophagy and apoptosis regulators, generation of siRNA from bidirectional transcription of long CTG repeats and aberrant expression of several miRNAs. The fly DM1 model has also proved to be well-adapted for genetic and chemical modifier screens for identifying new drugs able to reduce CTG toxicity *in vivo*. One important advantage of the *Drosophila* model is that it allows the use of the inducible GAL4/UAS system and thereby the analysis of DM1 pathogenesis in individually targeted organs and tissues. This was crucial for identifying muscle and heart-specific gene deregulations and also for selecting active substances rescuing DM1-associated heart phenotypes.

Looking into the future, the recent advances in CRISPR/Cas9 genome editing systems offer a way to eliminate toxic repeat expansions or impede their transcription by deactivated Cas9. Here again, *Drosophila* offers an attractive model system for testing the efficacy of these new strategies.

**Author Contributions:** K.J. designed the manuscript and coordinated writing; A.S., M.Z. and K.J. wrote the manuscript chapters.

**Funding:** This research was funded by the AFM-Telethon grant number 21182 to the MyoNeurAlp Alliance.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interests.

## References

1. Meola, G.; Cardani, R. Myotonic dystrophies: An update on clinical aspects, genetic, pathology, and molecular pathomechanisms. *Biochim. Biophys. Acta BBA—Mol. Basis Dis.* **2015**, *1852*, 594–606. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Buxton, J.; Shelbourne, P.; Davies, J.; Jones, C.; Tongeren, T.V.; Aslanidis, C.; de Jong, P.; Jansen, G.; Anvret, M.; Riley, B.; et al. Detection of an unstable fragment of DNA specific to individuals with myotonic dystrophy. *Nature* **1992**, *355*, 547–548. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Kroksmark, A.-K.; Ekström, A.-B.; Björck, E.; Tulinius, M. Myotonic dystrophy: muscle involvement in relation to disease type and size of expanded CTG-repeat sequence. *Dev. Med. Child Neurol.* **2005**, *47*, 478–485. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Harper, P.S. Congenital myotonic dystrophy in Britain. I. Clinical aspects. *Arch. Dis. Child.* **1975**, *50*, 505–513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Fried, K.; Pajewski, M.; Mundel, G.; Caspi, E.; Spira, R. Thin ribs in neonatal myotonic dystrophy. *Clin. Genet.* **1975**, *7*, 417–420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Tokgozoglul, L.S.; Ashizawa, T.; Pacifico, A.; Armstrong, R.M.; Epstein, H.F.; Zoghbi, W.A. Cardiac involvement in a large kindred with myotonic dystrophy. Quantitative assessment and relation to size of CTG repeat expansion. *JAMA* **1995**, *274*, 813–819. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Hayashi, Y.; Ikeda, U.; Kojo, T.; Nishinaga, M.; Miyashita, H.; Kuroda, T.; Inoue, K.; Nishizawa, M.; Shimada, K. Cardiac abnormalities and cytosine-thymine-guanine trinucleotide repeats in myotonic dystrophy. *Am. Heart J.* **1997**, *134*, 292–297. [[CrossRef](#)]
8. Cudia, P.; Bernasconi, P.; Chiodelli, R.; Mangiola, F.; Bellocchi, F.; Dello Russo, A.; Angelini, C.; Romeo, V.; Melacini, P.; Politano, L.; et al. Risk of arrhythmia in type I myotonic dystrophy: the role of clinical and genetic variables. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2009**, *80*, 790–793. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Groh, W.J.; Lowe, M.R.; Zipes, D.P. Severity of cardiac conduction involvement and arrhythmias in myotonic dystrophy type 1 correlates with age and CTG repeat length. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **2002**, *13*, 444–448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

10. Renna, L.V.; Bosè, F.; Iachettini, S.; Fossati, B.; Saraceno, L.; Milani, V.; Colombo, R.; Meola, G.; Cardani, R. Receptor and post-receptor abnormalities contribute to insulin resistance in myotonic dystrophy type 1 and type 2 skeletal muscle. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0184987. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Thornton, C.A.; Johnson, K.; Moxley, R.T. Myotonic dystrophy patients have larger CTG expansions in skeletal muscle than in leukocytes. *Ann. Neurol.* **1994**, *35*, 104–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Morales, F.; Couto, J.M.; Higham, C.F.; Hogg, G.; Cuenca, P.; Braida, C.; Wilson, R.H.; Adam, B.; del Valle, G.; Brian, R.; et al. Somatic instability of the expanded CTG triplet repeat in myotonic dystrophy type 1 is a heritable quantitative trait and modifier of disease severity. *Hum. Mol. Genet.* **2012**, *21*, 3558–3567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Ashizawa, T.; Anvret, M.; Baiget, M.; Barceló, J.M.; Brunner, H.; Cobo, A.M.; Dallapiccola, B.; Fenwick, R.G.; Grandell, U.; Harley, H. Characteristics of intergenerational contractions of the CTG repeat in myotonic dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* **1994**, *54*, 414–423. [[PubMed](#)]
14. Fu, Y.H.; Friedman, D.L.; Richards, S.; Pearlman, J.A.; Gibbs, R.A.; Pizzuti, A.; Ashizawa, T.; Perryman, M.B.; Scarlato, G.; Fenwick, R.G. Decreased expression of myotonin-protein kinase messenger RNA and protein in adult form of myotonic dystrophy. *Science* **1993**, *260*, 235–238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Jansen, G.; Groenen, P.J.; Bächner, D.; Jap, P.H.; Coerwinkel, M.; Oerlemans, F.; van den Broek, W.; Gohlsch, B.; Pette, D.; Plomp, J.J.; et al. Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice. *Nat. Genet.* **1996**, *13*, 316–324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Inukai, A.; Doyu, M.; Kato, T.; Liang, Y.; Kuru, S.; Yamamoto, M.; Kobayashi, Y.; Sobue, G. Reduced expression of DMAHP/SIX5 gene in myotonic dystrophy muscle. *Muscle Nerve* **2000**, *23*, 1421–1426. [[CrossRef](#)]
17. Harris, S.E.; Winchester, C.L.; Johnson, K.J. Functional analysis of the homeodomain protein SIX5. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 1871–1878. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Klesert, T.R.; Cho, D.H.; Clark, J.I.; Maylie, J.; Adelman, J.; Snider, L.; Yuen, E.C.; Soriano, P.; Tapscott, S.J. Mice deficient in Six5 develop cataracts: implications for myotonic dystrophy. *Nat. Genet.* **2000**, *25*, 105–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Mankodi, A.; Logigian, E.; Callahan, L.; McClain, C.; White, R.; Henderson, D.; Krym, M.; Thornton, C.A. Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science* **2000**, *289*, 1769–1773. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Davis, B.M.; McCurrach, M.E.; Taneja, K.L.; Singer, R.H.; Housman, D.E. Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of myotonic dystrophy protein kinase transcripts results in nuclear retention of transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 7388–7393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Taneja, K.L.; McCurrach, M.; Schalling, M.; Housman, D.; Singer, R.H. Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues. *J. Cell Biol.* **1995**, *128*, 995–1002. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Fardaei, M.; Larkin, K.; Brook, J.D.; Hamshire, M.G. In vivo co-localisation of MBNL protein with DMPK expanded-repeat transcripts. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 2766–2771. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Mankodi, A.; Urbinati, C.R.; Yuan, Q.P.; Moxley, R.T.; Sansone, V.; Krym, M.; Henderson, D.; Schalling, M.; Swanson, M.S.; Thornton, C.A. Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2. *Hum. Mol. Genet.* **2001**, *10*, 2165–2170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Tian, B.; White, R.J.; Xia, T.; Welle, S.; Turner, D.H.; Mathews, M.B.; Thornton, C.A. Expanded CUG repeat RNAs form hairpins that activate the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *RNA* **2000**, *6*, 79–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Kino, Y.; Washizu, C.; Oma, Y.; Onishi, H.; Nezu, Y.; Sasagawa, N.; Nukina, N.; Ishiura, S. MBNL and CELF proteins regulate alternative splicing of the skeletal muscle chloride channel CLCN1. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 6477–6490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Kalsotra, A.; Xiao, X.; Ward, A.J.; Castle, J.C.; Johnson, J.M.; Burge, C.B.; Cooper, T.A. A postnatal switch of CELF and MBNL proteins reprograms alternative splicing in the developing heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 20333–20338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Kanadia, R.N.; Johnstone, K.A.; Mankodi, A.; Lungu, C.; Thornton, C.A.; Esson, D.; Timmers, A.M.; Hauswirth, W.W.; Swanson, M.S. A Muscleblind Knockout Model for Myotonic Dystrophy. *Science* **2003**, *302*, 1978–1980. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Kanadia, R.N.; Shin, J.; Yuan, Y.; Beattie, S.G.; Wheeler, T.M.; Thornton, C.A.; Swanson, M.S. Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscleblind overexpression in a mouse poly(CUG) model for myotonic dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 11748–11753. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

29. Chakraborty, M.; Sellier, C.; Ney, M.; Villa, P.; Charlet-Berguerand, N.; Artero, R.; Llamusi, B. Daunorubicin reduces MBNL1 titration by expanded CUG repeat RNA and rescues cardiac dysfunctions in a Drosophila model of myotonic dystrophy. *Dis. Model. Mech.* **2018**, dmm032557. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Vlasova, I.A.; Tahoe, N.M.; Fan, D.; Larsson, O.; Rattenbacher, B.; Sternjohn, J.R.; Vasdewani, J.; Karypis, G.; Reilly, C.S.; Bitterman, P.B.; et al. Conserved GU-rich elements mediate mRNA decay by binding to CUG-binding protein 1. *Mol. Cell* **2008**, *29*, 263–270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Paillard, L.; Legagneux, V.; Beverley Osborne, H. A functional deadenylation assay identifies human CUG-BP as a deadenylation factor. *Biol. Cell* **2003**, *95*, 107–113. [[CrossRef](#)]
32. Kim, Y.K.; Mandal, M.; Yadava, R.S.; Paillard, L.; Mahadevan, M.S. Evaluating the effects of CELF1 deficiency in a mouse model of RNA toxicity. *Hum. Mol. Genet.* **2014**, *23*, 293–302. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Reiter, L.T.; Potocki, L.; Chien, S.; Gribskov, M.; Bier, E. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in Drosophila melanogaster. *Genome Res.* **2001**, *11*, 1114–1125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Bier, E. Drosophila, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nat. Rev. Genet.* **2005**, *6*, 9–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Houseley, J.M.; Wang, Z.; Brock, G.J.R.; Soloway, J.; Artero, R.; Perez-Alonso, M.; O'Dell, K.M.C.; Monckton, D.G. Myotonic dystrophy associated expanded CUG repeat muscleblind positive ribonuclear foci are not toxic to Drosophila. *Hum. Mol. Genet.* **2005**, *14*, 873–883. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. de Haro, M.; Al-Ramahi, I.; De Gouyon, B.; Ukani, L.; Rosa, A.; Faustino, N.A.; Ashizawa, T.; Cooper, T.A.; Botas, J. MBNL1 and CUGBP1 modify expanded CUG-induced toxicity in a Drosophila model of myotonic dystrophy type 1. *Hum. Mol. Genet.* **2006**, *15*, 2138–2145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Garcia-Lopez, A.; Monferrer, L.; Garcia-Alcover, I.; Vicente-Crespo, M.; Alvarez-Abril, M.C.; Artero, R.D. Genetic and Chemical Modifiers of a CUG Toxicity Model in Drosophila. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e1595. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Yu, Z.; Teng, X.; Bonini, N.M. Triplet Repeat-Derived siRNAs Enhance RNA-Mediated Toxicity in a Drosophila Model for Myotonic Dystrophy. *PLoS Genet.* **2011**, *7*, e1001340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Cammarato, A.; Ahrens, C.H.; Alayari, N.N.; Qeli, E.; Rucker, J.; Reedy, M.C.; Zmasek, C.M.; Gucek, M.; Cole, R.N.; Eyk, J.E.V.; et al. A Mighty Small Heart: The Cardiac Proteome of Adult Drosophila melanogaster. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e18497. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Bodmer, R. The gene tinman is required for specification of the heart and visceral muscles in Drosophila. *Dev. Camb. Engl.* **1993**, *118*, 719–729.
41. Olson, E.N. Gene Regulatory Networks in the Evolution and Development of the Heart. *Science* **2006**, *313*, 1922–1927. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Bodmer, R. Heart development in Drosophila and its relationship to vertebrates. *Trends Cardiovasc. Med.* **1995**, *5*, 21–28. [[CrossRef](#)]
43. Nguyen, H.H.; Wolfe, J.T.; Holmes, D.R.; Edwards, W.D. Pathology of the cardiac conduction system in myotonic dystrophy: A study of 12 cases. *J. Am. Coll. Cardiol.* **1988**, *11*, 662–671. [[CrossRef](#)]
44. Benhayon, D.; Lugo, R.; Patel, R.; Carballeira, L.; Elman, L.; Cooper, J.M. Long-term arrhythmia follow-up of patients with myotonic dystrophy. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **2015**, *26*, 305–310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Groh, W.J.; Groh, M.R.; Saha, C.; Kincaid, J.C.; Simmons, Z.; Ciafaloni, E.; Pourmand, R.; Otten, R.F.; Bhakta, D.; Nair, G.V.; et al. Electrocardiographic abnormalities and sudden death in myotonic dystrophy type 1. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *358*, 2688–2697. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Chakraborty, M.; Selma-Soriano, E.; Magny, E.; Couso, J.P.; Pérez-Alonso, M.; Charlet-Berguerand, N.; Artero, R.; Llamusi, B. Pentamidine rescues contractility and rhythmicity in a Drosophila model of myotonic dystrophy heart dysfunction. *Dis. Model. Mech.* **2015**, *8*, 1569–1578. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Plantie, E.; Nakamori, M.; Renaud, Y.; Hugué, A.; Choquet, C.; Dondi, C.; Miquérol, L.; Takahashi, M.; Gourdon, G.; Junion, G.; et al. Straightjacket/ $\alpha$  2 $\delta$  3 deregulation is associated with cardiac conduction defects in Myotonic Dystrophy type 1. *bioRxiv* **2018**, 431569.
48. Yenigun, V.B.; Sirito, M.; Amcheslavsky, A.; Czernuszewicz, T.; Colonques-Bellmunt, J.; García-Alcover, I.; Wojciechowska, M.; Bolduc, C.; Chen, Z.; López Castel, A.; et al. (CCUG) $n$  RNA toxicity in a Drosophila model of myotonic dystrophy type 2 (DM2) activates apoptosis. *Dis. Model. Mech.* **2017**, *10*, 993–1003. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Sharma, S.; Jackson, P.G.; Makan, J. Cardiac troponins. *J. Clin. Pathol.* **2004**, *57*, 1025–1026. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

50. Philips, A.V.; Timchenko, L.T.; Cooper, T.A. Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science* **1998**, *280*, 737–741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Artero, R.; Prokop, A.; Paricio, N.; Begemann, G.; Pueyo, I.; Mlodzik, M.; Perez-Alonso, M.; Baylies, M.K. The muscleblind gene participates in the organization of Z-bands and epidermal attachments of *Drosophila* muscles and is regulated by Dmef2. *Dev. Biol.* **1998**, *195*, 131–143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Picchio, L.; Plantie, E.; Renaud, Y.; Poovthumkadavil, P.; Jagla, K. Novel *Drosophila* model of myotonic dystrophy type 1: phenotypic characterization and genome-wide view of altered gene expression. *Hum. Mol. Genet.* **2013**, *22*, 2795–2810. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Fernandez-Costa, J.M.; Garcia-Lopez, A.; Zuñiga, S.; Fernandez-Pedrosa, V.; Felipo-Benavent, A.; Mata, M.; Jaka, O.; Aiastui, A.; Hernandez-Torres, F.; Aguado, B.; et al. Expanded CTG repeats trigger miRNA alterations in *Drosophila* that are conserved in myotonic dystrophy type 1 patients. *Hum. Mol. Genet.* **2013**, *22*, 704–716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Rau, F.; Freyermuth, F.; Fugier, C.; Villemin, J.-P.; Fischer, M.-C.; Jost, B.; Dembele, D.; Gourdon, G.; Nicole, A.; Duboc, D.; et al. Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011**, *18*, 840–845. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Splawski, I.; Timothy, K.W.; Sharpe, L.M.; Decher, N.; Kumar, P.; Bloise, R.; Napolitano, C.; Schwartz, P.J.; Joseph, R.M.; Condouris, K.; et al. Ca(V)1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell* **2004**, *119*, 19–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Naga Prasad, S.V.; Duan, Z.-H.; Gupta, M.K.; Surampudi, V.S.K.; Volinia, S.; Calin, G.A.; Liu, C.-G.; Kotwal, A.; Moravec, C.S.; Starling, R.C.; et al. Unique MicroRNA Profile in End-stage Heart Failure Indicates Alterations in Specific Cardiovascular Signaling Networks. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 27487–27499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Li, B.; Li, R.; Zhang, C.; Bian, H.; Wang, F.; Xiao, J.; Liu, S.; Yi, W.; Zhang, M.; Wang, S.; et al. MicroRNA-7a/b Protects against Cardiac Myocyte Injury in Ischemia/Reperfusion by Targeting Poly(ADP-Ribose) Polymerase. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e90096. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Geng, H.-H.; Li, R.; Su, Y.-M.; Xiao, J.; Pan, M.; Cai, X.-X.; Ji, X.-P. The Circular RNA Cdr1as Promotes Myocardial Infarction by Mediating the Regulation of miR-7a on Its Target Genes Expression. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0151753. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Picchio, L.; Legagneux, V.; Deschamps, S.; Renaud, Y.; Chauveau, S.; Paillard, L.; Jagla, K. Bruno-3 regulates sarcomere component expression and contributes to muscle phenotypes of myotonic dystrophy type 1. *Dis. Model. Mech.* **2018**, *11*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. de Haro, M.; Al-Ramahi, I.; Jones, K.R.; Holth, J.K.; Timchenko, L.T.; Botas, J. Smaug/SAMD4A Restores Translational Activity of CUGBP1 and Suppresses CUG-Induced Myopathy. *PLoS Genet.* **2013**, *9*, e1003445.
61. Bargiela, A.; Cerro-Herreros, E.; Fernandez-Costa, J.M.; Vilchez, J.J.; Llamusi, B.; Artero, R. Increased autophagy and apoptosis contribute to muscle atrophy in a myotonic dystrophy type 1 *Drosophila* model. *Dis. Model. Mech.* **2015**, *8*, 679–690. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Cerro-Herreros, E.; Chakraborty, M.; Pérez-Alonso, M.; Artero, R.; Llamusi, B. Expanded CCUG repeat RNA expression in *Drosophila* heart and muscle trigger Myotonic Dystrophy type 1-like phenotypes and activate autophagocytosis genes. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 2843. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Cerro-Herreros, E.; Fernandez-Costa, J.M.; Sabater-Arcis, M.; Llamusi, B.; Artero, R. Derepressing muscleblind expression by miRNA sponges ameliorates myotonic dystrophy-like phenotypes in *Drosophila*. *Sci. Rep.* **2016**, *6*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Angelbello, A.J.; González, À.L.; Rzuczek, S.G.; Disney, M.D. Development of pharmacophore models for small molecules targeting RNA: Application to the RNA repeat expansion in myotonic dystrophy type 1. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 5792–5796. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. López-Morató, M.; Brook, J.D.; Wojciechowska, M. Small Molecules Which Improve Pathogenesis of Myotonic Dystrophy Type 1. *Front. Neurol.* **2018**, *9*, 349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. García-López, A.; Llamusi, B.; Orzáez, M.; Pérez-Payá, E.; Artero, R.D. In vivo discovery of a peptide that prevents CUG-RNA hairpin formation and reverses RNA toxicity in myotonic dystrophy models. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 11866–11871.

67. Wong, C.-H.; Nguyen, L.; Peh, J.; Luu, L.M.; Sanchez, J.S.; Richardson, S.L.; Tuccinardi, T.; Tsoi, H.; Chan, W.Y.; Chan, H.Y.E.; et al. Targeting toxic RNAs that cause myotonic dystrophy type 1 (DM1) with a bisamidinium inhibitor. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 6355–6361. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Luu, L.M.; Nguyen, L.; Peng, S.; Lee, J.; Lee, H.Y.; Wong, C.-H.; Hergenrother, P.J.; Chan, H.Y.E.; Zimmerman, S.C. A Potent Inhibitor of Protein Sequestration by Expanded Triplet (CUG) Repeats that Shows Phenotypic Improvements in a Drosophila Model of Myotonic Dystrophy. *ChemMedChem* **2016**, *11*, 1428–1435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Review

# *Drosophila* Heart as a Model for Cardiac Development and Diseases

Anissa Souidi and Krzysztof Jagla \*

Genetics Reproduction and Development Institute (iGrED), INSERM U1103, CNRS UMR6293, University of Clermont Auvergne, 28 Place Henri-Dunant, 63000 Clermont-Ferrand, France; anissa.souidi@uca.fr

\* Correspondence: author: christophe.jagla@uca.fr

**Abstract:** The *Drosophila* heart, also referred to as the dorsal vessel, pumps the insect blood, the hemolymph. The bilateral heart primordia develop from the most dorsally located mesodermal cells, migrate coordinately, and fuse to form the cardiac tube. Though much simpler, the fruit fly heart displays several developmental and functional similarities to the vertebrate heart and, as we discuss here, represents an attractive model system for dissecting mechanisms of cardiac aging and heart failure and identifying genes causing congenital heart diseases. Fast imaging technologies allow for the characterization of heartbeat parameters in the adult fly and there is growing evidence that cardiac dysfunction in human diseases could be reproduced and analyzed in *Drosophila*, as discussed here for heart defects associated with the myotonic dystrophy type 1. Overall, the power of genetics and unsuspected conservation of genes and pathways puts *Drosophila* at the heart of fundamental and applied cardiac research.

**Keywords:** heart; cardiogenesis; *Drosophila melanogaster*; conduction defects; arrhythmia; congenital cardiomyopathy; myotonic dystrophy type 1

**Citation:** Souidi, A.; Jagla, K. *Drosophila* Heart as a Model for Cardiac Development and Diseases. *Cells* **2021**, *10*, 3078. <https://doi.org/10.3390/cells10113078>

Academic Editor: Giuliano Callaini

Received: 23 September 2021

Accepted: 5 November 2021

Published: 8 November 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

With its short life cycle (10 days at 25 °C), high offspring numbers (2000 eggs per female), low maintenance costs, and conservation of genes and cellular pathways, *Drosophila* is an outstanding model for genetic studies.

Developed over the years, molecular and genetic tools, such as the GAL4/UAS conditional gene expression system [1] and numerous collections of mutants, RNAi knock-down and transgenic lines along with CRISPR/Cas9 technology tools [2–4], and recently implemented model organism resources [5], greatly facilitate the analysis of gene functions.

The sequencing and annotation of the *Drosophila* genome [6] revealed that genes involved in the development of several organs, including the heart, were highly conserved and less redundant than in vertebrates. Remarkably, 77% of human disease genes have *Drosophila* counterparts, among which 26 were identified as associated with cardiovascular diseases [7]. Such conservation of genes, signaling pathways, and cellular processes, make the *Drosophila* cardiovascular system an amenable genetic model to study cardiac development, function, and diseases [8].

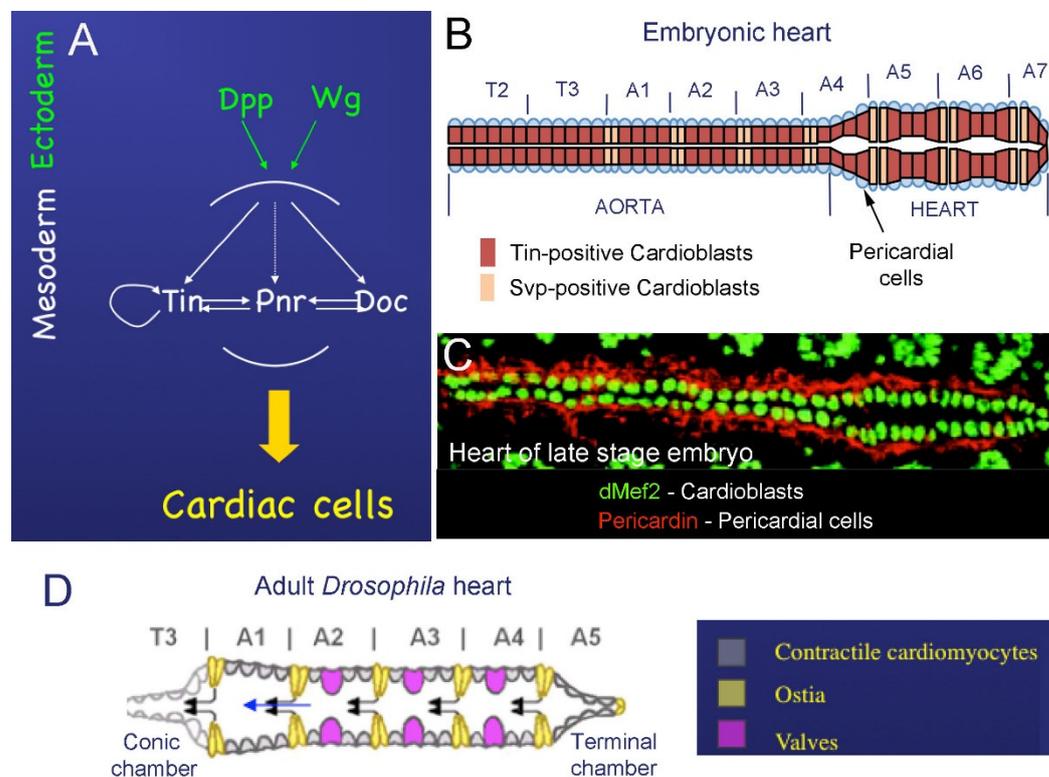
In this review, we discuss the mechanisms of *Drosophila* heart development and how this simple model is applied to the study of congenital heart diseases. We also discuss how the model of the adult fly heart helps in dissecting the mechanisms of human cardiac aging, heart failure, and those underlying cardiac defects in myotonic dystrophy type 1 (DM1)—one of the most frequent myopathies in humans.

## 2. The *Drosophila* Heart

The *Drosophila* heart is derived from the dorsal-most mesoderm and consists of two major cell types: the cardioblasts (CBs), which form the cardiac tube and differentiate into contractile cardiomyocytes, and the pericardial cells (PCs), which are irregularly arranged on both sides of the heart and perform hemolymph filtration [9,10]. The dorsal vessel has an anterior–posterior polarity with an anteriorly located “aorta” and the posterior “heart proper” [9]. A pair of specialized CBs that form a cardiovascular valve separate the heart and the aorta. The hemolymph, which supplies the organs with nutrients, enters the heart proper via inflow tracts termed ostia, and is ejected via an outflow tract located at the tip of the aorta [11].

### 2.1. Cardiac Development in Embryos

At the embryonic blastoderm stage, maternal signaling events initiate the expression of the master mesodermal transcription factor Twist and specify the primordial cells of the mesoderm. These cells invaginate along the ventral midline into the interior of the embryo and then by embryonic stage 9 spread laterally and dorsally into a monolayer of cells opposed to the ectoderm [10]. The specification of the cardiac mesoderm and other mesoderm-derived tissue types begins at stage 10 under the influence of two growth factors, Decapentaplegic (Dpp) and Wingless (Wg), expressed in the ectoderm (Figure 1A); Wg in continuous stripes [10,12], and Dpp in a broad dorsal band [12]. Wg and Dpp collectively activate *tinman* (*tin*), which encodes for the mesodermal homeodomain transcription factor and acts to determine cardiac and visceral mesodermal fates. Soon after, at early embryonic stage 11, Dpp and Wg induce the expression of GATA factor *Pannier* (*Pnr*) in the presumptive cardiac mesoderm, and in parallel ensure the restricted *Tin* expression, which then acts as a cardiac master gene [12,13].



**Figure 1.** The embryonic and adult fly heart. (A) Cardiogenic pathway: ectodermal signals and cardiac master genes required for the specification of cardiac cells. (B) Scheme of the embryonic cardiac tube subdivided on the anterior aorta and the enlarged posteriorly located heart proper. Color code represents the Tin- and Svp-positive subpopulations of cardioblasts. (C) A dorsal view

of the cardiac tube in a late-stage embryo. Nuclei of cardioblasts are revealed by Dmef2 (green) whereas surrounding pericardial cells are marked by pericardin (red). (D) Scheme of the adult heart after remodeling. Different types of cardiac cells within the heart segments are represented by grey, yellow, and violet colors. Conical chamber forms the anterior and terminal chamber at the posterior heart end. Arrows indicate the direction of hemolymph flow.

The maintenance and proper restriction of *Tin* expression and positive feedback loop between Pnr, Tin, and another cardiac transcription factor, Doc (Figure 1A), are essential for cardiomyocyte differentiation.

From stage 12 to stage 15, the two rows of *Tin*-positive cardioblasts align and migrate dorsally toward each other to ultimately form the cardiac tube (schematized in Figure 1B). Their migration is initially supported by the overlying dorsal ectoderm, but final movements and the CB matching are ectoderm independent [14]. The heart spans over two thoracic and seven abdominal segments, and cardiac cells (CBs and PCs) are arranged in repeated segmental units (Figure 1B). In late-stage embryos, each segment has four pairs of CBs that express *Tin* and two pairs of *Svp*-positive CBs [15] surrounded by *pericardin*-expressing PCs (Figure 1C). Two out of four *Tin*-positive CBs also express the *ladybird* (*lb*) homeobox genes acting as cell identity genes [16].

In addition, all CBs express two other conserved transcription factors, *Myocyte enhancer factor 2* (*Mef2*) (see Figure 1C) and *Hand* [17].

## 2.2. Development of the Adult Fly Heart—Hox-Dependent Remodeling of the Cardiac Tube

As previously described, the cardiac tube is divided into the “heart proper” and the anteriorly located “aorta”. In the developing embryo, the anteroposterior polarity determination of the dorsal vessel is controlled by homeotic Hox genes of the *Bithorax complex* (*ultrabithorax* (*Ubx*), *abdominal-A* (*abdA*), *abdominal-B* (*abdB*) and *Antennapedia complex* (*Antp*) [18]. In the embryo, *Ubx* is expressed in different portions of the aorta and determines the identity of aorta CBs, while *abdA* is expressed in cardiac segments A5 to A7 and is required for the proper specification and differentiation of the heart [19,20]. *abdB* expression correlates with the posterior terminus of the heart. Experiments of gain of function and loss of function of *Hox* genes demonstrated that the specific expression of *Hox* genes along the cardiac tube was necessary for its anteroposterior polarity and for proper cardiomyocyte differentiation [19,20].

The adult fruit fly heart is formed during metamorphosis by the reprogramming of differentiated and functional larval cardiomyocytes, without cell proliferation. Heart remodeling involves the regulation of *Hox* gene expression and function driven by the steroid hormone ecdysone [18]. Ecdysone modulates *Ubx* activity in *svp*-expressing cells and promotes adult ostia development. The modulation of *Ubx* expression induces the remodeling of larval aorta myocytes into a functional adult heart, whereas *abdA* mediates the transformation of the surviving larval contractile heart myocytes into the adult terminal chamber [18].

The adult heart is remodeled from the larval dorsal vessel in the following way: 1. The larval posterior aorta (segments A1 to A4) undergoes remodeling into the adult heart (schematized in Figure 1D), while the larval heart (abdominal segments A5–A7) is largely histolyzed by programmed cell death. 2. In A1–A4, the *Tin*-expressing myocytes acquire contractile activity and *Ubx* transforms presumptive ostial cells (*Svp*-positive cells) from the larval aorta into functional ostia, so that there are four pairs of ostia located in the adult abdomen [18,21,22] (Figure 1D). 3. Three anterior pairs of alary muscles trans-differentiate into a layer of striated muscle, called ventral longitudinal muscle (VLM). The VLM is formed on the ventral surface of the adult heart and is separated from the heart by a basal lamina [22–24]. 4. Three valves are formed in segments A2, A3 and A4 [23,24] (Figure 1F). 5. Cardiomyocytes in segment A5 undergo a trans-differentiation process; they lose contractile activity and gain specific innervations to form the terminal

chamber [18]. 6. The number of pericardial cells surrounding the adult heart is reduced, most probably via programmed cell death [24].

### 3. Vertebrate Heart and Its Similarity with the *Drosophila* Cardiac Tube

The heart is the first functional organ in vertebrate embryos, including in humans [25]. It is derived from the anterior portion of the lateral plate mesoderm and is initially formed as a simple contractile vessel called the “heart tube”, oriented along the ventral midline of the foregut, and then transformed by elongation, looping, and morphological remodeling into a multi-chambered organ that propels oxygenated blood at high pressure via blood vessels [26].

The cardiac morphogenesis in vertebrates takes place in four steps. (1) Determination and specification of cardiomyocytes. (2) Formation of the cardiac tube. (3) Looping and chamber formation. (4) Formation of valves and septation.

The first step takes place during gastrulation. It begins by the specification of cardiac progenitor cells in the anterior lateral plate mesoderm and the formation of the cardiac crescent. The commitment of mesodermal precursors to cardiac progenitor cells involves signaling from the adjacent endoderm and ectoderm, including Wg, FGF, and TGF- $\beta$  pathways [25]. After specification, the cardiac progenitor cells migrate through the node and primitive streak to develop specific heart fields, which form the cardiac crescent. The bilateral heart fields of the cardiac crescent then start expressing cardiac-specific transcription factors such as Nkx2.5 and Isl1. They migrate under the forces generated by the closure of the anterior intestinal portal, and fuse anteriorly at the ventral midline to form a primitive cardiac tube. At this time, around embryonic day 22 in humans, the primitive cardiac tube begins to contract and pump blood, driven by pacemaker activity in the venous pole [25,26].

The next stage of heart morphogenesis is “looping”, whereby the primitive cardiac tube is transformed into a helically coiled heart loop. During this step, the cardiac tube bends to the right and initiates looping by a rapid expansion and elongation followed by a folding and twisting process. Elongation begins by the addition of newly differentiated cardiomyocytes to the arterial and venous poles. These cells originate from the distal mesoderm, proliferate rapidly, migrate, and enter the heart tube. This cell population is called the “anterior heart field” (AHF) or “second heart field” (SHF) as opposed to the “first heart field” (FHF) from which the initial heart tube was formed.

Cells of the FHF contribute to the left ventricular wall, part of the ventricular septum, and a portion of the atria, whereas the SHF cells mainly form the outflow tract, part of the atria, and also contribute to the right ventricle. After cardiac looping, the primary heart tube undergoes division into four well-defined chambers. This is followed by septation and remodeling of the heart, which becomes connected to partitioned systemic and pulmonary circulations [27].

Despite obvious morphological differences, there are many similarities between the *Drosophila* cardiac tube and the vertebrate heart. Developmentally, *Drosophila* and vertebrates have cardiac progenitors of similar origin. In both cases, the heart precursors are derived from the bilateral rows of mesodermal cells that migrate to the midline and fuse together to form a beating linear cardiac tube. This simple cardiac tube acquires anterior–posterior polarity and pumps the hemolymph in *Drosophila* and blood in vertebrates from the lower/posterior part to the upper/anterior part [8,28].

Remarkably, the cardiac progenitor fate specification in both systems requires the same inductive Dpp/TGF- $\beta$  and Wg/Wnt signals emanating from adjacent ectodermal and/or endodermal cells and activating key cardiac transcription factors such as Tin/Nkx2.5, Dmef2/Mef2C, Panier (Pnr)/GATA, and dHand/HAND (see Table 1) [8,16,29].

Unlike the vertebrate heart, the cardiac tube of *Drosophila* does not undergo looping and remains a simple linear tube. However, its final morphogenesis and formation of the cardiac outflow tract (OFT) involves, as in vertebrates, a population of non-mesodermal

cells called heart-anchoring cells (HANC) [11,30], which are to some extent analogous to vertebrate cardiac neural crest cells (cNCCs) [31]. Moreover, in both *Drosophila* and vertebrates, formation of the OFT requires cells originating from the pharyngeal mesoderm. These are progenitors of two cardiac outflow muscles (COMs) [11,30] in fruit fly heart and the OFT-building secondary heart field (SHF) cells in vertebrates. Functionally, the vertebrate heart is part of a closed circulatory system. By pumping the oxygen-transporting blood cells, it ensures gas exchange and so is critical for viability. By contrast, the *Drosophila* heart pumps the hemolymph in an open circulatory system. It is required for transporting nutrients and signaling entities but not oxygen (distributed by the tracheal system), and so is not essential for viability [8,28,32]. In this light, *Drosophila* heart represents an attractive system for modeling human cardiac diseases, causing lethality in vertebrate models.

**Table 1.** Genes involved in cardiac development conserved between *Drosophila* and vertebrates.

Fly Gene	Expression	Mutants	Vertebrate Ortholog	Expression	Mutants
<i>Timman</i>	Expressed early during development uniformly in mesoderm After gastrulation: restricted to the dorsal portion of the mesoderm Later: transiently in visceral mesoderm and permanently in heart (in cardiac and pericardial cells) [8,28]	Lack of visceral and cardiac mesoderm. The somatic mesoderm shows moderate patterning defects later in development [28,33]	<i>Nkx2-5</i>	Initially expressed in the bilateral cardiac progenitors of the anterior lateral plate mesoderm and in part of the pharyngeal endoderm	Lack of ventricular-specific myosin light-chain gene expression Heart tube fails to undergo normal looping [34]
<i>Dmef2</i>	Expressed myogenic precursor lineages and their descendants [8]	Heart differentiation affected [35]	<i>Mef2</i>	Expressed in cardiac, skeletal, and smooth muscle precursor lineages [8]	Defects in heart looping and Hand2 downregulation [8]
<i>HAND</i>	Heart, lymph glands, circular visceral musculature, and a subset of CNS cells	In embryos: lack of lymph glands. In adult: disorganized myofibrillar structure, reduced systolic and diastolic diameter, abnormal heartbeat contractions, midguts highly deformed, and premature lethality [36]	<i>Hand2/3</i>	Heart neural crest derivatives [37]	Aortic sac defects Heart looping defects [37]
<i>Dpp</i>	Dorsal ectoderm	Lack of heart and visceral mesoderm [8]	<i>BMPs</i>	Expressed in endoderm and ectoderm	Affected heart development Down regulation of <i>Nkx2-5</i> [38]

<i>Wg</i>	Ecto- derm—adjacent to cardiac mesoderm [39]	Loss of repeated clusters of even-skipped ex- pressing cells in mesoderm [39] Loss of heart pre- cursors [10]	<i>Wnt</i>	Wnt5a and Wnt11 expressed in second heart field [40]	Defective right ven- tricle development [41]
-----------	---	---	------------	--	--

#### 4. Identifying Cardiac Aging Genes and Modeling Human Heart Diseases in *Drosophila*

Besides the conservation of gene regulatory pathways, there is growing evidence that mutations in genes involved in cardiac diseases cause fly heart phenotypes similar to those observed clinically in humans [7]. *Drosophila* is used as a model organism for studying physiological, genetic, and epigenetic bases of cardiac aging [42]. There is also growing interest in using *Drosophila* to dissect molecular mechanisms of cardiac disease- and aging-associated heart failure [43].

In this part of the review, we focus on the application of *Drosophila* to identifying new genes implicated in cardiac aging, heart failure, and in congenital heart diseases, and as an example, discuss how the fly model helps us gain an understanding of cardiac defects associated with myotonic dystrophy type 1 (DM1), a toxic transcript repeat disease. Overall, this makes *Drosophila* an attractive model system for dissecting mechanisms of human cardiovascular diseases.

##### 4.1. Studying Cardiac Aging and Heart Failure in *Drosophila*

Similar to mammals, flies present age-related decline in cardiac performance with a lower heart rate and increased fibrillation [44,45] particularly evident in stress conditions. To identify the changes in gene expression that underlie cardiac aging, Cannon and co-workers [46] analysed cardiac transcriptomes of young and old flies and compared the genes differentially expressed in the old fly heart with genes known to be involved in cardiac aging in mammals. They found the upregulation of extracellular matrix (ECM) genes, and genes involved in DNA replication and repair. In contrast, genes involved in ATP synthesis and  $\beta$ -oxidation, as well as in carbohydrate metabolism, were downregulated [46]. Among upregulated-with-age ECM genes are *Matrix Metalloprotease 1* and 2 (*Mmp1* and *Mmp2*), *nepriylisin 2* (*Nep2*), and *TweedleF* (*TwdfF*) [46], as well as cardiac collagen-IV (*Viking*) and *pericardin* (encoding a collagen IV-like protein) [42].

*In silico* analysis of genes upregulated with age in the fly heart, performed by Cannon et al. [46], identified a significant enrichment of binding sites for several micro-RNAs including *miR-1*, an evolutionarily conserved muscle- and heart-specific miRNA. The level of *miR-1* was found to be significantly reduced in aging *Drosophila* hearts concomitant with the overexpression of the zinc-finger transcription factor *odd*, a critical transcriptional regulator in patterning the body plan of the *Drosophila* embryo. These results suggest that *miR-1* and *odd* could play a role in cardiac aging by regulating the expression of their targets. Among them, *Matrix metalloprotease 1* (*Mmp1*) was found to be upregulated in old fly hearts. The overexpression of *Mmp1* in heart tissue leads to a reduction in fractional shortening, suggesting its implication in cardiac aging [46].

Experiments performed by Occor and co-workers [47] also revealed an elevated incidence of cardiac dysfunction in aging flies. In this study, authors identified a decrease in the efficacy of cardiac relaxation/repolarization due to the affected voltage-gated potassium channel (*KCNQ*) function. It was found that young *KCNQ1* mutant flies exhibit several cardiac abnormalities in old wild-type flies, including slower heart rate and an increased susceptibility to pacing-induced cardiac dysfunction (heart failure), thus suggesting the involvement of *KCNQ* in cardiac aging [47].

Heart failure corresponding to a decline in the capacity to pump blood is a common consequence of various heart diseases, and in particular dilated and hypertrophic car-

diomyopathies. Deregulations of genes and pathways involved in cardiac aging such as Insulin Growth Factor (IGF) and the Target of Rapamycin (TOR) pathway [48,49], and genes encoding ion channels such as *Ca/Calmodulin-dependent protein Kinase II (CaMKII)* [50] have been previously shown to play a role in heart failure [43,51]. Heart failure is also associated with aberrant cytoskeletal remodelling. For example, missense mutations in vinculin encoding integrin-like protein are associated with an increased incidence of heart failure in humans, whereas cardiac overexpression of vinculin in flies positively influences heart performance and increases lifespan [52,53]. A greater susceptibility to heart failure has also been observed in mutants of the chromatin remodelling via *Carbon Catabolite Repression 4 (CCR4)–Negative on TATA-less (Not) (CCR4–Not)* complex (Not3), leading to cardiac contractility defects in mice and dilated cardiomyopathy in flies [54,55].

#### 4.2. Identifying Genes Involved in Congenital Heart Defects

By definition, congenital heart defects (CHDs) are heterogeneous abnormalities of the heart or the great vessels (aorta, pulmonary artery, pulmonary veins) at the time of birth. CHDs are the most common birth defects, occurring in about 0.8% of all newborn infants [56]. However, despite extensive molecular and genetic analyses using chromosomal microarrays, whole-exome sequencing, and next-generation sequencing technologies [57], the genes causal for about 75% of CHD cases remain unknown [58].

To fill this gap, several animal models have been studied, including zebrafish, frog, chick, mice, sheep and *Drosophila* [59]. Recently, Zhu et al (2017) functionally tested conserved candidate genes in *Drosophila* with de novo mutations identified through a genomic association study from a large number of severe cases of CHD [60]. This screen, based on heart-specific RNAi silencing, pinpointed 70 genes essential for the development, structure, or function of the *Drosophila* heart. Interestingly, among the new potential CHD genes, several were found to be involved in histone H3K4 and H3K27 methylation (*Kismet/CHD7*, *WDS/WDR5*, *Trx/MLL2*, *Lid/KDM5A-B*) [60]. The silencing of genes responsible for H3K4 and H3K27 methylation, but not demethylation, induced developmental lethality, severe structural heart abnormalities, and/or reduced lifespan [60]. The function of these genes in CHDs was validated by replacing the endogenous fly genes with the patient-derived mutant alleles, resulting in similar cardiac symptoms reversed by overexpressing a wild-type human gene in the *Drosophila* heart [60]. *Drosophila* thus helped to identify genes involved in histone H3K4 and H3K27 methylation as new CHD genes.

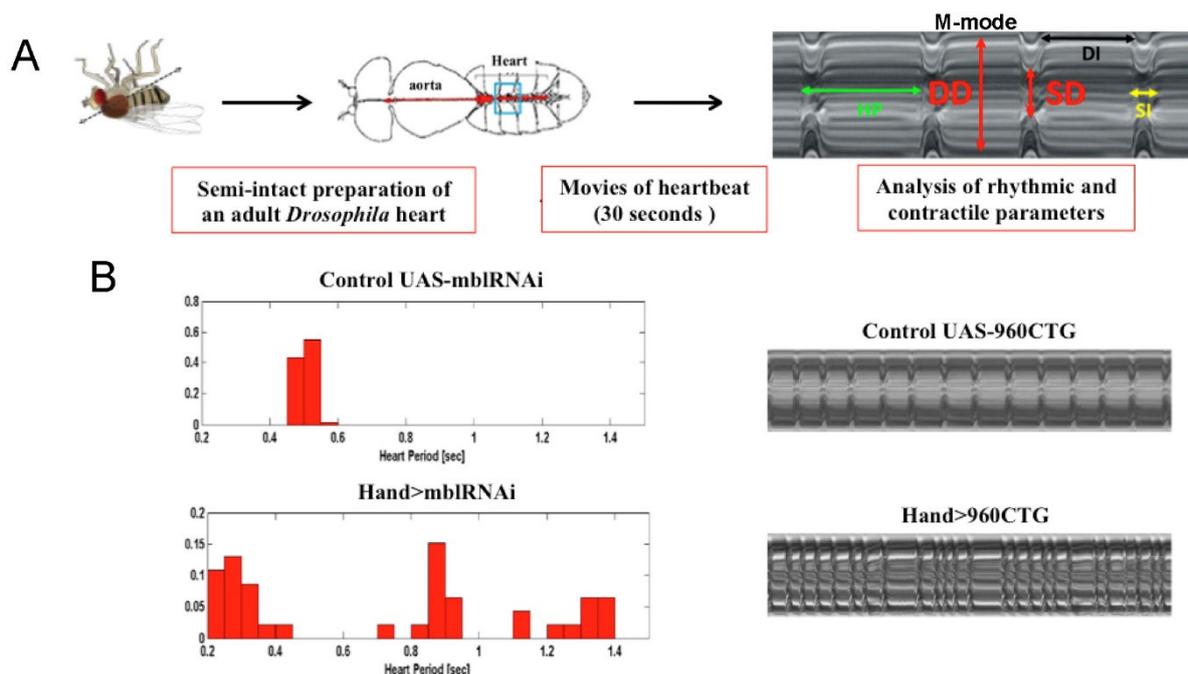
Another recent study [61] focused on de novo copy number variants (CNVs) detected in a cohort of CHD patients. The heart-specific RNAi attenuation of CNV candidate genes led to the identification of *RpL13 (ribosomal protein L13)*, which encodes a subunit of the large cytosolic ribosome complex and *SON*, a splicing cofactor. Intriguingly, heart-specific *RpL13* knockdown at embryonic stages and at the early L1 larval stage resulted in a complete loss of the heart, while *RpL13* attenuation in later larval stages did not lead to any heart defect [61]. Because *RPL13* is involved in proliferation and differentiation of human cardiac progenitors and plays an essential role in fly heart development, it represents a new candidate CHD gene. Similarly, the attenuation of *SON* leads to a reduced fly heart contractility that mimics the cardiac phenotype of CNV patients and suggests a role in CHD [61].

The conservation of genes controlling the early stages of heart development between *Drosophila* and humans thus makes the fruit fly a highly valuable model for testing and identifying new CHD genes. However, *Drosophila* can also be used to model human diseases in which cardiac function is affected. As an example, we discuss below the modeling myotonic dystrophy type 1 characterized by severe heart dysfunction.

#### 4.3. Modeling Myotonic Dystrophy Type 1 Heart Defects

Myotonic dystrophy type 1 (DM1, OMIM #160900), an autosomal dominant disorder, is the most prevalent type of muscular dystrophy in adults [62], with an estimated incidence of 1/8000 births [63]. DM1 symptoms include progressive muscle weakness, myotonia, respiratory failure and cardiac dysfunctions. DM1 patients also develop early onset cataracts, testicular atrophy, insulin resistance, and neurological problems [63,64]. However, respiratory failure and heart defects are the main causes of mortality in DM1.

DM1 is caused by the expansion of unstable CTG triplet repeats in the 3'-untranslated region of the *dystrophia myotonica protein kinase* (*DMPK*) gene [65]. The *Dmpk* transcripts carrying expanded CUG triplets (more than 50 and up to several thousand) form toxic hairpin-like secondary structures in the nuclei that sequester RNA-binding proteins (RNBP), and in particular Muscleblind-like 1 (MBNL1), leading to loss of its function [66,67]. In parallel, another RNPB, ELAV-like factor 1 (CELF1), becomes stabilized [68]. MBNL1 and CELF1 regulate the alternative splicing of common targets involved in skeletal and cardiac muscle function, and their misbalance causes splicing defects responsible for DM1 symptoms [69]. Cardiac dysfunctions appear in 80% of DM1 patients, generally several years after the onset of neuromuscular symptoms, but in some cases, cardiac disease may be the first manifestation in DM1. Among cardiac defects, DM1 patients present an increased risk of mechanical diastolic and/or systolic dysfunction, cardiomyopathy, conduction disturbances and arrhythmias [70], but the most common DM1 cardiac defect is conduction disturbances with lengthened PR interval (corresponding to the time between atrial depolarization and ventricular depolarization) and intraventricular conduction delay [71,72]. To identify gene deregulations caused by toxic repeats and underlying DM1 pathogenesis, several animal models were generated [65,66]. Importantly, *Drosophila* DM1 models [73,74] have reproduced all the cardiac defects observed in DM1 patients, with the analysis of phenotypes facilitated by semi-automated optical heartbeat analysis (SOHA) [75]. Briefly, this technique allows the analysis and quantification of rhythmicity and the dynamics of the heart contractions, including the relaxation phase (DI, diastolic interval), contraction phase (SI, systolic interval), heart period (HP), arrhythmia index (AI), end systolic diameter (ESD), end diastolic diameter (EDD), and the percentage of fractional shortening (Figure 2A).



**Figure 2.** Modeling cardiac DM1 symptoms in *Drosophila*. (A) Scheme illustrating semi-intact preparation of adult *Drosophila* heart for semi-automated optical heartbeat analysis (SOHA). A blue window indicates the imaged heart area. On

the right, an example of M-mode generated by SOHA shows different rhythmic and contractile heart parameters. HP: heart period; DI: diastolic interval; SI: systolic interval; DD: diastolic diameter; SD: systolic diameter. (B) Generated DM1 *Drosophila* lines recapitulate cardiac arrhythmia phenotypes observed in DM1 patients. SOHA analyses of heart-specific attenuation of MBNL1 orthologue (*Hand > mblRNAi*) show high variability of the heart period (lower left panel). M-modes of DM1 fly hearts expressing 960 CTG repeats (*Hand > 960CTG*) show an irregular arrhythmic pattern (lower right panel).

Recent work by our group [76] revealed that heart-specific DM1 models showed the asynchronous propagation of cardiac contraction waves mimicking the conduction defects observed in DM1 patients. To identify genes involved in DM1-associated conduction disturbances, transcripts were isolated specifically from the DM1 fly hearts using a TU-tagging approach, followed by RNA sequencing [76]. This showed that the expression of *straightjacket (stj)/Calcium Voltage-Gated Channel Auxiliary Subunit Alpha 2 delta 3 (CACNA2D3)/ $\alpha 2\delta 3$* , involved in heart contraction, was significantly increased in the cardiac cells of DM1 flies [76]. Consistent with this observation, the targeted overexpression of *stj* in the *Drosophila* heart led to conduction defects, and its attenuation in DM1 flies rescued this heart phenotype. The important role of precise regulation of cardiac *stj/ $\alpha 2\delta 3$*  expression levels was further supported by an increase in ventricular  $\alpha 2\delta 3$  expression level in DM1 patients with cardiac conduction defects. Altogether, these findings point to a possible  $\alpha 2\delta 3$ -targeted drug-based therapy to ameliorate conduction disturbances in DM1 [76].

As stated before, fly models also reproduce other DM1-associated cardiac phenotypes, including arrhythmias, increased heart period, and affected contractility [76–78] (Figure 2B). An extensive analysis of heart function was performed in DM1 flies with cardiac expression of 250 CUG repeats [78]. These flies showed severe heart defects, which could all be rescued by overexpressing Muscleblind (Mbl), the *Drosophila* MBNL1 orthologue, thus suggesting that the sequestration of MBNL1 is the main cause of heart dysfunction in DM1.

Based on this observation, a large screen for potential therapeutic compounds that inhibit the binding of MBNL1 to CUG repeats was performed [79]. The potential drugs were tested in vitro using a real-time fluorescence polarization/anisotropy assay that consisted of incubating drugs with fluorescently labeled 250 CUG repeats and with purified recombinant MBNL1. The difference between the fluorescence polarization of 250 CUG free in solution and 250 CUG in a complex with MBNL1 identified entities that interfered with MBNL1 binding to CUG repeats. The final screen of 12 preselected compounds in primary cultures of myoblasts from DM1 patients identified daunorubicin hydrochloride, an RNA intercalant that binds to and stabilizes CUG RNA structure, efficiently limiting MBNL1 binding [79].

Interestingly, when DM1 flies carrying 250 CUG repeats were fed daunorubicin, Mbl was homogeneously distributed in the nuclei of cardiomyocytes, and ribonuclear foci were reduced, confirming the efficiency of this substance in inhibiting the binding of Mbl to CUG repeats [79]. The analysis of the cardiac physiology of DM1 flies showed that daunorubicin treatment led to a greater improvement in heart performance than treatment by pentamidine, another anti-DM1 drug [79]. Both substances were able to rescue arrhythmias and heart contractility, but daunorubicin was more efficient in restoring DM1 systolic and diastolic heart functions [78,79]. These studies thus demonstrate that the fruit fly heart can offer a good in vivo system to dissect heart dysfunctions in DM1 and identify potential therapeutic compounds.

## 5. Conclusions

The early stages of development of both the *Drosophila* and vertebrate heart show remarkable similarities, with conserved genes that control early cardiogenesis. This makes the fly heart a model system well suited to studying cardiogenic pathways, and

also to identifying the genes involved in complex and highly heterogeneous congenital heart disorders (CHDs).

Despite morphological differences, the fly heart also offers an attractive model to study mechanisms controlling cardiac function and associated disorders. The *Drosophila* model has helped to identify novel genes and pathways involved in arrhythmias [47], atrial fibrillation [80], and channelopathies [81]. It has also been applied to modeling cardiac aging [51], and cardiomyopathies including dilated [82–87], hypertrophic [88–90], and restrictive cardiomyopathy [82,91,92], in which heart failure could occur [43]. Finally, the developed *Drosophila* models of muscular diseases with cardiac symptoms such as DM1 have been instrumental in dissecting the gene deregulations underlying heart defects and in identifying new therapeutic strategies.

**Author Contributions:** A.S.; writing-original draft preparation, K.J.; writing-review and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the strategic grant MyoNeurAlp allocated by the French Association against Myopathies (AFM-Telethon).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Brand, A.H.; Perrimon, N. Targeted Gene Expression as a Means of Altering Cell Fates and Generating Dominant Phenotypes. *Development* **1993**, *118*, 401–415.
- Gratz, S.J.; Harrison, M.M.; Wildonger, J.; O'Connor-Giles, K.M. Precise Genome Editing of *Drosophila* with CRISPR RNA-Guided Cas9. *Methods Mol Biol* **2015**, *1311*, 335–348, doi:10.1007/978-1-4939-2687-9\_22.
- Housden; Hu, Y.; Perrimon, N. Design and Generation of *Drosophila* Single Guide RNA Expression Constructs. *Cold Spring Harb Protoc* **2016**, *2016*, doi:10.1101/pdb.prot090779.
- Port, F.; Strein, C.; Stricker, M.; Rauscher, B.; Heigwer, F.; Zhou, J.; Beyersdörffer, C.; Frei, J.; Hess, A.; Kern, K.; et al. A Large-Scale Resource for Tissue-Specific CRISPR Mutagenesis in *Drosophila*. *eLife* **2020**, *9*, e53865, doi:10.7554/eLife.53865.
- Hu, Y.; Comjean, A.; Rodiger, J.; Liu, Y.; Gao, Y.; Chung, V.; Zirin, J.; Perrimon, N.; Mohr, S.E. FlyRNAi.Org—the Database of the *Drosophila* RNAi Screening Center and Transgenic RNAi Project: 2021 Update. *Nucleic Acids Res* **2021**, *49*, D908–D915, doi:10.1093/nar/gkaa936.
- Adams, M.D.; Celniker, S.E.; Holt, R.A.; Evans, C.A.; Gocayne, J.D.; Amanatides, P.G.; Scherer, S.E.; Li, P.W.; Hoskins, R.A.; Galle, R.F.; et al. The Genome Sequence of *Drosophila Melanogaster*. *Science* **2000**, *287*, 2185–2195, doi:10.1126/science.287.5461.2185.
- Reiter, L.T.; Potocki, L.; Chien, S.; Gribskov, M.; Bier, E. A Systematic Analysis of Human Disease-Associated Gene Sequences in *Drosophila Melanogaster*. *Genome Res.* **2001**, *11*, 1114–1125, doi:10.1101/gr.169101.
- Bodmer, R.; Venkatesh, T.V. Heart Development in *Drosophila* and Vertebrates: Conservation of Molecular Mechanisms. *Developmental Genetics* **1998**, *22*, 181–186, doi:https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6408(1998)22:3<181::AID-DVG1>3.0.CO;2-2.
- Rugendorff, A.; Younossi-Hartenstein, A.; Hartenstein, V. Embryonic Origin and Differentiation of the *Drosophila* Heart. *Roux's Arch Dev Biol* **1994**, *203*, 266–280, doi:10.1007/BF00360522.
- Wu, X.; Golden, K.; Bodmer, R. Heart Development in *Drosophila* Requires the Segment Polarity Gene Wingless. *Developmental Biology* **1995**, *169*, 619–628, doi:10.1006/dbio.1995.1174.
- Zmojdian, M.; Ponte, J.P.D.; Jagla, K. Cellular Components and Signals Required for the Cardiac Outflow Tract Assembly in *Drosophila*. *PNAS* **2008**, *105*, 2475–2480, doi:10.1073/pnas.0706402105.
- Lockwood, W.K.; Bodmer, R. The Patterns of Wingless, Decapentaplegic, and Tinman Position the *Drosophila* Heart. *Mechanisms of Development* **2002**, *114*, 13–26, doi:10.1016/S0925-4773(02)00044-8.

13. Klinedinst, S.L.; Bodmer, R. Gata Factor Pannier Is Required to Establish Competence for Heart Progenitor Formation. *Development* **2003**, *130*, 3027–3038, doi:10.1242/dev.00517.
14. Haack, T.; Schneider, M.; Schwendele, B.; Renault, A.D. Drosophila Heart Cell Movement to the Midline Occurs through Both Cell Autonomous Migration and Dorsal Closure. *Developmental Biology* **2014**, *396*, 169–182, doi:10.1016/j.ydbio.2014.08.033.
15. Zaffran Stéphane; Frasch Manfred Early Signals in Cardiac Development. *Circulation Research* **2002**, *91*, 457–469, doi:10.1161/01.RES.0000034152.74523.A8.
16. Jagla, K.; Frasch, M.; Jagla, T.; Dretzen, G.; Bellard, F.; Bellard, M. Ladybird, a New Component of the Cardio-genic Pathway in Drosophila Required for Diversification of Heart Precursors. *Development* **1997**, *124*, 3471–3479, doi:10.1242/dev.124.18.3471.
17. Gajewski, K. D-Mef2 Is a Target for Tinman Activation during Drosophila Heart Development. *The EMBO Journal* **1997**, *16*, 515–522, doi:10.1093/emboj/16.3.515.
18. Monier, B.; Astier, M.; Sémériva, M.; Perrin, L. Steroid-Dependent Modification of Hox Function Drives Myocyte Reprogramming in the Drosophila Heart. *Development* **2005**, *132*, 5283–5293, doi:10.1242/dev.02091.
19. Perrin, L.; Monier, B.; Ponzelli, R.; Astier, M.; Semeriva, M. Drosophila Cardiac Tube Organogenesis Requires Multiple Phases of Hox Activity. *Developmental Biology* **2004**, *272*, 419–431, doi:10.1016/j.ydbio.2004.04.036.
20. Ryan, K.M.; Hoshizaki, D.K.; Cripps, R.M. Homeotic Selector Genes Control the Patterning of Seven-up Expressing Cells in the Drosophila Dorsal Vessel. *Mechanisms of Development* **2005**, *122*, 1023–1033, doi:10.1016/j.mod.2005.04.007.
21. Lovato, T.L.; Nguyen, T.P.; Molina, M.R.; Cripps, R.M. The Hox Gene Abdominal-A Specifies Heart Cell Fate in TheDrosophila Dorsal Vessel. *Development* **2002**, *129*, 5019–5027, doi:10.1242/dev.129.21.5019.
22. Shah, A.P.; Nongthomba, U.; Kelly Tanaka, K.K.; Denton, M.L.B.; Meadows, S.M.; Bancroft, N.; Molina, M.R.; Cripps, R.M. Cardiac Remodeling in Drosophila Arises from Changes in Actin Gene Expression and from a Contribution of Lymph Gland-like Cells to the Heart Musculature. *Mech Dev* **2011**, *128*, 222–233, doi:10.1016/j.mod.2011.01.001.
23. Curtis, N.J.; Ringo, J.M.; Dowse, H.B. Morphology of the Pupal Heart, Adult Heart, and Associated Tissues in the Fruit Fly, *Drosophila Melanogaster*. *Journal of Morphology* **1999**, *240*, 225–235, doi:https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4687(199906)240:3<225::AID-JMOR2>3.0.CO;2-V.
24. Frasch, M. Genome-Wide Approaches to Drosophila Heart Development. *Journal of Cardiovascular Development and Disease* **2016**, *3*, 20, doi:10.3390/jcdd3020020.
25. Bulatovic, I.; Månsson-Broberg, A.; Sylvén, C.; Grinnemo, K.-H. Human Fetal Cardiac Progenitors: The Role of Stem Cells and Progenitors in the Fetal and Adult Heart. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* **2016**, *31*, 58–68, doi:10.1016/j.bpobgyn.2015.08.008.
26. Moorman, A.; Webb, S.; Brown, N.A.; Lamers, W.; Anderson, R.H. DEVELOPMENT OF THE HEART: (1) FORMATION OF THE CARDIAC CHAMBERS AND ARTERIAL TRUNKS. *Heart* **2003**, *89*, 806–814.
27. Lamers, W.H.; Moorman, A.F.M. Cardiac Septation. *Circulation Research* **2002**, *91*, 93–103, doi:10.1161/01.RES.0000027135.63141.89.
28. Bodmer, R. Heart Development in Drosophila and Its Relationship to Vertebrates. *Trends Cardiovasc. Med.* **1995**, *5*, 21–28, doi:10.1016/1050-1738(94)00032-Q.
29. Ahmad, S.M. Conserved Signaling Mechanisms in *Drosophila* Heart Development: Signaling Mechanisms in *Drosophila* CARDIOGENESIS. *Dev. Dyn.* **2017**, *246*, 641–656, doi:10.1002/dvdy.24530.
30. Zikova, M.; Ponte, J.-P.D.; Dastugue, B.; Jagla, K. Patterning of the Cardiac Outflow Region in Drosophila. *PNAS* **2003**, *100*, 12189–12194, doi:10.1073/pnas.2133156100.
31. Sieber-Blum, M. Cardiac Neural Crest Stem Cells. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* **2004**, *276A*, 34–42, doi:10.1002/ar.a.10132.
32. Rotstein, B.; Paululat, A. On the Morphology of the Drosophila Heart. *Journal of Cardiovascular Development and Disease* **2016**, *3*, 15, doi:10.3390/jcdd3020015.
33. Bodmer, R. The Gene Tinman Is Required for Specification of the Heart and Visceral Muscles in Drosophila. *Development* **1993**, *118*, 719–729.
34. Lyons, I.; Parsons, L.M.; Hartley, L.; Li, R.; Andrews, J.E.; Robb, L.; Harvey, R.P. Myogenic and Morphogenetic Defects in the Heart Tubes of Murine Embryos Lacking the Homeo Box Gene Nkx2-5. *Genes Dev.* **1995**, *9*, 1654–1666, doi:10.1101/gad.9.13.1654.

35. Lilly, B.; Zhao, B.; Ranganayakulu, G.; Paterson, B.M.; Schulz, R.A.; Olson, E.N. Requirement of MADS Domain Transcription Factor D-MEF2 for Muscle Formation in *Drosophila*. *Science* **1995**, *267*, 688–693, doi:10.1126/science.7839146.
36. Lo, P.C.H.; Zaffran, S.; Sénatore, S.; Frasch, M. The *Drosophila* Hand Gene Is Required for Remodeling of the Developing Adult Heart and Midgut during Metamorphosis. *Dev Biol* **2007**, *311*, 287–296, doi:10.1016/j.ydbio.2007.08.024.
37. Firulli, A.B.; McFadden, D.G.; Lin, Q.; Srivastava, D.; Olson, E.N. Heart and Extra-Embryonic Mesodermal Defects in Mouse Embryos Lacking the BHLH Transcription Factor Hand1. *Nat Genet* **1998**, *18*, 266–270, doi:10.1038/ng0398-266.
38. Shi, Y.; Katsev, S.; Cai, C.; Evans, S. BMP Signaling Is Required for Heart Formation in Vertebrates. *Dev Biol* **2000**, *224*, 226–237, doi:10.1006/dbio.2000.9802.
39. Lawrence, P.A.; Bodmer, R.; Vincent, J.-P. Segmental Patterning of Heart Precursors in *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)* **1996**, *121*, 4303–8.
40. Tian, Y.; Cohen, E.D.; Morrisey, E.E. The Importance of Wnt Signaling in Cardiovascular Development. *Pediatr Cardiol* **2010**, *31*, 342–348, doi:10.1007/s00246-009-9606-z.
41. Ai, D.; Fu, X.; Wang, J.; Lu, M.-F.; Chen, L.; Baldini, A.; Klein, W.H.; Martin, J.F. Canonical Wnt Signaling Functions in Second Heart Field to Promote Right Ventricular Growth. *PNAS* **2007**, *104*, 9319–9324.
42. Blice-Baum, A.C.; Guida, M.C.; Hartley, P.S.; Adams, P.D.; Bodmer, R.; Cammarato, A. As Time Flies by: Investigating Cardiac Aging in the Short-Lived *Drosophila* Model. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **2019**, *1865*, 1831–1844, doi:10.1016/j.bbadis.2018.11.010.
43. Zhu, S.; Han, Z.; Luo, Y.; Chen, Y.; Zeng, Q.; Wu, X.; Yuan, W. Molecular Mechanisms of Heart Failure: Insights from *Drosophila*. *Heart Fail Rev* **2017**, *22*, 91–98, doi:10.1007/s10741-016-9590-3.
44. Paternostro, G.; Vignola, C.; Bartsch, D.-U.; Omens, J.H.; McCulloch, A.D.; Reed, J.C. Age-Associated Cardiac Dysfunction in *Drosophila Melanogaster*. *Circulation Research* **2001**, *88*, 1053–1058, doi:10.1161/hh1001.090857.
45. Fleg, J.L.; O'Connor, F.; Gerstenblith, G.; Becker, L.C.; Clulow, J.; Schulman, S.P.; Lakatta, E.G. Impact of Age on the Cardiovascular Response to Dynamic Upright Exercise in Healthy Men and Women. *J Appl Physiol (1985)* **1995**, *78*, 890–900, doi:10.1152/jappl.1995.78.3.890.
46. Cannon, L.; Zambon, A.C.; Cammarato, A.; Zhang, Z.; Vogler, G.; Munoz, M.; Taylor, E.; Cartry, J.; Bernstein, S.I.; Melov, S.; et al. Expression Patterns of Cardiac Aging in *Drosophila*. *Aging Cell* **2017**, *16*, 82–92, doi:10.1111/accel.12559.
47. Ocorr, K.; Reeves, N.L.; Wessells, R.J.; Fink, M.; Chen, H.-S.V.; Akasaka, T.; Yasuda, S.; Metzger, J.M.; Giles, W.; Posakony, J.W.; et al. KCNQ Potassium Channel Mutations Cause Cardiac Arrhythmias in *Drosophila* That Mimic the Effects of Aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 3943–3948, doi:10.1073/pnas.0609278104.
48. Wessells, R.; Fitzgerald, E.; Piazza, N.; Ocorr, K.; Morley, S.; Davies, C.; Lim, H.-Y.; Mitchell, L.; Hayes, M.; Oldham, S.; et al. D4eBP Acts Downstream of Both DTOR and DFoxo to Modulate Cardiac Functional Aging in *Drosophila*. *Aging Cell* **2009**, *8*, 542–552, doi:10.1111/j.1474-9726.2009.00504.x.
49. Wessells, R.J.; Bodmer, R. Screening Assays for Heart Function Mutants in *Drosophila*. *BioTechniques* **2004**, *37*, 58–66, doi:10.2144/04371ST01.
50. Santalla, M.; Valverde, C.A.; Harnichar, E.; Lacunza, E.; Aguilar-Fuentes, J.; Mattiazzi, A.; Ferrero, P. Aging and CaMKII Alter Intracellular Ca<sup>2+</sup> Transients and Heart Rhythm in *Drosophila Melanogaster*. *PLoS One* **2014**, *9*, e101871, doi:10.1371/journal.pone.0101871.
51. Nishimura, M.; Ocorr, K.; Bodmer, R.; Cartry, J. *Drosophila* as a Model to Study Cardiac Aging. *Exp Gerontol* **2011**, *46*, 326–330, doi:10.1016/j.exger.2010.11.035.
52. Olson, T.M.; Illenberger, S.; Kishimoto, N.Y.; Huttelmaier, S.; Keating, M.T.; Jockusch, B.M. Metavinculin Mutations Alter Actin Interaction in Dilated Cardiomyopathy. *Circulation* **2002**, *105*, 431–437, doi:10.1161/hc0402.102930.
53. Kaushik, G.; Spenlehauer, A.; Sessions, A.O.; Trujillo, A.S.; Fuhrmann, A.; Fu, Z.; Venkatraman, V.; Pohl, D.; Tuler, J.; Wang, M.; et al. Vinculin Network-Mediated Cytoskeletal Remodeling Regulates Contractile Function in the Aging Heart. *Sci Transl Med* **2015**, *7*, 292ra99, doi:10.1126/scitranslmed.aaa5843.
54. Albert, T.K.; Lemaire, M.; van Berkum, N.L.; Gentz, R.; Collart, M.A.; Timmers, H.T. Isolation and Characterization of Human Orthologs of Yeast CCR4-NOT Complex Subunits. *Nucleic Acids Res* **2000**, *28*, 809–817, doi:10.1093/nar/28.3.809.

55. Neely, G.G.; Kuba, K.; Cammarato, A.; Isobe, K.; Amann, S.; Zhang, L.; Murata, M.; Elmen, L.; Gupta, V.; Arora, S.; et al. A Global *In Vivo* Drosophila RNAi Screen Identifies NOT3 as a Conserved Regulator of Heart Function. *Cell* **2010**, *141*, 142–153, doi:10.1016/j.cell.2010.02.023.
56. Reller, M.D.; Strickland, M.J.; Riehle-Colarusso, T.; Mahle, W.T.; Correa, A. Prevalence of Congenital Heart Defects in Metropolitan Atlanta, 1998–2005. *J Pediatr* **2008**, *153*, 807–813, doi:10.1016/j.jpeds.2008.05.059.
57. Cowan, J.R.; Ware, S.M. Genetics and Genetic Testing in Congenital Heart Disease. *Clin Perinatol* **2015**, *42*, 373–393, ix, doi:10.1016/j.clp.2015.02.009.
58. Bruce Gelb; Gelb, B.; Brueckner, M.; Chung, W.; Goldmuntz, E.; Kaltman, J.; Kaski, J.P.; Kim, R.; Kline, J.; Mercer-Rosa, L.; et al. The Congenital Heart Disease Genetic Network Study: Rationale, Design, and Early Results. *Circ Res* **2013**, *112*, 698–706, doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.300297.
59. Rufaihah, A.J.; Chen, C.K.; Yap, C.H.; Mattar, C.N.Z. Mending a Broken Heart: *In Vitro*, *In Vivo* and *In Silico* Models of Congenital Heart Disease. *Dis Model Mech* **2021**, *14*, dmm047522, doi:10.1242/dmm.047522.
60. Zhu, J.; Fu, Y.; Nettleton, M.; Richman, A.; Han, Z. High Throughput *In Vivo* Functional Validation of Candidate Congenital Heart Disease Genes in Drosophila. *eLife* **2017**, *6*, e22617, doi:10.7554/eLife.22617.
61. Schroeder, A.M.; Allahyari, M.; Vogler, G.; Missinato, M.A.; Nielsen, T.; Yu, M.S.; Theis, J.L.; Larsen, L.A.; Goyal, P.; Rosenfeld, J.A.; et al. Model System Identification of Novel Congenital Heart Disease Gene Candidates: Focus on RPL13. *Hum Mol Genet* **2019**, *28*, 3954–3969, doi:10.1093/hmg/ddz213.
62. Theadom, A.; Rodrigues, M.; Roxburgh, R.; Balalla, S.; Higgins, C.; Bhattacharjee, R.; Jones, K.; Krishnamurthi, R.; Feigin, V. Prevalence of Muscular Dystrophies: A Systematic Literature Review. *NED* **2014**, *43*, 259–268, doi:10.1159/000369343.
63. Meola, G.; Cardani, R. Myotonic Dystrophies: An Update on Clinical Aspects, Genetic, Pathology, and Molecular Pathomechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **2015**, *1852*, 594–606, doi:10.1016/j.bbadis.2014.05.019.
64. Mathieu, J.; Allard, P.; Potvin, L.; Prévost, C.; Bégin, P. A 10-Year Study of Mortality in a Cohort of Patients with Myotonic Dystrophy. *Neurology* **1999**, *52*, 1658–1662, doi:10.1212/wnl.52.8.1658.
65. Buxton, J.; Shelbourne, P.; Davies, J.; Jones, C.; Tongeren, T.V.; Aslanidis, C.; Jong, P. de; Jansen, G.; Anvret, M.; Riley, B.; et al. Detection of an Unstable Fragment of DNA Specific to Individuals with Myotonic Dystrophy. *Nature* **1992**, *355*, 547–548, doi:10.1038/355547a0.
66. Fardaei, M.; Rogers, M.T.; Thorpe, H.M.; Larkin, K.; Hamshere, M.G.; Harper, P.S.; Brook, J.D. Three Proteins, MBNL, MBLL and MBXL, Co-Localize *In Vivo* with Nuclear Foci of Expanded-Repeat Transcripts in DM1 and DM2 Cells. *Hum Mol Genet* **2002**, *11*, 805–814, doi:10.1093/hmg/11.7.805.
67. Fardaei, M.; Larkin, K.; Brook, J.D.; Hamshere, M.G. *In Vivo* Co-Localisation of MBNL Protein with DMPK Expanded-Repeat Transcripts. *Nucleic Acids Res* **2001**, *29*, 2766–2771.
68. Kuyumcu-Martinez, N.M.; Wang, G.-S.; Cooper, T.A. Increased Steady State Levels of CUGBP1 in Myotonic Dystrophy 1 Are Due to PKC-Mediated Hyper-Phosphorylation. *Mol Cell* **2007**, *28*, 68–78, doi:10.1016/j.molcel.2007.07.027.
69. Lee, J.E.; Cooper, T.A. Pathogenic Mechanisms of Myotonic Dystrophy. *Biochem Soc Trans* **2009**, *37*, doi:10.1042/BST0371281.
70. Lund, M.; Diaz, L.J.; Ranthe, M.F.; Petri, H.; Duno, M.; Juncker, I.; Eiberg, H.; Vissing, J.; Bundgaard, H.; Wohlfahrt, J.; et al. Cardiac Involvement in Myotonic Dystrophy: A Nationwide Cohort Study. *European Heart Journal* **2014**, *35*, 2158–2164, doi:10.1093/eurheartj/ehu157.
71. Benhayon, D.; Lugo, R.; Patel, R.; Carballeira, L.; Elman, L.; Cooper, J.M. Long-Term Arrhythmia Follow-up of Patients with Myotonic Dystrophy. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **2015**, *26*, 305–310, doi:10.1111/jce.12604.
72. Nguyen, H.H.; Wolfe, J.T.; Holmes, D.R.; Edwards, W.D. Pathology of the Cardiac Conduction System in Myotonic Dystrophy: A Study of 12 Cases. *J. Am. Coll. Cardiol.* **1988**, *11*, 662–671.
73. Plantié, E.; Migocka-Patrzałek, M.; Daczevska, M.; Jagła, K. Model Organisms in the Fight against Muscular Dystrophy: Lessons from Drosophila and Zebrafish. *Molecules* **2015**, *20*, 6237–6253, doi:10.3390/molecules20046237.
74. Souidi, A.; Zmojdian, M.; Jagła, K. Dissecting Pathogenetic Mechanisms and Therapeutic Strategies in Drosophila Models of Myotonic Dystrophy Type 1. *Int J Mol Sci* **2018**, *19*, E4104, doi:10.3390/ijms19124104.
75. Ocorr, K.; Fink, M.; Cammarato, A.; Bernstein, S.I.; Bodmer, R. Semi-Automated Optical Heartbeat Analysis of Small Hearts. *J Vis Exp* **2009**, doi:10.3791/1435.

76. Auxerre-Plantié, E.; Nakamori, M.; Renaud, Y.; Huguet, A.; Choquet, C.; Dondi, C.; Miquerol, L.; Takahashi, M.P.; Gourdon, G.; Junion, G.; et al. Straightjacket/A2δ3 Deregulation Is Associated with Cardiac Conduction Defects in Myotonic Dystrophy Type 1. *eLife* **2019**, *8*, e51114, doi:10.7554/eLife.51114.
77. Picchio, L.; Plantie, E.; Renaud, Y.; Poovthumkadavil, P.; Jagla, K. Novel Drosophila Model of Myotonic Dystrophy Type 1: Phenotypic Characterization and Genome-Wide View of Altered Gene Expression. *Hum Mol Genet* **2013**, *22*, 2795–2810, doi:10.1093/hmg/ddt127.
78. Chakraborty, M.; Selma-Soriano, E.; Magny, E.; Couso, J.P.; Pérez-Alonso, M.; Charlet-Berguerand, N.; Artero, R.; Llamusi, B. Pentamidine Rescues Contractility and Rhythmicity in a Drosophila Model of Myotonic Dystrophy Heart Dysfunction. *Disease Models & Mechanisms* **2015**, *8*, 1569–1578, doi:10.1242/dmm.021428.
79. Chakraborty, M.; Sellier, C.; Ney, M.; Pascal, V.; Charlet-Berguerand, N.; Artero, R.; Llamusi, B. Daunorubicin Reduces MBNL1 Sequestration Caused by CUG-Repeat Expansion and Rescues Cardiac Dysfunctions in a Drosophila Model of Myotonic Dystrophy. *Dis Model Mech* **2018**, *11*, dmm032557, doi:10.1242/dmm.032557.
80. Zhang, D.; Ke, L.; Mackovicova, K.; Van Der Want, J.J.L.; Sibon, O.C.M.; Tanguay, R.M.; Morrow, G.; Henning, R.H.; Kampinga, H.H.; Brundel, B.J.J.M. Effects of Different Small HSPB Members on Contractile Dysfunction and Structural Changes in a Drosophila Melanogaster Model for Atrial Fibrillation. *J Mol Cell Cardiol* **2011**, *51*, 381–389, doi:10.1016/j.yjmcc.2011.06.008.
81. Taghli-Lamallem, O.; Plantié, E.; Jagla, K. Drosophila in the Heart of Understanding Cardiac Diseases: Modeling Channelopathies and Cardiomyopathies in the Fruitfly. *Journal of Cardiovascular Development and Disease* **2016**, *3*, 7, doi:10.3390/jcdd3010007.
82. Bloemink, M.J.; Melkani, G.C.; Dambacher, C.M.; Bernstein, S.I.; Geeves, M.A. Two Drosophila Myosin Transducer Mutants with Distinct Cardiomyopathies Have Divergent ADP and Actin Affinities \*. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286*, 28435–28443, doi:10.1074/jbc.M111.258228.
83. Cozhimuttam Viswanathan, M.; Kaushik, G.; Engler, A.J.; Lehman, W.; Cammarato, A. A Drosophila Melanogaster Model of Diastolic Dysfunction and Cardiomyopathy Based on Impaired Troponin-T Function. *Circulation Research* **2014**, *114*, e6–e17, doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.302028.
84. Kim, I.-M.; Wolf, M.J. Serial Examination of an Inducible and Reversible Dilated Cardiomyopathy in Individual Adult Drosophila. *PLOS ONE* **2009**, *4*, e7132, doi:10.1371/journal.pone.0007132.
85. Selma-Soriano, E.; Casillas-Serra, C.; Artero, R.; Llamusi, B.; Navarro, J.A.; Redón, J. Rabphilin Silencing Causes Dilated Cardiomyopathy in a Drosophila Model of Nephrocyte Damage. *Sci Rep* **2021**, *11*, 15287, doi:10.1038/s41598-021-94710-7.
86. Taghli-Lamallem, O.; Akasaka, T.; Hogg, G.; Nudel, U.; Yaffe, D.; Chamberlain, J.S.; Ocorr, K.; Bodmer, R. Dystrophin Deficiency in Drosophila Reduces Lifespan and Causes a Dilated Cardiomyopathy Phenotype. *Aging Cell* **2008**, *7*, 237–249, doi:10.1111/j.1474-9726.2008.00367.x.
87. Wolf, M.J. Modeling Dilated Cardiomyopathies in Drosophila. *Trends Cardiovasc Med* **2012**, *22*, 55–61, doi:10.1016/j.tcm.2012.06.012.
88. Bell, K.M.; Kronert, W.A.; Huang, A.; Bernstein, S.I.; Swank, D.M. The R249Q Hypertrophic Cardiomyopathy Myosin Mutation Decreases Contractility in Drosophila by Impeding Force Production. *J Physiol* **2019**, *597*, 2403–2420, doi:10.1113/JP277333.
89. Kronert, W.A.; Bell, K.M.; Viswanathan, M.C.; Melkani, G.C.; Trujillo, A.S.; Huang, A.; Melkani, A.; Cammarato, A.; Swank, D.M.; Bernstein, S.I. Prolonged Cross-Bridge Binding Triggers Muscle Dysfunction in a Drosophila Model of Myosin-Based Hypertrophic Cardiomyopathy. *eLife* **2018**, *7*, e38064, doi:10.7554/eLife.38064.
90. Tallo, C.A.; Duncan, L.H.; Yamamoto, A.H.; Slaydon, J.D.; Arya, G.H.; Turlapati, L.; Mackay, T.F.C.; Carbone, M.A. Heat Shock Proteins and Small Nucleolar RNAs Are Dysregulated in a Drosophila Model for Feline Hypertrophic Cardiomyopathy. *G3 Genes | Genomes | Genetics* **2021**, *11*, doi:10.1093/g3journal/jkaa014.
91. Achal, M.; Trujillo, A.S.; Melkani, G.C.; Farman, G.P.; Ocorr, K.; Viswanathan, M.C.; Kaushik, G.; Newhard, C.S.; Glasheen, B.M.; Melkani, A.; et al. A Restrictive Cardiomyopathy Mutation in an Invariant Proline at the Myosin Head/Rod Junction Enhances Head Flexibility and Function, Yielding Muscle Defects in Drosophila. *Journal of Molecular Biology* **2016**, *428*, 2446–2461, doi:10.1016/j.jmb.2016.04.021.
92. Cammarato, A.; Alayari, N.N.; Gucek, M.; Reedy, M.C.; Rucker, J.; Eyk, J.E.V.; Cole, R.N.; O'Rourke, B.; Bodmer, R.; Bernstein, S.I.; et al. A Systems Biology Approach to Restrictive Cardiomyopathy in Drosophila. *Biophysical Journal* **2010**, *98*, 717a–718a, doi:10.1016/j.bpj.2009.12.3933.



# Analyse de miR-1 et de sa cible potentielle Multiplexin dérégulés dans la dystrophie myotonique type 1

Anissa Souidi, Monika Zmojdzian, Émilie Plantié, Yoan Renaud, Coralie Gimonnet, Krzysztof Jagla

La dystrophie myotonique de type 1 (DM1), une des maladies neuromusculaires les plus fréquentes chez l'adulte, à transmission autosomique dominante, est une maladie multisystémique caractérisée par une myotonie, une cataracte, une atrophie testiculaire et des troubles cardiaques tels que les complications de conduction, les arythmies et la cardiomyopathie dilatée. La DM1 est causée par une expansion de répétitions CTG dans la région 3'UTR du gène *Dmpk* (*dystrophia myotonica protein kinase*). Le nombre de ces répétitions varie entre 5 et 37 chez les personnes saines, et entre 50 et 4 000 chez les patients DM1 [1]. Les transcrits mutés *Dmpk* forment des foci nucléaires qui séquestrent MBNL1 (*Muscleblind-like 1*) [2] et stabilisent CELF1 (*Elav-Like Factor 1*) [3], deux facteurs d'épissage alternatif qui se fixent sur les régions 3'UTR de leurs gènes cibles. MBNL1 régule la maturation de *miR-1*, un microARN conservé, important pour la cardiogénèse et connu pour réguler des gènes codant des canaux potassiques et calciques dans le cœur [4]. Il est fortement diminué dans les modèles DM1 de drosophile et aussi dans les muscles squelettique et cardiaque des patients DM1 [5]. L'objectif de notre étude est d'appliquer le modèle drosophilien pour effectuer une analyse fonctionnelle de *miR-1* et de sa cible potentielle Multiplexin et de leurs implications dans les défauts cardiaques associés à la DM1. *Mp*, orthologue du collagène XV/XVIII chez les mammifères, est fortement dérégulée dans la DM1. Tout d'abord nous avons analysé l'effet de l'inhibition de *miR-1* au niveau du cœur d'une part sur la structure et la physiologie cardiaque par l'approche SOHA (*Semi-intact Optical Heartbeat Analysis*) et d'autre part sur l'expression de *Mp* par immunomarquage. Ensuite nous avons analysé la fonction de *Mp* dans la

physiologie cardiaque en utilisant des lignées *Mp RNAi*. Les résultats montrent une augmentation de l'expression de *Mp* dans le contexte DM1 et une diminution de la taille du cœur et des arythmies cardiaques dans le contexte perte de fonction *Mp*, suggérant l'importance de la régulation de *Mp* dans le maintien de la structure et de la physiologie cardiaque et son implication probable dans les complications cardiaques associées à la DM1. La perte de fonction *miR-1* au niveau cardiaque cause une cardiomyopathie dilatée accompagnée d'une augmentation de l'expression de *Mp*, similaire aux symptômes DM1. L'ensemble des résultats suggèrent que la dérégulation de *Mp*, dépendante de *miR-1*, contribue aux défauts cardiaques observés dans la DM1.

## Analysis of miR-1 and its potential target Multiplexin deregulated in myotonic dystrophy type 1

### LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

### RÉFÉRENCES

1. Meola G, Cardani R. Myotonic dystrophies: an update on clinical aspects, genetic, pathology, and molecular pathomechanisms. *Biochim Biophys Acta* 2015 ; 1852 : 594-606.
2. Mankodi A, Urbinati CR, Yuan QP, et al. Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2. *Hum Mol Genet* 2001 ; 10 : 2165-70.
3. Kim YK, Mandal M, Yadava RS, et al. Evaluating the effects of CELF1 deficiency in a mouse model of RNA toxicity. *Hum Mol Genet* 2014 ; 23 : 293-302.
4. Rau F, Freyermuth F, Fugier C, et al. Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy. *Nat Struct Mol Biol* 2011 ; 18 : 840-5.
5. Fernandez-Costa M, Garcia-Lopez A, Zuñiga S, et al. Expanded CTG repeats trigger miRNA alterations in Drosophila that are conserved in myotonic dystrophy type 1 patients. *Hum Mol Genet* 2013 ; 22 : 704-16.

Anissa Souidi  
Monika Zmojdzian  
Émilie Plantié  
Yoan Renaud  
Coralie Gimonnet  
Krzysztof Jagla  
GReD, Inserm U1103,  
CNRS, UMR6293,  
Université Clermont  
Auvergne,  
Clermont-Ferrand, France  
Contact  
christophe.jagla@uca.fr

INFOS

# Analysis of *miR-1* and its potential target Multiplexin deregulated in myotonic dystrophy type 1 (DM1)



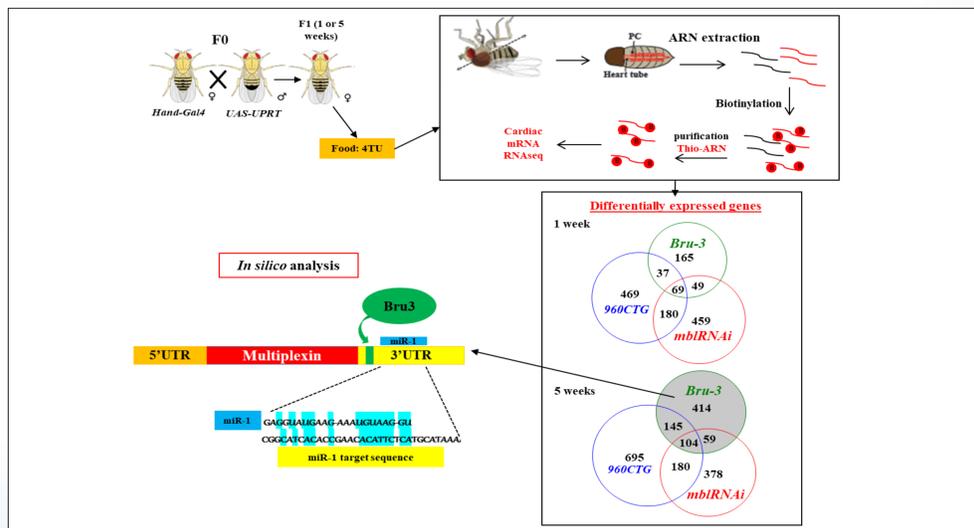
Anissa SOUIDI, Monika ZMOJDZIAN, Emilie PLANTIÉ, Yoan RENAUD, Coralie GIMONNET and Krzysztof JAGLA

GReD, INSERM U1103, CNRS UMR6293, University of Clermont Auvergne, France



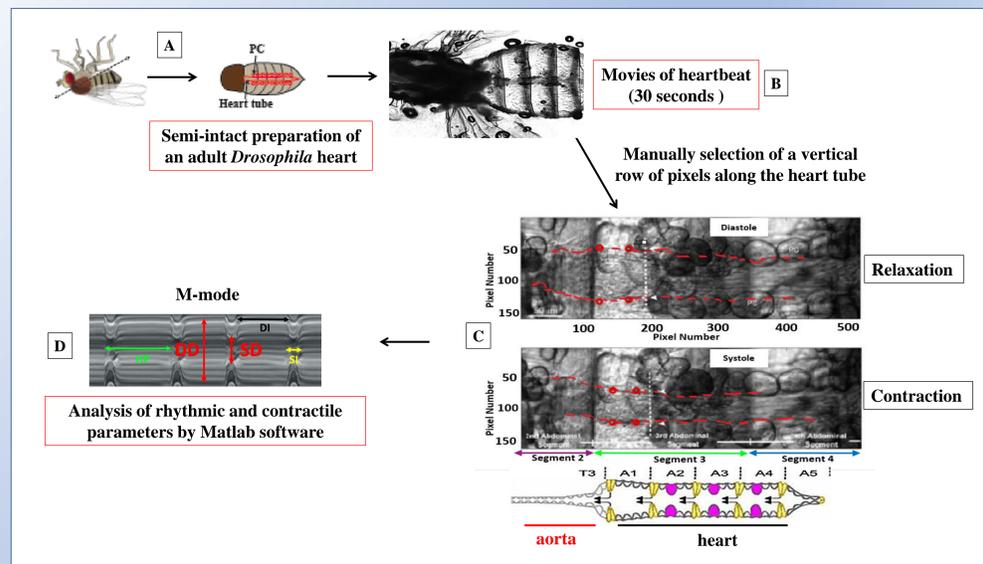
**Abstract :** Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is an autosomal dominant, multisystemic disease caused by an expansion of CTG repeats in 3'-untranslated region of the *dystrophia myotonica protein kinase* (*DMPK*) gene and leading to conduction defects and cardiac arrhythmias. Healthy individuals have between 5 and 37 CTG repeats, whereas the DM1-affected population carries expansions from 50 up to 4000 CTGs. The mutated *Dmpk* transcripts sequesters MBNL1 (Muscleblind-like 1) and stabilizes CELF1 (Elav-Like Factor 1) proteins, two alternative splicing factors that also bind to 3'UTR of their target genes. MBNL1 regulates the maturation of *miR-1*, conserved microRNA, involved in cardiogenesis and decreased in DM1 patient samples. In our study, we used *Drosophila* model to perform a functional analysis of *miR-1* and Multiplexin (Mp) (Collagen XV/XVIII in mammals), a potential *miR-1* target deregulated in DM1 context. First, we analyzed the effect of *miR-1* loss of function on the cardiac structure and physiology by the Semi-intact Optical Heartbeat Analysis (SOHA) approach and also on the expression of Mp by immunostaining. Second, we analyzed the Mp loss of function effect on the cardiac structure and physiology by using *Mp RNAi Drosophila* lines. Our results show an increase in Mp level in the DM1 context and reduced heart size and cardiac arrhythmias in the context of Mp loss of function, suggesting that regulation of Mp expression level is important for the structure and function of the heart and that Mp could be involved in heart defects associated with DM1. We also observed that *miR-1* loss of function in heart causes dilated cardiomyopathy and an increase in Mp expression, similar to DM1 symptoms. Altogether this suggests that *miR-1*-dependent deregulation of Mp is associated with the DM1 cardiac defects.

## Cardiac transcriptome analysis from TU-tagging RNA seq



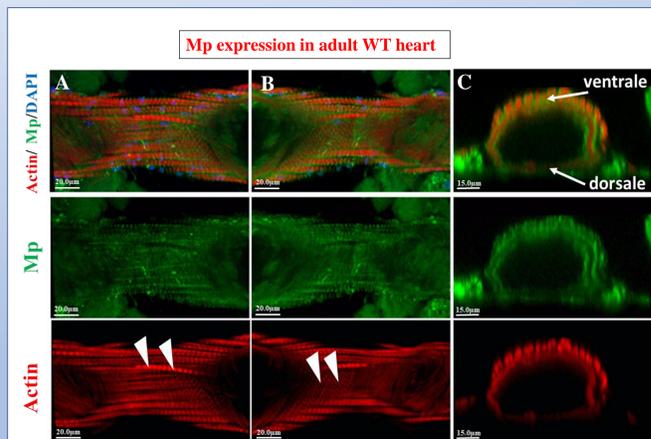
The heart targeting of TU-tagging technique consisted in crossing the *Hand-GAL4* line with *UAS-UPRT*. The UPRT enzyme (Uracil PhosphoRibosyl Transferase) will be expressed only in the cardiac tissue of the descendants (F1) according to cardiac driver (*Hand*). After the addition of the modified uracil (4-TU) in the food, the cardiac RNAs are modified by the incorporation of this modified uracil base into the neo-synthesized RNA. After extraction of the total RNAs, the modified RNAs are purified and then sequenced. Cardiac transcriptome analysis of *Drosophila* DM1 models (*Hand>Bru3/CELF1*, *Hand>mb1 RNAi/MBNL1*, *Hand>960CTG*) identified genes differentially expressed at one and five weeks of age. The *Multiplexin* "Mp" gene is strongly increased in *Hand>Bru3* context at 5 weeks. *In silico* analysis show that Mp is a potential target of *miR-1* and Bru3.

## Cardiac physiology analysis by SOHA (Semi-intact Optical Heartbeat Analysis) approach



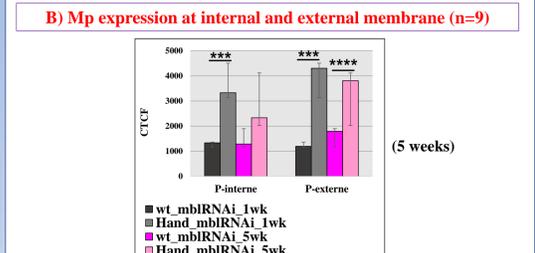
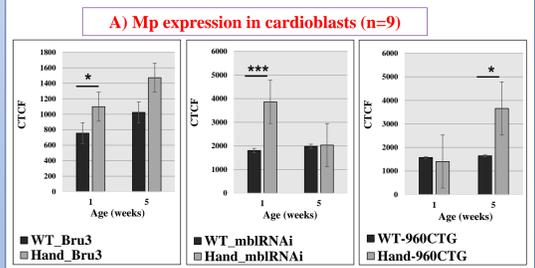
After dissection and preparation of semi-intact adult hearts (A), the heartbeats are filmed by a digital camera by zooming the A3 and A4 (B) segments. The cardiac tube membrane during maximum diastole and systole are defined manually. One pair of marks identifies the diastolic diameter and one pair identifies the systolic diameter (C). From this vertical row of pixels, an M-mode is generated to analyze the contraction and relaxation intervals (D): diastolic (DD), and systolic (SD) diameters, heart period (HP), and systolic (SI) and diastolic (DI) intervals.

## Mp protein is up regulated in DM1 context



Immunostaining of adult heart of WT line (anti-Mp antibodies): A) Confocal optical section at the level of longitudinal fibers. Arrows indicate longitudinal fibers. B) Confocal section at the level of circular fibers. Arrows indicate circular fibers. C) Cross section in the cardiac tube, obtained after 3D reconstruction with Imaparis software.

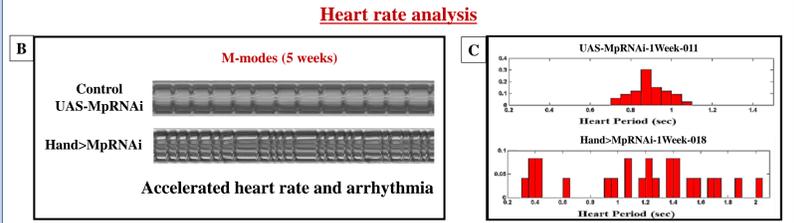
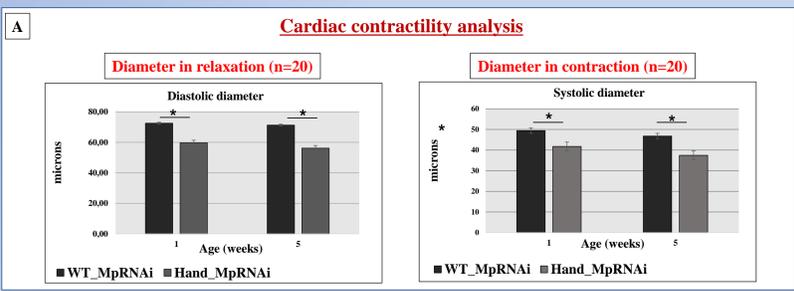
In physiological context, Mp covers internal and external membrane of cardiac tube. Mp is present in the circular (cardioblasts) and longitudinal fibers of the adult heart



A) Fluorescence signal intensity plots for Mp expression in cardioblasts in 3 DM1 *Drosophila* models (*Hand> Bru3*, *Hand> mblRNAi*, *Hand> 960CTG*). B) Fluorescence signal intensity plots for Mp at internal and external membrane in *Hand> mblRNAi* context

Mp protein is up regulated in DM1 context

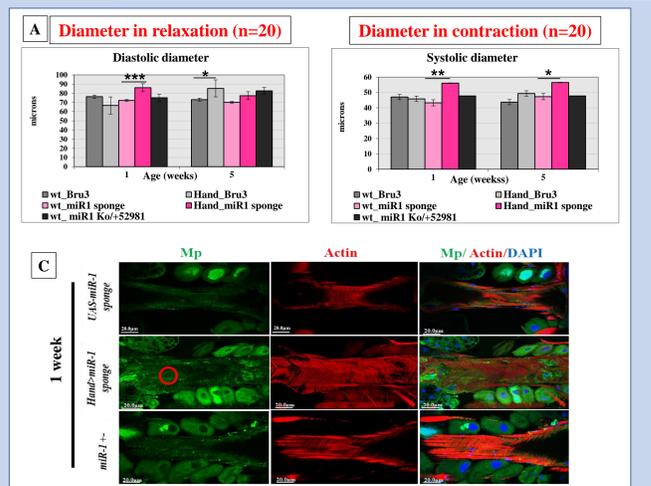
## Mp loss of function induces decrease in heart tube size and arrhythmias



A) *Hand>Mp RNAi* line shows a decrease in diastolic and systolic diameters. B) M-mode illustrating accelerated heart rate and arrhythmia in *Hand>Mp RNAi* line at 5 weeks of age. C) Distribution of heart periods for *Hand>Mp RNAi* line (at 1 week of age) for 30 sec movie shows an arrhythmia. *Hand>Mp RNAi* heart presents cardiac periods between 0.4 sec to 2 sec, while in control (*UAS-Mp RNAi*) heart period tends to have the same duration of about 0.9 sec

Mp loss of function in cardiac tissue affects the size of the heart tube, which is associated with contractility disorders and cardiac arrhythmias. Mp is critical in structure and cardiac function

## miR-1 loss of function induces dilated cardiomyopathy concomitant with an increase in Mp



A) *miR-1 sponge* line shows increased diastolic and systolic diameters similar to symptoms observed in *Hand>Bru3* model. B) Immunostaining of adult heart for *miR-1 sponge* line (anti-actin antibodies). *miR-1 sponge* line presents disorganization of cardiac muscle fibers in 1 & 5 weeks of age. C) Immunostaining of adult heart of *miR-1 sponge* & *miR-1/+* lines (anti-Mp antibodies) and its fluorescence signal intensity plots for cardioblasts at one week of age (D) showing Mp up regulation in *miR-1* loss of function context suggested probable regulation of Mp by *miR-1*

miR-1 loss of function in heart causes dilated cardiomyopathy and an increase in Mp expression, similar to DM1 symptoms

## Conclusion

- Functional analysis of Mp in cardiac physiology highlights the importance of Mp protein in cardiac structure and physiology and suggests its involvement in heart defects associated with DM1.
- Our data support the view that the increase of Mp and the decrease of *miR-1* are associated with the cardiac defects observed in DM1.

## Perspectives

- Test the direct regulation of Mp by *miR-1* in vivo by generating *GFP-Mp3'UTR* reporter lines (carrying or not the *miR-1* target sequence).
- Testing rescue of heart tube dilatation observed in *Hand>Bru3* by inhibiting the expression of Mp, specifically in heart tissue.