



HAL
open science

Développement d'une thérapie génique pour la Dystrophie Myotonique de type 1

Ludovic Arandel

► **To cite this version:**

Ludovic Arandel. Développement d'une thérapie génique pour la Dystrophie Myotonique de type 1. Génétique humaine. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT: 2023SORUS229 . tel-04238758

HAL Id: tel-04238758

<https://theses.hal.science/tel-04238758>

Submitted on 12 Oct 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.



Faculté des Sciences - Sorbonne Université

Dossier de VAE pour l'obtention d'un doctorat

École Doctorale 515 *Complexité du vivant* de la faculté des sciences
de Sorbonne Université

Présenté par Ludovic Arandel





Faculté des Sciences - Sorbonne Université

Dossier de VAE pour l'obtention d'un doctorat

École Doctorale 515 *Complexité du vivant* de la faculté des sciences
de Sorbonne Université

Titre : Développement d'une thérapie génique pour la Dystrophie
Myotonique de type 1

Devant un jury composé de :

Président : Frédéric Devaux

Rapportrices : Aurélie Goyenvalle et Cécile Martinat

Examineurs : Stéphanie Lorrain et Alain Martelli

Représentante de la formation continue : Roselyne Friedenberg

Accompagnatrice méthodologie : France Uebersfeld

Accompagnateur scientifique : Denis Furling



REMERCIEMENTS

Il y a environ 20 ans, alors que je travaillais sur la plateforme évaluation *in vivo* de Généthon en tant que technicien, une étudiante en thèse m'a dit que j'avais « un esprit de chercheur dans un corps de technicien ». J'ai été surpris et j'ai balayé cette observation d'un revers pensant qu'il serait de fait impossible avec mon profil de devenir chercheur. Pourtant, cette réflexion a certainement changé la façon de voir mon futur et inconsciemment nourri l'idée que cela n'était pas irréalisable. Sans le savoir, j'avais déjà commencé ma formation de doctorant et cela au gré des choix des laboratoires successifs que j'ai intégrés et grâce aux nombreuses personnes qui m'ont chacune, tour à tour, transmis connaissances et expertises, accordé leur temps avec beaucoup de bienveillance et leur soutien au quotidien. C'est à ces personnes que j'adresse mes plus profonds remerciements.

Tout d'abord, je commencerai par remercier les membres du jury qui ont accepté d'être présents et qui ont évalué ce travail : Aurélie Goyenvalle et Cécile Martinat qui ont accepté d'être mes deux rapportrices ainsi que Stéphanie Lorrain et Alain Martelli qui ont accepté d'être mes examinateurs. Je remercie également France Uebersfeld qui m'a accompagné durant ces (longues) années et m'a permis de formaliser mes idées grâce à ses conseils avisés tout au long de cette démarche.

Je remercie le Docteur Frédéric Becq de m'avoir donné l'opportunité de travailler dans son laboratoire durant mon stage de BTS et de m'avoir permis de découvrir la recherche.

Ensuite, comment ne pas remercier mes deux ex-collègues (amis aujourd'hui) Laetitia Baudry et Thibault Marais qui m'ont formé aux techniques *in vivo* et qui ont fait de moi un très très bon technicien ☺. J'en profite pour remercier Patrick Gonin qui m'a donné l'occasion de travailler dans le service d'évaluation *in vivo*, et appuyé ma demande pour mon premier CDI. Mais au-delà de mon travail dans le service, j'ai eu la chance inestimable de rencontrer et de travailler pour des chercheurs et jeunes étudiants en thèse qui sont devenus bien plus que des collègues. Parce que je pense profondément que c'est grâce à vous que je suis pour partie qui je suis aujourd'hui, je souhaite vous remercier : Jérôme Poupiot de la DDC (lapin), Adeline Vulin, Aurélie Goyenvalle et Rachid Benchaouir de l'équipe Duchenne (et j'en oublie, j'en suis sûr !). Vous êtes ceux qui m'ont accordé beaucoup de confiance, de temps pour répondre à mes interrogations et mes questions scientifiques. Je mettais mes compétences à votre disposition et

vous me fournissiez les connaissances dont j'avais besoin pour combler mes lacunes scientifiques, sans faire de distinction de fonction. Vous êtes pour 3 d'entre vous « fantastiques ! » sauf quand il faut vous expliquer des règles de jeu de cartes (ils se reconnaîtront bien évidemment).

Je remercie le Docteur David Sassoon de m'avoir accueilli dans son laboratoire quand j'ai quitté le Généthon. Merci à toi de m'avoir fait confiance, d'avoir appuyé et accepté que je reprenne mes études pour valider un Master en parallèle de mon travail de laboratoire. Ces années furent dures mais ô combien formatrices !

Enfin, je te remercie Denis (Docteur Denis Furling) de m'avoir accueilli dans ta petite équipe en 2011. Je te remercie d'avoir cru en moi, en mes quelques compétences de l'époque et de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un projet de thérapie génique. Merci d'avoir toujours été présent, pour les discussions que l'on a pu avoir, de m'avoir poussé à me positionner en tant que chercheur face à mes sujets scientifiques et surtout d'avoir appuyé mon choix de faire cette thèse par la VAE. Évidemment, je ne peux pas oublier de remercier mes collègues de l'équipe REDS et plus particulièrement Alain, Michel, Gilles, Charles, Xavière, Florent (et les autres ...) pour les discussions scientifiques et l'aide apportée pour les manip (surtout à toi Aurélien, très présent pendant la rédaction de cette thèse). Je voudrais aussi remercier spécialement les docteurs Joelle Marie, Frédérique Rau (Jeannine) et Arnaud Klein pour tout ce que l'on a pu partager autour de la science et tous les à-côtés. Merci aux deux derniers de m'avoir aidé à la rédaction de cette VAE et d'avoir su trouver les mots pour me remotiver. Sans vous, cette aventure aurait été très compliquée. Il me reste encore un peu de remerciements à partager : Merci à toi Magda pour tous les moments que nous avons partagés et tous les échanges, idées et temps passé sur ce projet. J'en profite pour remercier Christel Gentil d'avoir été un peu mon « accompagnante » dans cette démarche.

Pour finir, tout ce que je suis aujourd'hui et tout ce que j'ai réalisé je le dois aussi à ma famille : Ma femme Cecilia même si tu es très occupée, tu es toujours là quand il le faut. Merci pour ta patience et ton soutien au quotidien. Mes 3 enfants : Louane, Paul et Zoé. Je ne sais pas quel message j'ai pu vous renvoyer pendant cette période ... mais j'espère que vous serez aussi fiers de moi, que moi de vous. Annie et Michel : mes beaux-parents, merci pour votre soutien indéfectible durant cette thèse comme pour le reste... votre soutien m'a toujours fait plaisir. J'espère maintenant que vous comprendrez que je fais autre chose que d'injecter des souris ☺.

A ma sœur Lydia, mon frère David et ma maman Mireille : je n'ai jamais réussi à vous expliquer ce que je faisais ... finalement peu importe, vous avez à votre façon insufflé la personne que je suis devenu.

SOMMAIRE

MA DEMARCHE DE VAE	5
I. Argumentation de la demande de VAE	6
II. Curriculum Vitae détaillé	7
II.1 Expérience Professionnelle	7
II.2 Formation Initiale	10
II.3 Formation Continue professionnelle	10
II.4 Autoformation.....	11
II.5 Publications	11
III. Retour réflexif sur mon parcours professionnel et construction de ma posture de chercheur.....	14
PARTIE SCIENTIFIQUE.....	17
LISTE DES ABREVIATIONS.....	18
LISTE DES FIGURES	22
RESUME.....	25
SUMMARY.....	26
INTRODUCTION	27
I. Dystrophies myotoniques	28
I.1 Dystrophie myotonique de type 1.....	28
I.1.1 Cause génétique	29
I.1.2 Différentes formes de la DM1 : classification et symptômes associés	29
I.1.2.1 La forme tardive (ou légère)	30
I.1.2.2 La forme adulte	30
I.1.2.3 La forme juvénile	30
I.1.2.4 Forme infantile.....	31
I.1.2.5 La forme congénitale (cDM1).....	31
I.1.3 Mutation : expansion de CTG	31
I.1.3.1 Phénomène d'anticipation.....	31
I.1.3.2 Instabilité intergénérationnelle et mosaïque somatique.....	32
I.1.4 Dystrophie myotonique de type 2	32
I.1.5 Le diagnostic	33
I.2 Aspects cliniques	33
I.2.1 Symptômes musculaires	34
I.2.1.1 Myotonie.....	34
I.2.1.2 Faiblesse musculaire	35
I.2.1.3 Dysfonctionnement cardiaque.....	37
I.2.2 Symptômes extra-musculaires.....	37
I.2.2.1 Système nerveux central.....	37
I.2.2.2 Tractus gastro-intestinal	37
I.2.3 Autres symptômes.....	38
I.3 Mécanismes moléculaires à l'origine de la maladie	39

I.3.1	L'haplo-insuffisance de <i>DMPK</i> et des gènes voisins : « Effet en Cis »	39
I.3.1.1	Perte de fonction des protéines <i>DMPK</i>	39
I.3.1.2	Perte de fonction des protéines flanquantes : <i>SIX5</i> et <i>DMWD</i>	40
I.3.2	Gain de fonction toxique de l'ARN mutant <i>DMPK</i> : « effet en Trans »	40
I.3.2.1	Inclusions ribonucléaires (<i>Foci</i>)	41
I.3.3	Dérégulation des protéines de liaisons à l'ARN <i>DMPK</i> muté.....	42
I.3.3.1	Séquestration et perte de fonction des protéines de la famille <i>MBNL</i>	42
I.3.3.2	Dérégulation des protéines de la famille <i>CELF</i>	43
I.3.3.3	Dérégulation d'autres protéines de liaison à l'ARN	44
I.4	Mécanismes physiopathologiques dans la DM	45
I.4.1	Dérégulation de l'épissage alternatif dans la DM	45
I.4.2	Mécanismes additionnels	48
I.4.2.1	Dérégulation des facteurs de transcription	48
I.4.2.2	Traduction, localisation et stabilité des ARN	49
I.4.2.3	Dérégulation des miARN	49
I.4.2.4	L'ARN interférence.....	50
I.4.2.5	Transcription des ARN antisens	50
I.4.2.6	Traduction sans ATG : traduction RAN.....	51
II.	Modèles de la maladie.....	53
II.1	Modèles cellulaires	53
II.1.1	Modèle d'expression plasmidique des CTG	53
II.1.2	Modèles cellulaires issus de patient DM1	54
II.1.2.1	Cellules humaines primaires : Fibroblastes et myoblastes	54
II.1.2.2	Cellules humaines immortalisées.....	55
II.1.2.3	Cellules souches pluripotentes (hPSCs)	56
II.2	Modèles animaux	58
II.2.1	HSA ^{LR} : Expression des CTG dans le gène de l'actine squelettique humaine	59
II.2.2	DMSXL : Expression des CTG dans le gène humain <i>DMPK</i>	59
II.2.3	Modèles de souris déficientes pour <i>Mbnl</i> : KO <i>Mbnl1</i> et KO <i>Mbnl1/2</i>	60
III.	La famille de protéines <i>MBNL</i>	65
III.1	Les protéines <i>MBNL</i> chez les mammifères.....	65
III.1.1	Relation structure / fonction de <i>MBNL</i>	68
III.1.1.1	Propriété de liaison à l'ARN du domaine N-terminal (exon 1 à exon 4)	68
III.1.1.1.1	Domaine en Doigt de Zinc (ZnF).....	69
III.1.1.1.2	Exon 3 : un exon essentiel.....	70
III.1.1.2	Propriétés de la partie C-terminale (exon 5 à exon 10)	71
III.1.1.2.1	Localisation nucléaire : exon 5 et exon 6	71
III.1.1.2.2	Multimérisation de l'exon 7	72
III.1.1.2.3	Exon 8	72
III.1.1.2.4	Éléments régulateurs supplémentaires de <i>MBNL1</i>	73
III.2	Les fonctions de <i>MBNL1</i>.....	74
III.2.1.1	Régulateur de l'épissage alternatif	74
III.2.1.2	Régulation des processus dépendants des 3' UTR.....	75
III.2.1.2.1	Polyadénylation alternative	75
III.2.1.2.2	Localisation	77
III.2.1.2.3	Stabilisation des ARN	78
III.2.1.3	La prise en charge des miARN.....	79
IV.	Les approches thérapeutiques dans la DM1	81
IV.1	Différentes stratégies pour traiter la Dystrophie Myotonique	81
IV.1.1	Contraction/Élimination des répétitions CTG par l'ingénierie génomique.....	82
IV.1.1.1	Contraction des CTG dans <i>DMPK</i>	82

IV.1.1.2	Élimination des CTG dans <i>DMPK</i>	83
IV.1.1.3	Insertion de signaux de polyadénylation (PAS).....	83
IV.1.2	Inhibition de la transcription du transcrit muté.....	84
IV.1.2.1	Petites molécules pharmaceutiques.....	85
IV.1.3	Inhibition post-transcriptionnelle par réduction du transcrit muté.....	86
IV.1.3.1	Utilisation de ribozymes dirigés contre les transcrits <i>DMPK</i> mutés.....	86
IV.1.3.2	Utilisation d'endonucléases dirigées contre les transcrits <i>DMPK</i> mutés.....	87
IV.1.3.3	Utilisation d'ARN interférent dirigé contre les transcrits <i>DMPK</i> mutés.....	88
IV.1.3.4	OligoAntisens (ASO) Gapmers.....	89
IV.1.4	Blocage de l'interaction ARN-protéine.....	91
IV.1.4.1	Blocage stérique des répétitions par l'utilisation de petites molécules.....	91
IV.1.4.2	Oligonucléotides Antisens (ASO) sans activité RNase H.....	92
IV.1.5	Cibler les protéines altérées dans la DM.....	93
IV.1.5.1	Dérégulation des protéines CELF.....	94
IV.1.5.1.1	Inhibiteurs pharmacologiques de kinases intracellulaires.....	94
IV.1.5.1.2	Inhibiteurs pharmacologiques de la kinase GSK3B.....	94
IV.1.5.2	Augmentation thérapeutique de la quantité de protéine MBNL.....	95
IV.1.5.2.1	Surexpression exogène des protéines MBNL1.....	95
IV.1.5.2.2	Augmentation de l'expression endogène de MBNL.....	96
IV.1.5.2.2.1	Inhibition des miR anti-MBNL1.....	96
IV.1.5.2.2.2	Modulation pharmacologique de l'expression de MBNL.....	98
IV.1.6	Cibler les effets en aval.....	98
IV.1.6.1	Correction spécifique de défauts d'épissage du canal chlore CLCN1.....	98
IV.1.6.2	Correction spécifique de l'autophagie cellulaire responsable de l'atrophie musculaire.....	100
	Objectifs.....	102
	Matériel et méthodes.....	104
V.	Résultats.....	116
V.1	Développement de lignées musculaires humaines immortalisées de la dystrophie myotonique pour l'évaluation d'approches thérapeutiques.....	116
V.1.1	Caractérisation des cellules musculaires primaires issues de patients DM1 et DM2.....	116
V.1.2	Développement et caractérisation des lignées musculaires immortalisées de patients DM1 et DM2.....	118
V.1.3	Développement et caractérisation de lignées immortalisées trans-différenciées.....	120
V.1.4	Utilité de lignées de cellules musculaires DM1 pour évaluer les composés thérapeutiques.....	123
V.1.4.1	Utilisation d'une approche Oligonucléotides antisens : 2'OMe-(CAG) ₇	123
V.1.4.2	Utilisation d'une approche antisens : U7-snrRNA modifié.....	125
V.2	Développement et évaluation d'une approche de thérapie génique basée sur une stratégie de leurre.....	129
V.2.1	Développement d'une protéine affine pour les CUGexp et jouant un rôle de leurre : MBNL1Δ.....	129
V.2.2	MBNL1Δ corrige la toxicité des ARN-CUGexp dans les cellules musculaires dérivées de patients DM1.....	130
V.2.3	Le leurre MBNL1Δ interfère avec la dynamique des <i>foci</i>	138
V.2.4	Le leurre MBNL1Δ forme des agrégats CUGexp-RNA moins stables que MBNL1.....	142
V.2.5	Effet de l'expression de MBNL1Δ dans le muscle squelettique de souris sauvage (WT).....	146
V.2.6	Le leurre MBNL1Δ corrige le phénotype musculaire de la maladie chez les souris DM1.....	152
V.2.7	L'administration locale du leurre MBNL1Δ maintient un effet durable chez les souris DM1.....	154
V.2.8	L'administration systémique d'AAV-MBNL1Δ corrige les phénotypes musculaires chez les souris DM1.....	156
	Discussion et perspectives.....	162
	Caractérisation d'un modèle cellulaire immortalisé.....	162
	Les cellules immortalisées DM1 présentent des défauts d'épissage mais pas les DM2.....	164

Étude de la fonction de MBNL1 autre que l'épissage alternatif dans les cellules DM1.....	166
Les cellules immortalisées sont de bons modèles cellulaires pour tester des thérapies.....	166
Génération d'un outil de thérapie génique et mécanisme de leurre	167
MBNL1Δ influe sur la stabilité et le devenir des <i>foci</i>	167
MBNL1Δ corrige les défauts d'épissage et les maintient sur le long terme	170
La surexpression de MBNL1Δ ne semble pas toxique.....	171
Génération de nouveaux outils MBNLΔ	172
Concentrer les protéines MBNL1Δ dans le noyau	173
Génération d'un outil MBNLΔ autorégulé.....	174
Validation dans un modèle DM1 multisystémique	174
Conclusion	177
Bibliographie	180

MA DEMARCHE DE VAE

I. Argumentation de la demande de VAE

Je travaille depuis près de vingt ans dans le domaine de la recherche en biologie avec pour thématique les maladies rares et les thérapies associées. La découverte de la recherche dans un laboratoire financé par une association de malades m'a conduit successivement à exercer dans différents laboratoires supportés par une autre association, l'AFM-Téléthon. Le milieu associatif au service de la recherche de médicaments pour les patients m'a toujours attiré. Les maladies rares et plus particulièrement les pathologies neuromusculaires, sont aujourd'hui mes centres d'intérêt professionnel. Mes fonctions au sein de ces différents laboratoires ont évolué de celles d'un technicien qui réalisait des protocoles expérimentaux à celles d'un chercheur qui mobilise des expertises scientifiques pour répondre à des questions scientifiques. Tout cela dans un seul but : comprendre les mécanismes pathologiques pour générer de nouvelles connaissances et participer à la découverte de thérapies efficaces pour les patients. Depuis plusieurs années, je me suis formé à la recherche par la recherche. Constatant qu'il existe une inadéquation entre mes activités de chercheur et mon statut actuel, je souhaite légitimer cette réalité par l'obtention d'un doctorat par la VAE. Je mène des sujets de recherche en relation avec les thématiques de l'équipe, formulant des hypothèses à partir de la bibliographie et de l'état de l'art, les faisant évoluer tout en étant force de propositions. Je valorise mes résultats par des présentations orales au sein des réunions internes ou lors de congrès nationaux et internationaux, mais également par le dépôt d'un brevet correspondant à l'axe principal de mes travaux de recherche. Le transfert des connaissances scientifiques et techniques est fait par l'encadrement d'étudiants ou de personnels ITA. J'ai collaboré à 12 publications dont une étude en premier auteur publiée en 2017. Je termine actuellement une nouvelle étude en premier auteur qui est en révision dans un journal à fort impact. En parallèle de mon activité professionnelle, j'ai continué à me former en validant plusieurs diplômes dont le Master SSIB de l'EPHE, me permettant d'attester par un diplôme académique les connaissances et le savoir-faire acquis dans le cadre de mes expériences professionnelles.

A l'aube de la seconde partie de ma carrière, j'aspire à bénéficier du statut de chercheur et ceci ne pourra se faire sans l'obtention d'un doctorat. L'acquisition de ce diplôme constituerait pour moi une reconnaissance académique de ma montée en compétences, permettant de renforcer ma légitimité face aux autres chercheurs, de sécuriser mon avenir professionnel et de faciliter une éventuelle mobilité professionnelle. Je désire donc obtenir ce diplôme dans l'École Doctorale Complexité du vivant 515 de Sorbonne Université dont les thématiques sont en accord avec celles de l'équipe dans laquelle j'effectue mes recherches.

II. Curriculum Vitae détaillé

Nom : Ludovic Arandel 20 Avenue Miss Cavell 94100 St Maur des Fossés

Date de naissance : 09 Janvier 1977

Chercheur en biologie spécialiste des thérapies géniques pour les pathologies neuromusculaires

II.1 Expérience Professionnelle

2011 à aujourd'hui : Centre de Recherche en Myologie-UMRS 974 - INSERM -SU

Employeur : Association Institut de Myologie

Groupe Dystrophie Myotonique, physiopathologie et biothérapie, dirigé par Denis Furling
Groupe de 11 personnes : 1 Directeur de recherche, 3 Chercheurs, 2 Post-doctorants, 1 doctorant, 4 Ingénieurs.

2017-2021 : Ingénieur d'étude

Mission : Gestion de projets de recherche

Activités :

Conception et réalisation de projets de recherche

- Participation à la conception et l'élaboration du projet de recherche
- Formulation des hypothèses de travail
- Recherches bibliographiques et veille scientifique
- Élaboration et mise en œuvre des plans d'expériences
- Suivi, analyse et mise en forme des résultats

Valorisation et diffusion :

- Communications affichées des résultats lors de congrès internationaux : Myology (Bordeaux, 2017), IDMC12 (Göteborg, 2017)
- Rédaction d'article (premier auteur en révision à Nature Biomedical Engineering)
- Publications en collaboration : 2020 (1), 2019 (2), 2018 (3)
- Publication en premier auteur dans le journal *Disease Models and Mechanisms*: 2017 (4)

Encadrement :

- Soutien scientifique et technique d'un doctorant (2015-2019)
- Formation technique d'un étudiant Master 1 (juin 2018)
- Encadrement de techniciens et d'ingénieurs

Sujet 1 : Développement et optimisation d'outils viraux thérapeutiques afin de contrôler l'expression du transgène et d'accroître les capacités fonctionnelles

Sujet 2 : Étude du devenir de l'ARN *DMPK* muté à partir d'un modèle cellulaire immortalisé issu d'un modèle murin de la DM1

Sujet 3 : Évaluation de l'efficacité de transduction de vecteur viraux après injection locale dans le muscle squelettique murin et humain.

2011-2016 : Ingénieur d'étude

Mission : Co-gestion des projets de recherche

Activités

Développement d'outils et réalisation d'un projet de recherche

- Formulation des hypothèses de travail
- Recherches bibliographiques et veille scientifique
- Élaboration des plans d'expériences et conduite des expérimentations *in vivo* et *in vitro*
- Suivi, analyse et mise en forme des résultats

Valorisation et diffusion :

- Communication orale des résultats au Congrès International IDMC9 (San Sebastian, 2013), IDMC11 (San Francisco, 2015)
- Participation à la rédaction d'article
- Dépôt d'un Brevet: Treatment for Myotonic Dystrophy (PCT/EP2015/ 058111)
- Publications en collaboration : 2016 (5), 2015 (6), 2014 (7), 2012 (8), 2011 (9)

Encadrement :

- Formation scientifique et technique d'un doctorant

Sujet 1 : Évaluation *in vivo* et *in vitro* de stratégies de thérapie génique pour la Dystrophie Myotonique de Type 1 (DM1)

Sujet 2 : Caractérisation de lignées cellulaires musculaires humaines immortalisées de la Dystrophie Myotonique de type 1 pour l'évaluation de composés thérapeutiques

Sujet 3 : Réexpression de l'isoforme fœtal de la dystrophine dans le muscle squelettique de souris par injection d'AAV

2007-2011: UMR787-SU-INSERM-CNRS-AIM

UMR S 787 Inserm, Université Paris VI/Pierre et Marie Curie, Paris, France

Employeur : Sorbonne-Université, Paris

Équipe : Myology Group, dirigée par David Sassoon

Équipe de 9 personnes : 1 Directeur de recherche, 5 Post-doctorants, 2 Doctorants, 1 Assistant Ingénieur

2008-2011 : Assistant Ingénieur

Mission : Contribution à des projets de recherche

Activités :

Développement d'outils d'un projet de recherche

- Recherche bibliographique afin d'optimiser les expériences et pour une meilleure réalisation du sujet
- Formulation de nouvelles hypothèses

- Conception et réalisation d'expériences de culture cellulaire, de biologie moléculaire et d'histologie
- Réalisation de protocoles *in vivo* et *in vitro*
- Analyse, mise en forme et interprétation des résultats

Valorisation et diffusion :

- Publication en collaboration : 2010 (10)

Encadrement :

- Formation d'un Master 2 aux techniques de laboratoire

Sujet 1 : Développement d'outils viraux (lentivirus et AAV) pour l'étude de la fonction du marqueur de cellule souche PW1/PeG3, *in-vitro* et *in-vivo*.

Sujet 2 : Développement d'un nouvel anticorps contre le marqueur de cellule souche PW1/PeG3 murin et humain.

2007-2008 : Assistant Ingénieur

Mission : Contributions techniques aux projets de recherche

Activités :

Développement de techniques *in vivo*

- Recherche bibliographique afin d'optimiser les expériences *in vivo*
- Conception et réalisation des protocoles *in vivo*
- Analyse, mise en forme et interprétation des résultats

Formation :

- Formation des Doctorants et Post-Doctorants aux techniques *in vivo*

Sujet 1 : Développement d'une technique d'injection d'une lignée cellulaire tumorale sur modèle murin

Sujet 2 : Développement d'une technique de greffe de peau sur modèle murin

2002 à 2007 : UMR8115-CNRS, Généthon

Employeur : Généthon, Evry

Département Évaluation *in vivo*, dirigé par Patrick Gonin

Équipe : Évaluation *in vivo*.

Équipe de 4 personnes : 1 vétérinaire, 3 techniciens

2003-2007: Technicien *in vivo*

Mission : Participation technique au projet de recherche

Activités :

Mise à disposition des techniques de transfert de gène

- Recherche bibliographique afin d'optimiser les techniques de transfert de gènes
- Conception et réalisation des protocoles *in vivo*
- Analyse, mise en forme des résultats

Valorisation :

- Publications en collaboration : 2007 (11-12) et 2005 (13)

Formation :

- Formation des Doctorants et Post-Doctorants aux techniques *in vivo*

Sujet 1 : Mise en œuvre d'une technique innovante de transfert de gène dans le modèle murin

Sujet 2 : Mise en œuvre des techniques du Département *in vivo*

2002-2003 : Apprenti Technicien (Licence professionnelle Bio-expérimentation Animale)

Acquisition et mise en œuvre des techniques du Département *in vivo*

2002 : UMR 6558 (UP-CNRS-Poitiers)

Équipe : Signalisation et transports ioniques membranaires (STIM), dirigée par Frédéric Becq

Équipe de 5 personnes : 1 Directeur de recherche, 1 pharmacien et 3 doctorants

2002 : Technicien stagiaire (BTS-Stage de 3 mois, mi-juin à mi-septembre)

Activité :

- Gérer en autonomie une lignée cellulaire
- Réalisation des expériences de culture cellulaire
- Analyse, mise en forme et interprétation des résultats

Sujet : Réalisation d'une étude pharmacologique afin de déterminer les activateurs de la protéine CFTR-G551D

II.2 Formation Initiale

2003 : Licence professionnelle Bio-expérimentation (E.S.T.B.A-75020 Paris)

2000-2002 : BTS Analyses Biologiques et Biotechnologiques (Lycée Jacques Bujault -79000 Melle)

1998 : BAC S-SVT (Lycée Louis Armand-86000 Poitiers)

II.3 Formation Continue professionnelle

2008-2010 : Master EPHE (SSIB) : Signalisation et systèmes intégrés en biologie parcours Oncogénèse (École Pratique des Hautes études-75007 Paris)

2009 : Expérimentation animale Niveau Concepteur (ex niveau 1, Paris)

2006 : « Autopsie, Prélèvements des Animaux de Laboratoire » (ENVT-31076 Toulouse)
2005 : « Initiation à la chirurgie expérimentale » (ENVL-69280 Marcy l’Etoile)
2003 : Expérimentation animale Niveau Praticien (ex niveau 2, EnvA-94700 Maison-Alfort)

II.4 Autoformation

Communication en anglais

Recherches et veille bibliographiques afin d’optimiser les résultats et techniques

Participation aux colloques nationaux et internationaux

Formation et acquisition de techniques à l’étranger

Collaborations et discussions fréquentes avec des collègues sur de nombreux sujets scientifiques ou techniques.

Acquisition des logiciels de vectorisation : Vector Nti, DNA strider, d’analyses statistiques :

Prism et de traitement d’image : ImageJ, Cartograph, Histolab

II.5 Publications

Ludovic Arandel, Magdalena Matloka, Arnaud F. Klein, Frédérique Rau, Alain Sureau, Michel Ney, Aurélien Cordier, Maria Kondili, Micaela Polay-Espinoza, Naira Naouar, Arnaud Ferry, Mégane Lemaitre, Séverine Begard, Morvane Colin, Chloé Lamarre, Hélène Tran, Luc Buée, Joëlle Marie, Nicolas Sergeant, et Denis Furling. 2022. « Reversal of RNA Toxicity in Myotonic Dystrophy via a Decoy RNA-Binding Protein with High Affinity for Expanded CUG Repeats ». *Nature Biomedical Engineering* 6(2):207-20. doi: 10.1038/s41551-021-00838-2.

Muraine, Laura, Mona Bensalah, Jamila Dhiab, Gonzalo Cordova, **Ludovic Arandel**, Alix Marhic, Maud Chapart, Stéphane Vasseur, Sofia Benkhelifa-Ziyyat, Anne Bigot, Gillian Butler-Browne, Vincent Mouly, Elisa Negroni, et Capucine Trollet. 2020. « Transduction Efficiency of Adeno-Associated Virus Serotypes After Local Injection in Mouse and Human Skeletal Muscle ». *Human Gene Therapy* 31(3-4):233-40. doi: 10.1089/hum.2019.173.

Klein, Arnaud F., **Ludovic Arandel**, Joëlle Marie, et Denis Furling. 2020. « FISH Protocol for Myotonic Dystrophy Type 1 Cells ». P. 203-15 in *Trinucleotide Repeats*. Vol. 2056, *Methods in Molecular Biology*, édité par G.-F. Richard. New York, NY: Springer New York.

Klein, Arnaud F., Miguel A. Varela, **Ludovic Arandel**, Ashling Holland, Naira Naouar, Andrey Arzumanov, David Seoane, Lucile Revillod, Guillaume Bassez, Arnaud Ferry, Dominic Jauvin, Genevieve Gourdon, Jack Puymirat, Michael J. Gait, Denis Furling, et Matthew J. A. Wood. 2019. « Peptide-Conjugated Oligonucleotides Evoke Long-Lasting Myotonic Dystrophy Correction in Patient-Derived Cells and Mice ». *Journal of Clinical Investigation* 129(11):4739-44. doi: 10.1172/JCI128205.

Azibani, Feriel, Astrid Brull, **Ludovic Arandel**, Maud Beuvin, Isabelle Nelson, Arnaud Jollet, Esma Ziat, Bernard Prudhon, Sofia Benkhelifa-Ziyyat, Marc Bitoun, Stéphanie Lorain,

Gisèle Bonne, et Anne T. Bertrand. 2018. « Gene Therapy via Trans-Splicing for LMNA-Related Congenital Muscular Dystrophy ». *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 10:376-86. doi: 10.1016/j.omtn.2017.12.012.

Ludovic Arandel, Micaela Polay Espinoza, Magdalena Matloka, Audrey Bazinet, Damily De Dea Diniz, Naïra Naouar, Frédérique Rau, Arnaud Jollet, Frédérique Edom-Vovard, Kamel Mamchaoui, Mark Tarnopolsky, Jack Puymirat, Christophe Battail, Anne Boland, Jean-Francois Deleuze, Vincent Mouly, Arnaud F. Klein, et Denis Furling. 2017. « Immortalized Human Myotonic Dystrophy Muscle Cell Lines to Assess Therapeutic Compounds ». *Disease Models & Mechanisms* 10(4):487-97. doi: 10.1242/dmm.027367.

Freyermuth, Fernande, Frédérique Rau, Yosuke Kokunai, Thomas Linke, Chantal Sellier, Masayuki Nakamori, Yoshihiro Kino, **Ludovic Arandel**, Arnaud Jollet, Christelle Thibault, Muriel Philipps, Serge Vicaire, Bernard Jost, Bjarne Udd, John W. Day, Denis Duboc, Karim Wahbi, Tsuyoshi Matsumura, Harutoshi Fujimura, Hideki Mochizuki, François Deryckere, Takashi Kimura, Nobuyuki Nukina, Shoichi Ishiura, Vincent Lacroix, Amandine Campan-Fournier, Vincent Navratil, Emilie Chautard, Didier Auboeuf, Minoru Horie, Keiji Imoto, Kuang-Yung Lee, Maurice S. Swanson, Adolfo Lopez de Munain, Shin Inada, Hideki Itoh, Kazuo Nakazawa, Takashi Ashihara, Eric Wang, Thomas Zimmer, Denis Furling, Masanori P. Takahashi, et Nicolas Charlet-Berguerand. 2016. « Splicing Misregulation of SCN5A Contributes to Cardiac-Conduction Delay and Heart Arrhythmia in Myotonic Dystrophy ». *Nature Communications* 7:11067. doi: 10.1038/ncomms11067.

Rau, Frédérique, Jeanne Lainé, Laetitia Ramanoudjame, Arnaud Ferry, **Ludovic Arandel**, Olivier Delalande, Arnaud Jollet, Florent Dingli, Kuang-Yung Lee, Cécile Peccate, Stéphanie Lorain, Edor Kabashi, Takis Athanasopoulos, Taeyoung Koo, Damarys Loew, Maurice S. Swanson, Elisabeth Le Rumeur, George Dickson, Valérie Allamand, Joëlle Marie, et Denis Furling. 2015. « Abnormal Splicing Switch of DMD's Penultimate Exon Compromises Muscle Fibre Maintenance in Myotonic Dystrophy ». *Nature Communications* 6(1):7205. doi: 10.1038/ncomms8205.

Mouisel, Etienne, Karima Relizani, Laurence Mille-Hamard, Raphaël Denis, Christophe Hourdé, Onnik Agbulut, Ketan Patel, **Ludovic Arandel**, Susanne Morales-Gonzalez, Alban Vignaud, Luis Garcia, Arnaud Ferry, Serge Luquet, Véronique Billat, Renée Ventura-Clapier, Markus Schuelke, et Helge Amthor. 2014. « Myostatin Is a Key Mediator between Energy Metabolism and Endurance Capacity of Skeletal Muscle ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 307(4):R444-54. doi: 10.1152/ajpregu.00377.2013.

Joanne, Pierre, Christophe Hourdé, Julien Ochala, Yvain Caudéran, Fadia Medja, Alban Vignaud, Etienne Mouisel, Wahiba Hadj-Said, **Ludovic Arandel**, Luis Garcia, Aurélie Goyenvalle, Rémi Mounier, Daria Zibroba, Kei Sakamoto, Gillian Butler-Browne, Onnik Agbulut, et Arnaud Ferry. 2012. « Impaired Adaptive Response to Mechanical Overloading in Dystrophic Skeletal Muscle ». *PLoS ONE* 7(4). doi: 10.1371/journal.pone.0035346.

Tran, Hélène, Nathalie Gourrier, Camille Lemercier-Neuillet, Claire-Marie Dhaenens, Audrey Vautrin, Francisco José Fernandez-Gomez, **Ludovic Arandel**, Céline Carpentier, Hélène Obriot, Sabiha Eddarkaoui, Lucie Delattre, Edwige Van Brussels, Ian Holt,

Glenn E. Morris, Bernard Sablonnière, Luc Buée, Nicolas Charlet-Berguerand, Susanna Schraen-Maschke, Denis Furling, Isabelle Behm-Ansmant, Christiane Branlant, Marie-Laure Caillet-Boudin, et Nicolas Sergeant. 2011. « Analysis of Exonic Regions Involved in Nuclear Localization, Splicing Activity, and Dimerization of Muscleblind-like-1 Isoforms ». *Journal of Biological Chemistry* 286(18):16435-46. doi: 10.1074/jbc.M110.194928.

Parlakian, Ara, Iman Gomaa, Sounkary Solly, **Ludovic Arandel**, Alka Mahale, Gustav Born, Giovanna Marazzi, et David Sassoon. 2010. « Skeletal Muscle Phenotypically Converts and Selectively Inhibits Metastatic Cells in Mice » édité par M. V. Blagosklonny. *PLoS ONE* 5(2):e9299. doi: 10.1371/journal.pone.0009299.

Bartoli, M., J. Poupiot, A. Vulin, F. Fougerousse, **L. Arandel**, N. Daniele, C. Roudaut, F. Noulet, L. Garcia, O. Danos, et I. Richard. 2007. « AAV-Mediated Delivery of a Mutated Myostatin Propeptide Ameliorates Calpain 3 but Not α -Sarcoglycan Deficiency ». *Gene Therapy* 14(9):733-40. doi: 10.1038/sj.gt.3302928.

Fougerousse, Françoise, Marc Bartoli, Jérôme Poupiot, **Ludovic Arandel**, Muriel Durand, Nicolas Guerchet, Evelyne Gicquel, Olivier Danos, et Isabelle Richard. 2007. « Phenotypic Correction of α -Sarcoglycan Deficiency by Intra-Arterial Injection of a Muscle-Specific Serotype 1 RAAV Vector ». *Molecular Therapy* 15(1):53-61. doi: 10.1038/sj.mt.6300022.

Gonin, Patrick, **Ludovic Arandel**, Laetitia Van Wittenberghe, Thibaut Marais, Norma Perez, et Olivier Danos. 2005. « Femoral Intra-Arterial Injection: A Tool to Deliver and Assess Recombinant AAV Constructs in Rodents Whole Hind Limb ». *The Journal of Gene Medicine* 7(6):782-91. doi: 10.1002/jgm.716.

Communication orale

2013: International Myotonic Dystrophy Consortium. IDMC-9 (Espagne, San Sebastian)
New human muscle cell models for DM1

Communications affichées :

2011 : Congrès International Myologie (France, Angers)

Correction des défauts de maturation DM1 par un outil MBNL1-modifié.

L. Arandel, H. Tran, C. Lemerrier-Neuillet², C-M Dhaenens¹, M. Colin¹, M-L Caillet-Boudin¹, D. Furling² & N. Sergeant¹

2019: IDMC 12 (Suède, Göteborg)

A Decoy-Based Gene Therapy to Inhibit RNA Toxicity Associated with Expanded CUG

Arandel Ludovic, Matloka Madgalena, Klein Arnaud, Marie Joelle, Rau Frédérique, Ney Michel, Sureau Alain, Naouar Naira, Ferry Arnaud, Sergeant Nicolas & Furling Denis

III. Retour réflexif sur mon parcours professionnel et construction de ma posture de chercheur

Engagé en CDI par l'Association Institut de Myologie depuis 8 ans en tant qu'ingénieur d'études dans l'unité U974, je me considère actuellement comme chercheur. Ma formation et construction scientifique se sont faites en arrivant à la recherche par la technique.

J'ai toujours été intéressé par le monde du vivant et notamment les Sciences naturelles, ce qui m'a amené vers des études scientifiques. Après l'obtention d'un baccalauréat S option SVT, je me suis inscrit en DEUG SVT sans projet professionnel clair et défini. Les cours magistraux ne m'intéressaient pas. Après 2 échecs en première année et un bilan rapide de mes compétences, je me suis réorienté vers une formation technique courte, me permettant une insertion professionnelle rapide. Mon choix s'est porté sur le BTS Anabiotech pour sa dominante scientifique et c'est au cours du stage obligatoire que j'ai découvert ce que je voulais faire. Les stages proposés par l'école étaient orientés vers l'agriculture et l'agroalimentaire, mais il était possible de les réaliser dans un laboratoire de recherche. Je ne connaissais pas le monde de la recherche et j'ai personnellement sollicité un enseignant de DEUG pour faire ce stage dans son laboratoire. Je savais que ses travaux étaient financés par une association de malades et j'étais sensible à cela. Ma mission consistait à tester des composés chimiques sur un modèle cellulaire de poumon de patients atteints de mucoviscidose. Apporter ma contribution à la recherche pour le bien des patients dans l'attente d'une solution thérapeutique me motivait. Cela donnait du sens à ma démarche. Cette première expérience professionnelle a été fondatrice dans mes choix et mes orientations. Elle a inscrit les bases et les thématiques de mon futur projet professionnel. Elle a par ailleurs orienté et fondé mon désir de devenir chercheur, même si la démarche a mis du temps à se structurer. Ma construction s'est ainsi faite en choisissant mes formations et laboratoires en lien avec les maladies rares.

Du soutien expérimental ...

C'est au cours de mon stage de BTS que j'ai découvert et utilisé mes premiers modèles expérimentaux cellulaires. Mon envie d'apprendre m'a poussé à explorer des modèles plus complexes et j'ai continué ma formation en apprentissage, en intégrant une Licence professionnelle de l'ESTBA en spécialité bio-expérimentation animale. Dans ce cadre, j'ai intégré le laboratoire du Généthon, dédié à la conception et au développement de médicaments de thérapie génique pour les maladies rares. D'apprenti sur la plateforme d'évaluation *in vivo*,

je suis devenu technicien en CDI. J'y ai découvert plusieurs facettes du métier. Au cours de ces cinq années, j'ai acquis des techniques *in vivo* permettant la mise en place et la réalisation des protocoles expérimentaux au service des chercheurs. Mon activité principale consistait à injecter des vecteurs viraux dans des modèles murins et à assurer le suivi jusqu'au sacrifice des animaux. Je me suis vite rendu compte que je voulais comprendre ce que je faisais, au-delà du geste technique. Pour cela, j'ai échangé avec les doctorants pour appréhender leurs questions et projets scientifiques. Ainsi, je suis devenu un interlocuteur et acteur scientifique impliqué dans leur projet de thèse. J'ai également développé une technique innovante de transfert de gène sur un modèle murin, qui m'a permis de contribuer à plusieurs publications. Avec ce projet, j'ai commencé à faire de la bibliographie et découvert que la conjugaison des connaissances scientifiques et techniques était nécessaire pour répondre aux problématiques rencontrées. J'ai aussi compris que les connaissances scientifiques faisaient évoluer les techniques et les technologies, et inversement. La somme de ces découvertes, l'absence d'avancement, le travail répétitif de service et mon désir d'évoluer m'ont conduit à démissionner du Généthon.

J'ai donc choisi d'intégrer une équipe qui travaillait sur des thématiques nouvelles pour moi. J'ai ainsi rejoint l'équipe de David Sassoon dans l'UMR U787 en tant qu'assistant ingénieur. Ce laboratoire s'intéressait à la fonction des cellules souches musculaires adultes pouvant être utilisées pour réparer des tissus endommagés. Investiguer de nouvelles approches thérapeutiques était motivant. J'ai alors travaillé au développement d'outils viraux pour étudier la fonction d'un marqueur spécifique de ces cellules. J'ai appris à aborder les problématiques différemment en les traitant scientifiquement et non plus techniquement. Pour cela, j'ai acquis une méthodologie de recherche scientifique en m'appuyant sur l'état de l'art et les travaux de l'équipe. L'encadrement technique d'un étudiant de Master 2 atteint de myopathie de Duchenne m'a conduit à modifier ma manière de transmettre mes connaissances. Travailler au quotidien avec un malade a donné un sens concret à mon travail. Grâce au transfert des connaissances par la formation et par les collaborations, ma production scientifique s'est également étoffée. Parallèlement à mon activité de laboratoire, j'ai formalisé ma montée en compétences en obtenant le Master SSIB de l'EPHE et la formation règlementaire de concepteur de projet en expérimentation animale. Ce dernier me permet de gérer et concevoir des protocoles expérimentaux incluant des animaux. Ces quatre années d'exercice m'ont permis de progresser, de prendre confiance en moi et aussi d'avancer dans ma réflexion de devenir chercheur.

... à la conception

Les connaissances et expertises acquises pendant ces premières années professionnelles m'ont permis d'intégrer avec confiance l'équipe de Denis Furling au sein de l'UMR974, en tant qu'ingénieur d'études. Les axes de recherche de l'équipe sont orientés vers l'étude de la physiopathologie de la Dystrophie Myotonique de type 1 et le développement de biothérapies innovantes. Ma motivation pour intégrer cette équipe, avec laquelle j'avais déjà collaboré dans le passé, coïncidait avec la maturation de mon projet professionnel. Je voulais m'impliquer sur les projets d'une équipe qui travaillait sur la recherche de médicaments. Ma posture de chercheur s'est progressivement affirmée au fil des années, en menant séparément puis conjointement deux sujets de l'équipe comme projet de recherche. Progressivement, je les ai fait vivre en étant force de propositions, formulant les hypothèses et concevant les plans expérimentaux afin de répondre aux questions scientifiques. Le premier sujet, répondant à un besoin transversal de l'équipe, consistait à caractériser des lignées cellulaires immortalisées issues de patients et d'individus sains. Les résultats de ces travaux ont été présentés à plusieurs reprises lors de congrès nationaux ou internationaux, sous la forme de communications orales ou affichées. Ce travail a été publié dans un article scientifique dont je suis premier auteur. Le second sujet consistait au développement et à l'évaluation *in vivo* et *in vitro* de stratégies de thérapie génique pour la DM1. Le développement d'un outil de thérapie a abouti à un brevet déposé en 2015 dont je suis co-inventeur. Une publication dont je suis premier auteur est également en cours de révision. Je suis fier de ce travail et des résultats prometteurs obtenus puisqu'ils laissent entrevoir la possibilité d'une application de thérapie génique chez les patients. De ces travaux se sont dégagés les deux axes du projet de thèse d'une étudiante que j'ai accompagnée scientifiquement et formée aux techniques de laboratoire. Actuellement, j'encadre deux ingénieurs d'études travaillant sur l'optimisation de cet outil thérapeutique, en collaboration avec l'industrie pharmaceutique. J'ai également accompagné scientifiquement et techniquement une étudiante en master 1 sur un sujet en relation avec mon projet.

Mon projet professionnel initialement très orienté sur les thérapies a lui aussi évolué. Mon besoin de comprendre m'a poussé également à explorer l'axe physiopathologie de la maladie. Dorénavant j'ai une approche plus globale de la recherche. Je peux maintenant naviguer entre les deux axes de recherche de l'équipe en apportant mon analyse critique sur les projets et ceci en sortant du cadre strict de la technique.

PARTIE SCIENTIFIQUE

LISTE DES ABREVIATIONS

(CAG) _n	motif CAG répété n fois
2'-MOE	2'- O méthoxyéthyle
2'-O-MePS	2'-O-méthyl-phosphorothioate
3'UTR	3'Untranslated Transcribed Region
AAV	Adénovirus adéno-associé
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
agomiR	séquence nucléotidique similaire à un miR spécifique
AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside
AMPK	Kinase activée par l'AMP
ANOVA	Analyse de la variance
antagomir	ASO complémentaires et spécifiques d'un miR
APA	PolyAdénylation alternative
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messenger
ASO	Oligonucléotides antisens
BIO	6-bromoindirubin-3'-oxime
bp	Paires de bases
BSA	Bovine Serum Albumine
CAG	Cytosine- Adénine –Guanine
Cas9	CRISPR associated protein 9
Cdk4	Cyclin-dependent kinase 4
CELF	CUGBP Elav-like family member
circRNA	ARN circulaire
CLCN1	Canal chlorure 1 voltage-dépendant
CLIP	Cross-linking immunoprecipitation
CMV	Cytomégalovirus
CNBP	CCHC-type zinc finger nucleic acid binding
CNS	Système nerveux central
CRISPR	Clustered, regularly interspersed palindromic repeats
CTG	Cytosine-Thymine-Guanine
cTNT	Cardiac troponin T

CTRL	Contrôle
CUG	Cytosine–Uracile–Guanine
CUGBP	CUG binding protein
dCas9	Dead Cas9
DDX	DEAD-box family protein
DICER	Endoribonucléase dicer
dKO	Double KO
DM	Dystrophie Myotonique
DM1	Dystrophie Myotonique de type 1
DM2	Dystrophie Myotonique de type 2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMPK	Dystrophia Myotonica Protein Kinase
DMWD	DM1 locus, WD repeat containing
Dox	Doxycycline
ECG	Electrocardiogramme
Ex	Exon
FISH	Hybridation fluorescente <i>in situ</i>
FRAP	Redistribution de fluorescence après photoblanchiment
FSH	Follicule-Stimulating Hormone
GFP	Green Fluorescent Protein
GJA1	Protéine alpha-1 des jonctions communicantes
GO	Gene Ontology
GSK3b	Glycogène kinase synthase 3 beta
GST	Glutathione-S-Transferase
hCSE	Cellules souches embryonnaires
HDAC	Histone deacetylase
hIPS	Induced pluripotent stem cells
His	Histidine
hnRNP	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein
hPSCs	Cellules souches pluripotentes
HSA	Actine Squelettique humaine
HSA ^{LR}	Actine squelettique humaine à longues répétitions
hTERT	Téломérase humaine

IR	Récepteur à l'insuline
kDa	KiloDalton
KO	Knockout
LLPS	Séparation de phases liquide-liquide
LNA	Acide nucléique bloqué ou BNA pour acide nucléique ponté
lncRNA	Long non-coding RNA
MBNL1	Muscleblind-like splicing regulator 1
MBNL2	Muscleblind-like splicing regulator 2
MBNL3	Muscleblind-like splicing regulator 3
miARN	micro ARN ou miR
MOI	Multiplicity of Infection
MYH8	Chaîne lourde de la myosine
MyoD	Myoblast determination protein 1
MyoG	Myogenin
ncARN	ARN non codant
NKX2-5	NK2 homeobox 5
NLS	Nuclear Localization Sequence
pA	Polyadénylation
PAS	Site de polyadénylation
PBS	Tampon phosphate salin
PEI	Polyéthylèneimine
PI	Post-injection
PI3K/AKT	PhosphoInositide 3-Kinase/AKT
PKC	Protéine kinase C
PMO	Morpholino oligonucleotides phosphorodiamidate
PROMM	Dystrophie myotonique proximale
PTIX2	Paired like homeodomain 2
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
QUA	Quadriceps
RAN	Repeat Associated Non-AUG
RAR γ	Récepteur gamma à l'acide rétinoïque
RBFOX	RNA binding Fox-1 homolog
RBP	Protéine de liaison à l'ARN

RISC	RNA-induced silencing complex
RNA-seq	Séquençage haut-débit de l'ARN
Ro 31-8220	bis-indolylmaleimide IX
Rrlp0	60S ribosomal protein L0
RT-qPCR	Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction
RUVBL2	RuvB Like AAA ATPase 2
shRNA	Small hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
SIX5	SIX homeobox 5
smFISH	Single molecule FISH
SP1	Specificity protein 1
STAUFEN1	Staufen homolog 1
TA	Tibialis antérieur
TALEN	Transcription activator-like effector nucleases
WT	Wild type
ZnF ou ZNF	Domaine en doigt de zinc ou Zinc Finger

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 :** Représentation schématique du gène *DMPK*
- Figure 2 :** Classification clinique de la DM1 selon 5 formes
- Figure 3 :** Représentation du phénomène d'anticipation dans une famille DM1
- Figure 4 :** Représentation schématique du gène *CNBP*
- Figure 5 :** Résumé des affections présentes dans la DM1
- Figure 6 :** Présence de myotonie chez les patients atteints de DM1
- Figure 7 :** Caractéristiques des muscle DM1 et DM2
- Figure 8 :** *Foci* d'ARN dans la DM1 révélés par FISH
- Figure 9 :** Séquestration des protéines MBNL
- Figure 10 :** Les principaux mécanismes moléculaires induits par le transcrit *DMPK* pathologique dans la physiopathologie de la DM1
- Figure 11 :** Modèles de cellules dérivées à partir de patient DM1 ou d'individu sain
- Figure 12 :** Résumé des principaux modèles murins utilisés dans la DM1 présentant des altérations et leurs limites d'utilisation
- Figure 13 :** Composition génomique des paralogues MBNL1, MBNL2 et MBNL3
- Figure 14 :** Niveaux relatifs d'expression des ARNm des gènes MBNL1, MBNL2 et MBNL3 dans différents tissus
- Figure 15 :** Représentation schématique des deux régions de MBNL1 ainsi que les fonctions des différents exons
- Figure 16 :** Structure d'interaction de MBNL1 avec l'ARN et son motif
- Figure 17 :** Architecture des domaines doigt de zinc (ZnF) des protéines MBNL
- Figure 18 :** Représentation schématique de la régulation des exons alternatifs dépendant de MBNL
- Figure 19 :** MBNL1 et MBNL2 régulent la transition des isoformes fœtales à adultes des ARN messagers
- Figure 20 :** Représentation schématique de la polyadénylation alternative (APA)
- Figure 21 :** MBNL1 régule la polyadénylation des ARN
- Figure 22 :** Localisation des ARN neuronaux selon leur épissage
- Figure 23 :** Exemples d'approches thérapeutiques ciblées pour la Dystrophie Myotonique de type 1
- Figure 24 :** Les approches d'ingénierie génomique dans le cadre de la DM1
- Figure 25 :** Différentes approches d'inhibition de la transcription

Figure 26 : Différentes approches de dégradation de *DMPK* par l'utilisation d'endonucléases

Figure 27 : Principe de dégradation spécifique des transcrits *DMPK* mutés à l'aide d'oligonucléotides antisens gapmer

Figure 28 : Approches d'inhibition de la séquestration des protéines MBNL par les triplets CUG des transcrits toxiques à l'aide d'oligonucléotides antisens (ASO)

Figure 29 : Principe de neutralisation d'un miR (miRNA) endogène à l'aide d'une séquence complémentaire inhibitrice spécifique (antagomiR ou éponge à miR)

Figure 30 : Stratégie utilisant des oligonucléotides antisens (ASO) pour corriger l'épissage alternatif du canal chlore *CLCN1*

Figure 31 : Caractéristiques des cellules musculaires DM primaires

Figure 32 : Caractérisation des lignées cellulaires de myoblastes DM

Figure 33 : Caractérisation des cultures de myotubes DM1 et CTRL dérivées de lignées cellulaires de fibroblastes converties par l'expression de MyoD

Figure 34 : L'oligonucléotide antisens (CAG)₇ corrige la toxicité de l'ARN-CUGexp dans les cellules musculaires DM1 immortalisées

Figure 35 : L'outil hU7-(CAG)₁₅ corrige la toxicité de l'ARN-CUGexp dans les lignées cellulaires de myoblastes DM1

Figure 36 : Effet de l'oligonucléotide antisens hU7-(CAG)₁₅ sur les changements globaux de l'épissage de la DM1

Figure 37 : MBNL1Δ corrige les défauts d'épissage alternatif et le transcriptome des cellules musculaires dérivées d'un patient DM1

Figure 38 : MBNL1Δ a une activité d'épissage réduite mais une affinité de liaison aux répétitions CUG similaire à celle de MBNL1

Figure 39 : MBNL1Δ corrige les événements d'épissage dérégulés dans les cellules musculaires DM1 différenciées

Figure 40 : Effets du traitement par MBNL1Δ sur les principaux processus biologiques dérégulés dans les cellules DM1

Figure 41 : MBNL1Δ ne modifie pas l'expression endogène de MBNL

Figure 42 : La correction des défauts d'épissage de la DM1 par MBNL1Δ nécessite une activité fonctionnelle de MBNL1 endogène.

Figure 43 : La liaison de MBNL1Δ à CUGexp déplace MBNL1 endogène des *foci* d'ARN et réduit les niveaux de CUGexp-ARN dans les cellules musculaires dérivées de patients DM1

Figure 44 : Le leurre MBNL1Δ interfère avec la dynamique des *foci*

Figure 45 : Correction progressive des défauts d'épissage dépendants de MBNL1 dans les cellules DM1 après traitement par MBNL1 Δ

Figure 46 : MBNL1 Δ forme des complexes ARN-CUGexp moins stables que MBNL1

Figure 47 : Comportement des complexes CUGexp-ARN en présence de protéines recombinantes

Figure 48 : L'expression de MBNL1 Δ à l'aide de vecteurs AAV n'a pas d'effet délétère chez les souris WT

Figure 49 : La surexpression de MBNL1 corrige les défauts d'épissage dans la souris HSA^{LR} mais induit une toxicité dans la souris WT

Figure 50 : La surexpression de la GFP et GFP-MBNL1 Δ n'impacte ni le niveau de MBNL1, ni l'épissage alternatif

Figure 51 : Liste des 20 processus biologiques les plus importants dans les muscles de souris WT injectés avec l'AAV-GFP-MBNL1 Δ (haut) ou l'AAV-GFP (bas)

Figure 52 : L'injection intramusculaire d'AAV-MBNL1 Δ corrige les défauts d'épissage et la myotonie chez les souris HSA^{LR}

Figure 53 : MBNL2 Δ corrige les défauts d'épissage de la DM1 chez les souris HSA^{LR}

Figure 54 : Correction à long terme des défauts associés à la DM1 chez les souris HSA^{LR} traitées par MBNL1 Δ

Figure 55 : Le traitement systémique avec AAV-MBNL1 Δ améliore la myotonie, les défauts d'épissage et diminue les niveaux d'ARN-CUGexp chez les souris HSA^{LR}

Figure 56 : Correction des défauts d'épissage par l'AAV9-V5-MBNL1 Δ ou l'AAV9-no tag-MBNL1 Δ chez la souris HSA^{LR}

Figure 57 : Le traitement systémique avec AAV-MBNL1 Δ n'a aucun effet sur l'épissage dans des tissus n'exprimant pas de CUGexp chez les souris HSA^{LR}

Tableau 1 : Événements d'épissage alternatif altérés et associés aux symptômes de la DM

Tableau 2 : Modèles de souris dans la DM1

Annexe 1 : Table récapitulant les amorces et siRNA utilisés dans cette étude

Annexe 2 : Événements d'épissage alternatif différentiels ($|\Delta\text{Psil}| > 0,2$; P ajusté $< 0,05$) déduits de l'analyse des données RNA-seq utilisant rMTAS dans les muscles gastrocnémiens WT traités par la solution saline contre les muscles traités par AAV9-GFP-MBNL1 Δ et dans les muscles gastrocnémiens WT traités par la solution saline contre les muscles AAV9-GFP.

RESUME

Les Dystrophies Myotoniques de type 1 (DM1) et de type 2 (DM2) sont des maladies multisystémiques autosomiques dominantes avec une forte composante neuromusculaire qui en font les maladies musculaires les plus communes chez l'adulte avec une prévalence moyenne d'un malade pour 8000 individus. Ces pathologies sont évolutives et se caractérisent essentiellement par une myotonie, une faiblesse et une fonte musculaire progressives, des déficiences cognitives, des défauts de conduction cardiaque et des troubles respiratoires réduisant fortement l'espérance de vie des patients.

Ces maladies sont causées par une amplification anormale de séquences répétées C(C)TG situées respectivement dans la région 3'UTR du gène *DMPK* et dans l'intron du gène *CNBP*. Ces séquences contenant les expansions répétées sont transcrites et retenues dans le noyau des cellules sous forme d'agrégats riboprotéiques. La présence de ces ARN-C(C)UG toxiques induit notamment la séquestration des protéines de liaison à l'ARN de la famille MBNL. Cette séquestration conduit à la perte de fonction de ces protéines et à la dérégulation d'événements d'épissages alternatifs dont plusieurs ont été associés à des symptômes cliniques chez les patients. Les progrès effectués dans la compréhension du mécanisme pathologique de la DM1 ont permis de développer plusieurs cibles thérapeutiques prometteuses, mais à l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement pour la DM.

Dans ce travail de thèse, j'ai développé un outil de thérapie génique basé sur une modification de la protéine MBNL1. Ce dérivé de MBNL tronqué dans sa partie C-terminale et appelé MBNL Δ , agit comme un leurre pour libérer les protéines MBNL endogènes anormalement séquestrées par les ARN mutés, restaurant ainsi leurs activités d'épissage.

Notre approche a tout d'abord été validée sur un modèle de cellules musculaires DM1 que j'ai caractérisé et qui reproduit les caractéristiques moléculaires spécifiques de la maladie dont la présence de *foci* ribonucléiques et des anomalies de l'épissage alternatif. Le traitement des cellules DM1 par le leurre MBNL Δ permet la délocalisation des protéines MBNL endogènes séquestrées dans les *foci*, modifie la dynamique des *foci* et corrige le transcriptome. L'administration locale ou systémique de MBNL Δ dans un modèle de souris de la DM1 par l'utilisation de vecteurs AAV induit la diminution de l'ARN muté, corrige les défauts d'épissage et la myotonie et ceci jusqu'à 1 an de traitement.

En conclusion, mon travail de thèse a permis de développer et de valider une approche de thérapie génique pour la DM basée sur l'utilisation d'une protéine de liaison à l'ARN modifiée avec une action de leurre.

SUMMARY

Myotonic dystrophies type 1 (DM1) and type 2 (DM2) are autosomal dominant multisystemic diseases with a strong neuromuscular component which makes them the most common muscular diseases in adults with an average prevalence of 1/8000 worldwide. These diseases are progressive and are characterized mainly by myotonia, progressive muscle weakness and wasting, cognitive deficiencies, cardiac conduction defects and respiratory disorders that greatly reduce the life expectancy of patients.

These diseases are caused by the abnormal amplification of C(C)TG repeated sequences located within the 3'UTR of the *DMPK* gene and in the intron of the *CNBP* gene, respectively. These sequences containing the repeat expansions are transcribed and retained in the nucleus of cells as riboprotein aggregates. The presence of these toxic C(C)UG RNAs induces the sequestration of RNA-binding proteins of the MBNL family. This sequestration leads to the loss of function of these proteins and to the deregulation of alternative splicing events, some of which have been associated with DM clinical symptoms. Progress in understanding the pathological mechanism of DM1 has led to the development of several promising therapeutic approaches, but there is still no treatment for DM.

During my PhD, I developed a gene therapy tool based on a modification of the MBNL1 protein. This C-terminal-truncated MBNL protein, called MBNL Δ , acts as a decoy to release endogenous MBNL proteins abnormally sequestered by the mutated RNAs, thus restoring their splicing activity.

Our approach was validated in a DM1 muscle cell model, also characterized in this work, that reproduces disease-specific cellular features including the presence of ribonucleic *foci* and alternative splicing defects. Treatment of these cells with the MBNL Δ decoy induces the delocalization of endogenous MBNL proteins sequestered in *foci*, alters the dynamics of *foci*, and corrects the transcriptome of cells. Local or systemic administration of MBNL Δ in a mouse model of DM1 using AAV vectors induces the decrease of mutated RNA, corrects the splicing defects and myotonia, up to 1 year after a single injection.

In conclusion, my thesis work allowed to develop and validate a gene therapy approach for DM based on a modified RNA binding protein with a decoy action.

INTRODUCTION

I. Dystrophies myotoniques

Les dystrophies musculaires correspondent à une famille de maladies caractérisées par une faiblesse et une dégénérescence musculaires progressives, induisant une atrophie des muscles et une perte de force. Ces maladies d'origine génétique peuvent apparaître à tout âge (dès la naissance, pendant l'enfance ou à l'âge adulte). Il existe une trentaine de formes qui diffèrent par l'âge d'apparition des symptômes, les muscles affectés ou la sévérité.

Parmi elles, la Dystrophie Myotonique (DM) est une maladie multisystémique à transmission autosomique dominante présentant des manifestations cliniques progressives avec une forte composante musculaire mais incluant également le muscle cardiaque, le système nerveux central et d'autres systèmes endocriniens. A ce jour, deux formes distinctes de DM ont été décrites : la Dystrophie Myotonique de type 1 (DM1) et la Dystrophie Myotonique de type 2 (DM2). Alors que les deux types de dystrophie myotonique partagent des caractéristiques cliniques similaires, la DM1 et DM2 restent pourtant deux maladies différentes avec des mutations distinctes. Il n'y a à ce jour aucun traitement curatif pour ces maladies et les traitements actuellement disponibles sont purement symptomatiques afin d'améliorer la qualité de vie des patients.

I.1 Dystrophie myotonique de type 1

La Dystrophie Myotonique de type 1 (DM1 ou maladie de Steinert) fut décrite pour la première fois en 1909 par les docteurs Steinert, Battnet et Gibb. La DM1 est la dystrophie musculaire la plus commune chez l'adulte (Harper et al. 2002) touchant environ une personne sur 8 000 (Harper et al. 2002). La maladie est présente partout dans le monde, avec une prévalence variable d'un pays à un autre. Avec 1 cas pour 500, la DM1 est très répandue dans la région du lac Saint-Clément au Québec, ce qui s'explique par un effet fondateur (un patient DM1 ayant migré d'Europe au XVII^e siècle vers le Québec (Mathieu et al. 1999), alors qu'elle est peu présente en Afrique. Cette pathologie est caractérisée par une atteinte multisystémique affectant principalement le muscle squelettique avec de la myotonie (défaut de relaxation musculaire après une contraction), une atrophie, une faiblesse progressive et, au niveau du muscle cardiaque, des défauts de conduction. Elle atteint également d'autres organes entraînant ainsi des troubles cognitifs, des dysfonctionnements endocriniens, des problèmes de cataracte et une résistance à l'insuline (Harper et al. 2002). La pathologie s'exprime de façon différente d'un patient à un autre, notamment en fonction de l'âge de l'apparition des symptômes, allant de la forme adulte tardive presque inexistante à des formes très graves chez le nouveau-né.

I.1.1 Cause génétique

La cause génétique, décrite en 1992, est une large expansion instable de séquences trinuécléotidiques (CTG)_n répétées dans la région 3' non traduite (3'UTR) du gène *DMPK* (Dystrophia Myotonica Protein Kinase) (Brook et al. 1992; Fu et al. 1992; Mahadevan et al. 1992) situé sur le chromosome 19q13.3 (**Figure 1**).

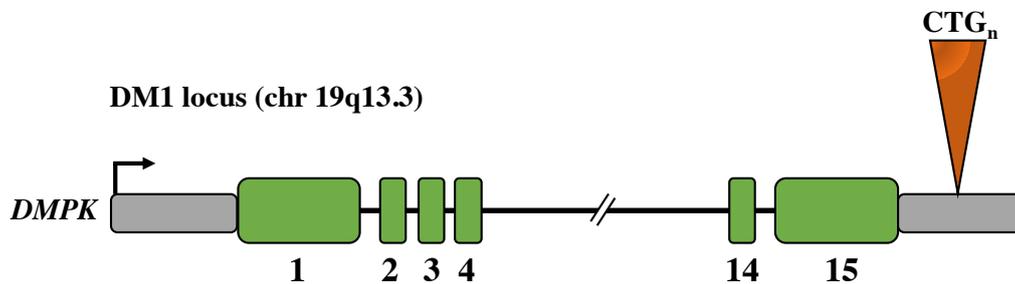


Figure 1 : Représentation schématique du gène *DMPK*

Dans la population générale, un individu portant les allèles *DMPK* sains, présentera un nombre de répétitions compris entre 5 et 37 CTG, alors que chez les patients atteints de DM1, le nombre de répétitions (CTG)_n au sein de l'allèle mutant de *DMPK* varie entre 50 et 5 000 répétitions. Il est globalement admis que la sévérité de la pathologie serait corrélée à la taille des répétitions (De Antonio et al. 2016). Avec un nombre de répétitions (CTG)_n compris entre 38 et 50, l'individu restera globalement asymptomatique (Joosten et al. 2020). En revanche, dès lors que le nombre de répétitions (CTG)_n dépassera les 50, l'individu développera les symptômes cliniques de la maladie. On distingue plusieurs formes de la maladie qui corrént avec la taille des expansions. Les individus présentant les formes les plus graves sont en général les individus présentant les tailles d'expansions les plus élevées.

I.1.2 Différentes formes de la DM1 : classification et symptômes associés

La DM1 présente une large hétérogénéité des symptômes, ce qui accroît la complexité de la mise en place d'une classification précise de la pathologie. Une étude menée par le Dr. Bassez à l'aide du DM-Scope (Observatoire français des dystrophies myotoniques) sur 2 167 patients DM1, a permis d'étudier le lien entre les symptômes cliniques majeurs des patients et leur génotype. Cinq formes cliniques de la pathologie ont pu être décrites et classées selon l'âge d'apparition des symptômes. Cette classification est importante dans la prise en charge

thérapeutique des malades, mais également pour la constitution de cohortes dans le cadre d'essais cliniques (De Antonio et al. 2016) (**Figure 2**).

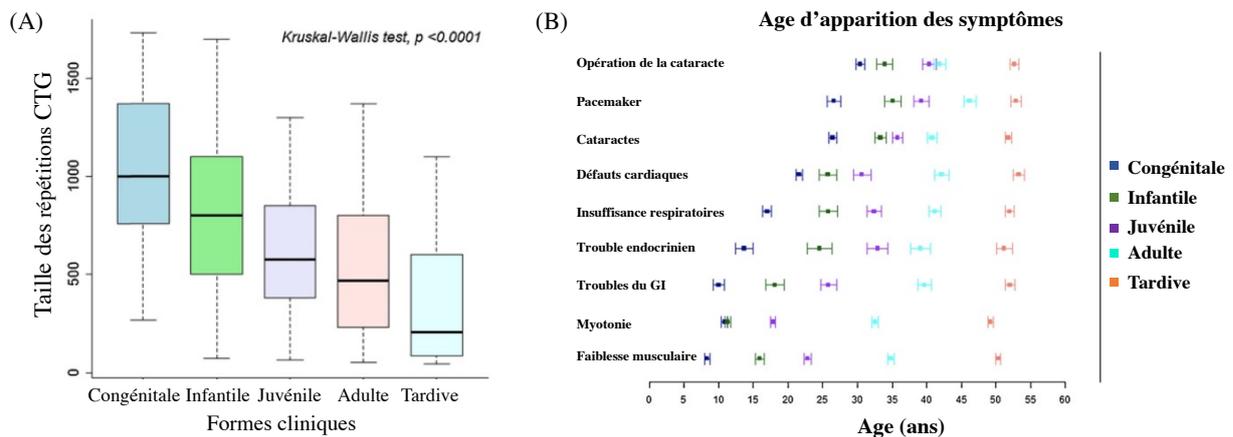


Figure 2 : Classification clinique de la DM1 selon 5 formes. A) Représentation du nombre de répétitions CTG selon les formes DM1, B) Représentation des principales manifestations cliniques selon l'âge d'apparition et la forme DM1 (De Antonio et al., 2016)

I.1.2.1 La forme tardive (ou légère)

Le patient a en général plus de 50 ans et une taille de répétitions comprise entre 50 et 100 CTG (García de Andoin et al. 2005). La moins grave des formes de la DM1, elle est caractérisée par une cataracte (opacité du cristallin) précoce légère, se traduisant par une baisse de la vision, une calvitie et parfois des troubles cardiaques.

I.1.2.2 La forme adulte

Cette forme touche les adultes âgés entre 20 et 40 ans, présentant une taille de répétitions comprise entre 100 et 800 répétitions. Elle est la forme typique et la plus répandue de la DM1, avec l'apparition de la myotonie, de faiblesse musculaire au niveau des muscles crâniens, du tronc, de la face et notamment des paupières (ptosis), du cou et des membres distaux. L'atteinte du diaphragme est à l'origine de difficultés respiratoires développées par le patient. L'atteinte cardiaque est impliquée dans la mort subite des malades. Des troubles gastro-intestinaux, du comportement, un manque de motivation, et une apathie sont très typiques des malades.

I.1.2.3 La forme juvénile

Cette forme touche les patients âgés de 10 à 20 ans, présentant une taille de répétitions CTG comprise entre 500 et 1 000 répétitions. Les atteintes neurologiques sont plus prononcées et précèdent les symptômes musculaires dans la majorité des cas. Elles sont traduites par un déficit

intellectuel amenant à des problèmes d'apprentissage accompagnés par des troubles du spectre autistique ainsi qu'une réduction des interactions sociales.

I.1.2.4 Forme infantile

Cette forme touche les enfants de moins de 10 ans, présentant un peu moins de 1 000 répétitions CTG. En plus des symptômes observés dans la forme juvénile, on note des atteintes du système nerveux central entraînant un retard du langage et des difficultés scolaires. Ces enfants présentent également des signes de fatigue, de lenteur et un début de faiblesse musculaire.

I.1.2.5 La forme congénitale (cDM1)

Cette forme touche les enfants âgés de 0 à 1 mois. Il s'agit de la forme la plus sévère de la maladie, présentant une taille de répétitions supérieure à 1 000 CTG. Elle se manifeste pendant la grossesse avec un excès de liquide amniotique (hydramnios) et une diminution des mouvements de l'embryon. A la naissance, les nouveau-nés manifestent une détresse respiratoire importante et une hypotonie globale pouvant provoquer la mort. Les nouveau-nés arrivant à franchir cette période périnatale critique montrent un retard psychomoteur très sévère, un défaut de succion et de déglutition.

I.1.3 Mutation : expansion de CTG

I.1.3.1 Phénomène d'anticipation

Le phénomène d'anticipation se caractérise par l'aggravation de la maladie alors que l'âge d'apparition de la maladie diminue d'une génération à une autre. Ainsi, des patients présentant des symptômes légers associés à une expansion d'une centaine de CTG donnent généralement naissance à des enfants avec des expansions plus grandes et des symptômes plus sévères. Par conséquent, dans une famille atteinte de DM1, il est fréquent de retrouver une grand-mère ayant une forme tardive bénigne, une mère présentant une forme adulte, et un enfant souffrant d'une forme congénitale. Par exemple, comme présenté en **Figure 3**, tous les individus sont atteints mais le dernier des enfants de la fratrie présente des symptômes cliniques aggravés.

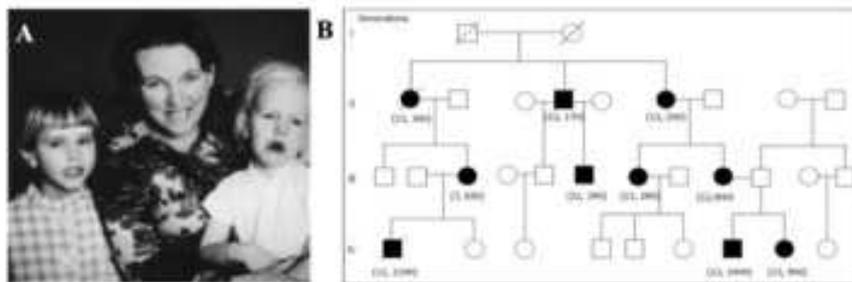


Figure 3 : Représentation du phénomène d'anticipation dans une famille DM1. A) Photographie d'une famille dont la mère et ses deux enfants sont atteints de la DM1. Le dernier de la fratrie est plus atteint avec une hydrocéphalie et une bouche « triangulaire », B) Arbre généalogique représentatif d'une famille DM1, entre parenthèses le nombre de répétitions dans le gène *DMPK*. (Gamstorp, 1985; Ho et al., 2015)

I.1.3.2 Instabilité intergénérationnelle et mosaïque somatique

Le phénomène d'anticipation associé à l'augmentation de la taille de l'expansion CTG au fil des générations est dû à une instabilité très élevée des expansions CTG dans les cellules germinales (Ashizawa et Sarkar 2011). Dans de nombreux cas, quand l'allèle muté est transmis par la mère, l'expansion du nombre de CTG tend préférentiellement à l'augmentation. De façon très sporadique, quand l'allèle muté est transmis par le père, des contractions de la taille des expansions CTG (inférieur à 10% de cas de transmission) peuvent être observées (Lavedan et al. 1993). En plus de l'augmentation du nombre de CTG au cours des générations, la taille de l'expansion est variable au sein d'un même individu et tend à augmenter au cours de la vie du patient, et ceci à un rythme différent entre les tissus. Par exemple, on observera une augmentation plus rapide dans le cerveau et dans le muscle que dans le sang, complexifiant encore plus le diagnostic puisque le nombre de répétitions est évalué dans le sang et non dans un autre organe. Cette augmentation résulte de l'instabilité des répétitions au niveau somatique (Higham et al. 2012; Morales et al. 2012) causant ainsi un fort mosaïcisme tissulaire.

I.1.4 Dystrophie myotonique de type 2

Il existe une autre forme de DM qui est la DM2. Anciennement appelée PROMM, elle a été découverte plus tardivement (2000) que la DM1 et a un taux d'incidence d'un individu touché sur 20 000, mais semble être sous-estimée (Suominen et al. 2011). La DM2 est aussi une maladie à expansion de répétitions dont la cause génétique est la présence dans le premier intron du gène *CNBP* (CCHC-type zinc finger nucleic acid binding) de répétitions de tétramères CCTG, et se localise sur le chromosome 3 (3q21) (Day et al. 1999; Liquori 2001; Ranum et al.

1998; Ricker 1999) (**Figure 4**). L'allèle normal compte moins de 30 répétitions CCTG alors que l'allèle muté porte entre 75 et jusqu'à 11 000 répétitions, avec une moyenne de 5 000 répétitions dosées dans la sang (Liquori 2001). Contrairement à la DM1, il n'a pas été rapporté de forme congénitale de la DM2. De même, aucune corrélation entre l'âge ou la sévérité d'apparition et le nombre de répétitions CCTG n'a été observée. Malgré un nombre de répétitions supérieur aux répétitions dans la DM1, la DM2 reste moins sévère.

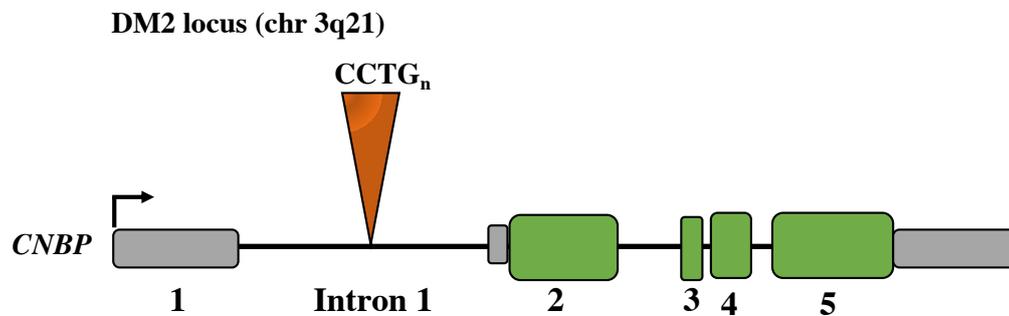


Figure 4 : Représentation schématique du gène *CNBP*

I.1.5 Le diagnostic

Un examen clinique général du patient associé à un électromyogramme (EMG) permettra d'identifier les atteintes musculaires et une biopsie musculaire permettra également de mettre en évidence des aspects histopathologiques caractéristiques de la maladie. La taille approximative de l'expansion sera confirmée par PCR pour une taille inférieure à 100 répétitions ou par Southern Blot pour des expansions plus grandes. Il est important de considérer la difficulté d'établir la taille exacte des expansions du patient, puisqu'elle dépendra toujours du tissu analysé. Par exemple, la taille de répétitions CTG sera toujours plus petite dans une analyse réalisée à partir de sang que dans une analyse réalisée dans un tissu musculaire, et ce, même si les 2 tissus proviennent du même individu (Anvret et al. 1993; Monckton et al. 1995; Thornton, Johnson, et Moxley 1994).

I.2 Aspects cliniques

La dystrophie myotonique est une maladie multisystémique affectant principalement le muscle, mais également de multiples organes avec une forte variabilité de sévérité (**Figure 5**). La faiblesse et l'atrophie musculaires ainsi que la myotonie sont reconnues comme les principales caractéristiques de la DM. Par conséquent, le tissu musculaire est un des tissus le mieux

caractérisé. Les deux formes de DM partagent des caractéristiques cliniques communes, pourtant les symptômes sont moins prononcés et moins graves dans la DM2 que dans la DM1.

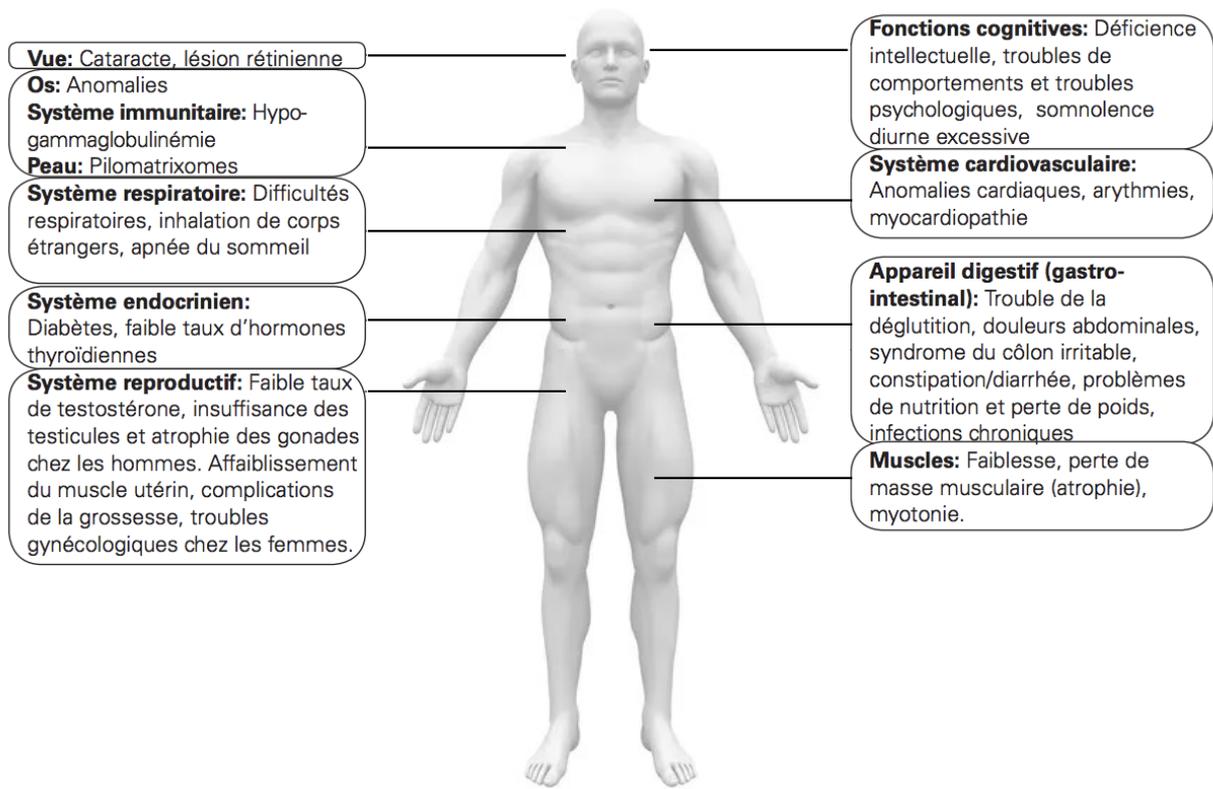


Figure 5 : Résumé des affections présentes dans la DM1. (D'après le rapport de la Fondation Dystrophie Myotonique)

I.2.1 Symptômes musculaires

I.2.1.1 Myotonie

La myotonie ou contraction musculaire prolongée, est l'un des premiers signes observés chez les patients atteints de DM1. La myotonie n'est pas le plus invalidant des symptômes mais est reconnue comme une des caractéristiques principales de la maladie la distinguant des autres formes de dystrophie musculaire. Elle est définie comme un défaut de relaxation musculaire affectant la quasi-totalité des patients DM1 et plus sévèrement les membres, les mains, les pieds, la mâchoire et la langue. Cette myotonie peut être mesurée par EMG (Hudson, Ebers, et Bulman 1995) (**Figure 6**). Contrairement aux patients DM1 montrant une forte myotonie, les patients DM2 ne montrent pas, peu ou une myotonie très modérée. Il a cependant été rapporté des cas sporadiques de DM2 présentant une myotonie sévère (Young et al. 2010).

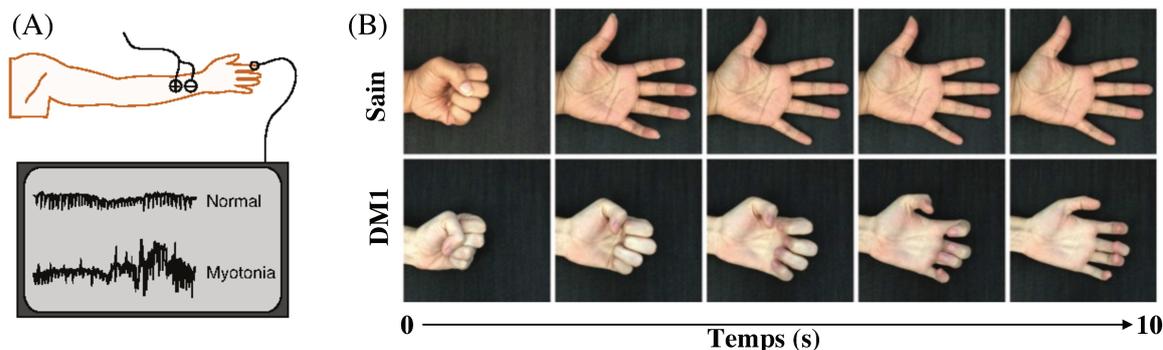


Figure 6 : Présence de myotonie chez les patients atteints de DM1

A) Électromyogramme (EMG) montrant la myotonie. B) Myotonie se manifestant par une difficulté à ouvrir la main après avoir serré le poing (Adapté de Thomas et al., 2018)

I.2.1.2 Faiblesse musculaire

La faiblesse musculaire est une des caractéristiques de la DM1 et la principale cause de handicap rencontrée chez les patients (De Antonio et al. 2016). Différents groupes de muscles sont affectés inégalement dans la DM1, mais la faiblesse musculaire est généralement symétrique. Il est courant que certains muscles conservent une force normale alors que d'autres sont affaiblis. Les premiers symptômes se présentent au niveau des muscles faciaux et de la mâchoire par une atrophie des muscles temporaux et sternomastoidiens entraînant des difficultés à mâcher et à avaler (Wenninger, Montagnese, et Schoser 2018). Une faiblesse des muscles respiratoires apparaît chez les patients DM1 provoquant une insuffisance respiratoire mortelle. Les muscles expiratoires touchés en premier entraînent des pneumonies récurrentes et un dégagement insuffisant des voies aériennes (Reardon et al. 1993). La faiblesse affecte également les muscles distaux (situés aux extrémités des membres), principalement les fléchisseurs des doigts, les fléchisseurs du poignet et les extenseurs du pied (Jiménez-Moreno et al. 2018; Wenninger et al. 2018), impactant la mobilité et la dextérité des mains ainsi que la capacité à soulever des objets. Cette faiblesse progresse lentement au cours de la vie du patient, touchant progressivement les zones proximales des membres (proches de l'axe du tronc). Le processus de perte de force musculaire a été documenté par des études histologiques et montrent de nombreuses anomalies caractéristiques de la maladie. Ainsi les muscles affectés montrent une variabilité du diamètre de fibres musculaires, avec une atrophie des fibres de type I, accompagnée de fibres de type II hyper ou hypotrophiées. D'autres événements moins étudiés révèlent la présence de gras et de tissus conjonctifs (Meola et Cardani 2015). Une caractéristique histologique complémentaire observée dans les fibres musculaires squelettiques est la présence de noyaux centraux (**Figure 7**). Ce phénomène est habituellement observé dans les fibres nouvellement formées après dégénérescence, mais ne s'explique pas dans le cas de la

DM1 car les études n'ont pas montré de régénération massive dans les muscles de patients. Cependant les noyaux retrouvés en position centrale pourraient altérer l'organisation du sarcomère et affecter la propriété contractile des myofibrilles (Harper, Brook, et Newman 2001).

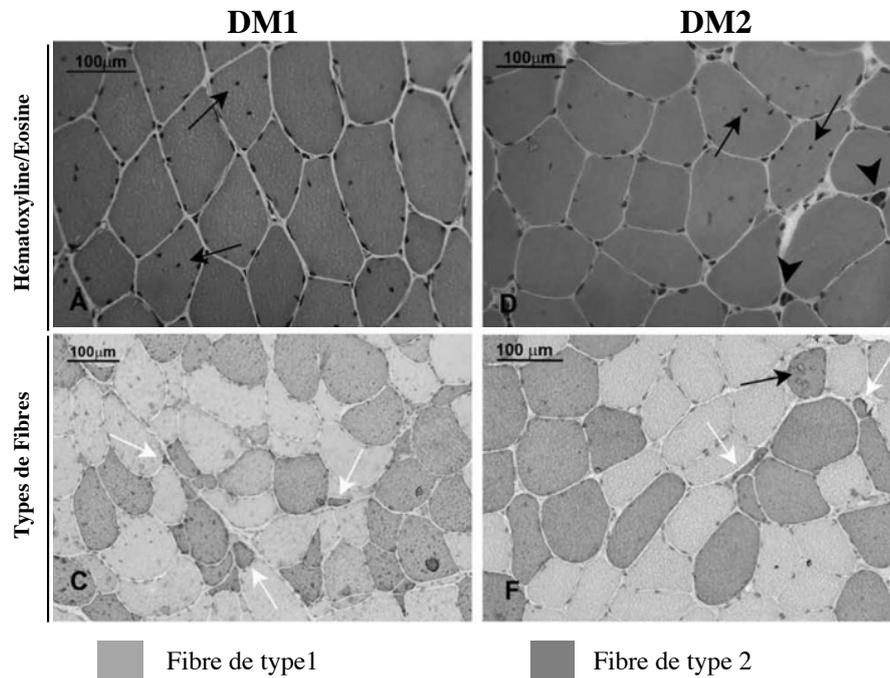


Figure 7 : Caractéristiques des muscle DM1 et DM2

Panneau supérieur : Coloration Hématoxyline/Eosine de coupes musculaires transversales de patients A) DM1 et D) DM2. (Flèches noires : Fibres présentant des noyaux centraux. Têtes de flèches : amas nucléaire. Panneau inférieur : Immunohistochimie montrant une atrophie de C) fibres de type I (Flèches Blanches), et F) fibres de type II. (Flèches noires).

I.2.1.3 Dysfonctionnement cardiaque

Dans la DM1, l'atteinte cardiaque est fréquente et représente la deuxième cause de mortalité (de Die-Smulders et al. 1998). Afin de prévenir la mort subite du patient, le diagnostic cardiologique et un suivi régulier par ECG est crucial. Les patients portent souvent des stimulateurs ou des défibrillateurs cardiaques en raison de défauts de conduction et d'arythmies graves (Yoshida et al. 2018). D'autres manifestations peu fréquentes sont l'insuffisance cardiaque, la cardiopathie ischémique et le prolapsus de la valve mitrale (Bassez al. 2004; Wahbi et al. 2013). Des cardiomyopathies dilatées peuvent également survenir chez certains patients, mais ne sont pas fréquentes. Les anomalies cardiaques dans la DM2 sont similaires à celles observées dans la DM1 mais surviennent moins fréquemment (Day et al. 2003). Dans la DM1, la sévérité de l'atteinte cardiaque semble directement corrélée à la taille de l'expansion CTG (Chong-Nguyen et al. 2017).

I.2.2 Symptômes extra-musculaires

I.2.2.1 Système nerveux central

L'atteinte cérébrale dans la DM montre des dysfonctionnements comportementaux et cognitifs qui sont plus sévères chez les patients atteints de DM1 que ceux atteints de DM2. Les symptômes les plus fréquemment rapportés sont la fatigue, la somnolence diurne et les troubles cognitifs avec une attention réduite, un comportement d'évitement et une dépression. Dans la DM1, la sévérité de ces symptômes est associée à la taille des répétitions CTG et des retards mentaux sont même décrits chez les patients atteints de la forme congénitale associée à de grandes expansions CTG. De plus, les patients DM souffrent de somnolence diurne excessive et d'apnées du sommeil. Des études par IRM ont révélé une atrophie cérébrale diffuse et des lésions de la substance blanche qui sont corrélées aux troubles cognitifs observés dans un groupe de patients atteints de DM1 (Gourdon et Meola 2017).

I.2.2.2 Tractus gastro-intestinal

Les atteintes du tractus gastro-intestinal sont multiples et fréquentes. L'ensemble du tube digestif du pharynx au sphincter anal peut être impacté. Les patients DM1 signalent souvent une dysphagie associée à une toux déclenchée pendant la prise alimentaire, mais aussi des douleurs thoraciques, des régurgitations, des vomissements et des brûlures d'estomac. Ces symptômes les plus courants concernent le tube digestif supérieur et sont généralement considérés par les patients comme les symptômes les plus graves de la DM. Les douleurs

abdominales, les ballonnements, la présence de diarrhée ou de constipation sont des signes courants d'altération du tube digestif inférieur. De plus, l'incontinence fécale associée à des atteintes des muscles lisses et striés affectent également les patients DM (Bellini et al. 2006).

I.2.3 Autres symptômes

La DM est une pathologie multisystémique affectant également les systèmes reproducteurs et endocriniens. Un hyperinsulinisme consécutif à une résistance à l'insuline tissulaire est remarqué chez les patients. Cette dysfonction peut conduire les patients à développer un diabète de type 2 modéré (Gourdon et Meola 2017; Turner et Hilton-Jones 2014; Wenninger et al. 2018). De plus, un hypogonadisme primaire, caractérisé par une faible concentration sérique de testostérone, une atrophie testiculaire, une oligospermie et une infertilité, est observé chez les patients masculins. Chez les patientes DM1, cet hypogonadisme se manifeste par une concentration sérique élevée en FSH (Follicule-Stimulating Hormone) avec des menstruations irrégulières et des fausses couches fréquentes (Turner et Hilton-Jones 2014; Udd et Krahe 2012). La vue est également affectée chez les patients DM1 et ils sont fréquemment victimes de l'apparition précoce d'une cataracte dite en sapin de Noël (Gourdon et Meola 2017; Montagnese et al. 2017; Udd et Krahe 2012; Wenninger et al. 2018). Enfin, la faiblesse musculaire observée au niveau des muscles entourant l'œil conduit à une fermeture insuffisante des paupières, élevant le risque de conjonctivite chronique (Wenninger et al. 2018). Les risques de cancers sont également augmentés chez les patients DM, développant des tumeurs malignes touchant préférentiellement la peau, le tractus génital, ou la thyroïde. L'œil, la prostate, le colon et le cerveau présentent également un risque accru de cancers.

En résumé, la DM1 est une pathologie multisystémique affectant l'ensemble des organes et principalement le système nerveux central (CNS) et musculaire (**Figure 4**). Les troubles neurologiques incluant l'hypersomnolence, la fatigue et la dépression, dégradent considérablement la qualité de vie des patients (Gourdon et Meola 2017; Laberge et al. 2020; Udd et Krahe 2012; Wenninger et al. 2018). Les symptômes musculaires sont lourdement handicapants pour le patient DM. Les complications cardio-respiratoires sont les principales causes de décès chez le patient et sont responsables de la baisse de leur espérance de vie (entre 53 et 60 ans).

I.3 Mécanismes moléculaires à l'origine de la maladie

Décrite en 1992, l'expansion instable de séquences tri-nucléotidiques (CTG)_n dans la région non codante du gène *DMPK* (Dystrophia Myotonica Protein Kinase), est décrite comme l'anomalie génétique à l'origine du développement clinique de la DM1 (Brook et al. 1992; Fu et al. 1992; Mahadevan et al. 1992). Trois modèles ont été proposés afin d'expliquer le mécanisme moléculaire de la maladie : i) le premier est l'haploinsuffisance du gène *DMPK* porteur de la mutation. Ce modèle se focalise sur un mécanisme de perte de fonction de la protéine DMPK ; ii) le second modèle découle de la présence des grandes répétitions (CTG)_n dans le gène *DMPK* pouvant affecter l'expression des gènes *SIX5* (SIX homeobox 5) et *DMWD* (Dystrophia Myotonic gene with WD repeats), qui flanquent le gène *DMPK* (« effet en Cis ») ; iii) le dernier modèle propose un mécanisme de gain de fonction toxique induit par l'expression de transcrits portant les expansions de répétitions CUG (« effet en Trans »).

I.3.1 L'haplo-insuffisance de *DMPK* et des gènes voisins : « Effet en Cis »

I.3.1.1 Perte de fonction des protéines DMPK

Le gène *DMPK* est situé sur le chromosome 19q13.3. Il code pour une protéine de la famille sérine/thréonine protéines kinases dont les substrats endogènes sont mal identifiés. Bien qu'ubiquitaire, la protéine DMPK est plus fortement exprimée dans les muscles squelettiques, les muscles lisses et cardiaques (Kaliman et Llagostera 2008). Des études ont montré chez la souris et chez le poulet que le gène *DMPK* est exprimé dans les cellules pendant le développement embryonnaire, jouant un rôle clé dans la différenciation des cellules musculaires en culture, et qu'il régulerait également l'apoptose (Harmon et al. 2008). Les premières études menées sur des biopsies musculaires de patient DM1 ont montré que la présence des répétitions (CTG)_n dans le gène *DMPK* affecte son expression et réduit le taux d'ARN messenger (ARNm) et par conséquent la quantité de protéines DMPK de 50% (Fu et al. 1992). Par la suite, il a été montré que cette diminution ne provenait pas d'un défaut de transcription de l'allèle muté, mais qu'il s'agissait d'une rétention des ARNm mutants dans des agrégats nucléaires. La réduction de la quantité de protéines DMPK est donc la conséquence de la séquestration nucléaire des transcrits mutés portant les répétitions instables CUG (Davis et al. 1997; Taneja et al. 1995). Des modèles de souris invalidées pour le gène *Dmpk* n'entraînent pas de phénotype ou alors très tardivement de légers troubles de conduction cardiaque, une faiblesse progressive et des anomalies structurelles des fibres musculaires (Jansen et al. 1996; Reddy et al. 1996a) sans reproduire des symptômes typiques de la DM1. De plus, des

expériences *in vivo* de dégradation massive des transcrits *DMPK* dans des souris et des singes adultes grâce à des approches utilisant des oligonucléotides n'ont montré aucun effet délétère de la diminution des protéines *DMPK*. L'ensemble de ces résultats suggère que l'haploinsuffisance de *DMPK* n'est pas à l'origine de l'apparition des symptômes.

I.3.1.2 Perte de fonction des protéines flanquantes : *SIX5* et *DMWD*

Le gène *DMPK* se trouve dans un locus génétique très riche comprenant à moins d'un kilobase, le gène *DMWD* (Dystrophia Myotonic gene with WD repeats) en amont et le gène *SIX5* (Sine oculis homeobox homolog 5) en aval. La présence de plusieurs milliers de répétitions CTG au sein du gène *DMPK* modifie la structure de la chromatine de ce locus et réduit l'expression des gènes flanquants. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer cet effet sur l'expression des gènes *SIX5* et *DMWD*, comme par exemple en empêchant l'interaction du facteur de transcription avec l'ADN dans les régions régulatrices adjacentes ou en empêchant la progression de l'ARN polymérase (Klesert et al. 1997; Otten et Tapscott 1995; Thornton et al. 1997). Le gène *SIX5* est un gène conservé chez l'homme et chez la souris. Il est impliqué dans l'organogenèse et est essentiel pour le développement du système visuel chez la Drosophile. Plusieurs études ont montré une diminution de l'expression de *SIX5* dans des cellules humaines DM1 (Klesert et al. 1997; Thornton et al. 1997). Le gène *DMWD* est un gène qui est essentiellement exprimé dans le cerveau, et dont les fonctions sont encore mal connues (Westerlaken et al. 2003) mais aussi au niveau de la rétine et des testicules (Alwazzan et al. 1999; Westerlaken et al. 2003). Également, une diminution de *DMWD* a été observée dans des fibroblastes DM1 (Alwazzan et al. 1999), mais cette sous-expression reste controversée (Alwazzan et al. 1999; Hamshere et al. 1997). Les modèles de souris développés pour valider l'haploinsuffisance des gènes *Six5* ou *Dmwd* ne récapitulent pas les manifestations multisystémiques des patients DM1. On notera que les souris déficientes en *Six5* développent une cataracte (Klesert et al. 2000; Sarkar et al. 2000; Wansink et Wieringa 2003), et les souris adultes KO hétérozygotes pour *Dmwd* ont une diminution de la taille de fibres (Yin et al. 2020).

I.3.2 Gain de fonction toxique de l'ARN mutant *DMPK* : « effet en Trans »

La troisième hypothèse propose un mécanisme pathogénique médié par un gain de fonction toxique de l'ARN contenant des expansions CUG (Ciesiolka et al. 2017).

I.3.2.1 Inclusions ribonucléaires (*Foci*)

Dans ce modèle, l'expansion (CTG)_n de l'allèle muté *DMPK* est transcrite, générant ainsi des transcrits contenant une expansion de triplets CUG. Cette expansion se replie et forme des structures secondaires doubles brins en « épingles à cheveux » (ou hairpin) (Sobczak et al. 2003). Ces ARN portant les expansions CUG (ARN-CUG) ne sont pas exportés vers le cytoplasme et sont retenus dans le noyau sous forme d'agrégats ponctués, aussi appelés *foci*. (Davis et al. 1997; Miller 2000; Taneja et al. 1995) (**Figure 8**). Les transcrits *DMPK* mutants ainsi exprimés, subissent l'épissage alternatif, un coiffage en 5' et une polyadénylation indiquant que leur rétention nucléaire n'est pas la conséquence d'une perturbation de la prise en charge du pré-ARN messager (Davis et al. 1997; Hamshere et al. 1997).

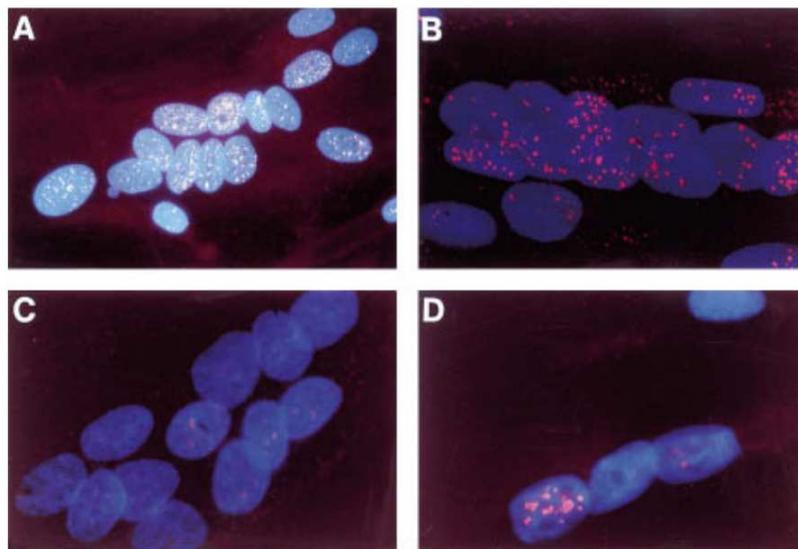


Figure 8 : Foci d'ARN dans la DM1 révélés par FISH

(A-B) et D) : Myoblastes issus de patients DM1. C) Myoblastes issus de patient sain (D'après Davis et al. 1997)

La démonstration que la DM1 est une maladie médiée par l'ARN-CUG a été obtenue à l'aide de modèles de souris transgéniques. Ainsi, le modèle HSA^{LR} présente une expansion de 220-250 répétitions CTG insérée dans la région non codante du gène *ACTA1*, et développe une myotonie, une myopathie associée à la présence d'inclusions ribonucléiques (Mankodi et al. 2000). Les souris DM300, générées par l'insertion d'un fragment génomique humain de ~45 kb contenant le gène *DMPK* muté avec une expansion de 300 CTG, récapitulent les caractéristiques ubiquitaires de la DM1 ainsi que la présence des *foci* d'ARN intranucléaires dans de nombreux tissus dont le muscle squelettique, le cœur et le cerveau (Gomes-Pereira, Cooper, et Gourdon 2011; Huguet et al. 2012; Seznec et al. 2001). La création de ces modèles a permis de démontrer que l'expression des répétitions CUG était à l'origine de la pathologie

et non la perte de fonction du gène *DMPK*. De plus, la découverte de la mutation dans la DM2 a confirmé que l'expression de répétitions dans un autre gène induisait des phénotypes similaires, suggérant donc l'existence d'un mécanisme pathologique commun.

I.3.3 Dérégulation des protéines de liaisons à l'ARN *DMPK* muté

La présence de l'expansion (CTG)_n conduit à la rétention nucléaire des transcrits mutés sous forme de *foci*. Pour expliquer le blocage de l'export de l'ARN muté du noyau vers le cytoplasme, l'hypothèse de la séquestration de protéines de liaison à l'ARN par les transcrits mutés a été proposée (Timchenko et al. 1996).

I.3.3.1 Séquestration et perte de fonction des protéines de la famille MBNL

Des études menées par plusieurs équipes ont identifié que les protéines de liaison à l'ARN de la famille MBNL (muscleblind-like), avaient la capacité de lier les répétitions CUG. De par leur similitude structurelle, tous les paralogues de MBNL (MBNL1, MBNL2 et MBNL3) sont capables de se lier à ces séquences répétées (Fardaei 2002) provoquant ainsi leur séquestration par les ARN-CUG dans les *foci* nucléaires (Dansithong et al. 2005; Fardaei 2001; Holt et al. 2009; Mankodi et al. 2000; Sznajder et al. 2016). La titration de ces protéines est proportionnelle à la longueur des répétitions (Miller 2000) entraînant une diminution de la disponibilité de ces protéines et provoquant la perte de leurs fonctions (**Figure 9**).

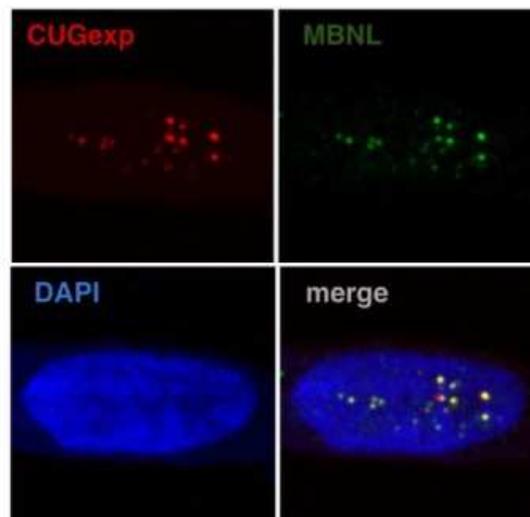


Figure 9 : Séquestration des protéines MBNL

Myoblaste issu de patient DM1 montrant la séquestration des protéines MBNL1 (vert) par les ARN mutés contenant les répétitions (rouge) dans un noyau (bleu).

L'impact de la perte de fonction des protéines MBNL dans la physiopathologie de la DM1 a été démontré par la caractérisation de différents modèles murins de perte de fonction pour les gènes *MBNL*. Notamment, les souris invalidées pour le gène *MBNL1* (*Mbnl1*^{-/-}) développent entre autres de la myotonie (Kanadia et al. 2003). Les souris invalidées pour le gène *MBNL2* (*Mbnl2*^{-/-}) présentent des signes cliniques neurologiques avec des troubles du sommeil, de la mémoire spatiale et de l'apprentissage (Charizanis et al. 2012). Un modèle de souris triple KO pour les 3 paralogues MBNL complète le phénotype avec l'addition d'une détresse respiratoire et d'une atrophie musculaire évoquant les signes cliniques typiques de la forme congénitale de la DM1 (Thomas et al. 2017). Le modèle de souris double KO pour les gènes *MBNL1* et *MBNL2* (*Mbnl1*^{-/-} ; *Mbnl2*^{+/-}) récapitule une grande partie du phénotype typique de la DM1, additionné des troubles de la conduction cardiaque et une faiblesse musculaire progressive (K. Lee et al. 2013; Thomas et al. 2017). Enfin, l'apport exogène d'une isoforme de MBNL1 par une approche locale de thérapie génique dans le muscle squelettique des souris HSA^{LR} permet de corriger certaines caractéristiques associées à la DM1 comme la myotonie (Kanadia et al. 2006). De même, une seconde étude corrobore l'intérêt de la restauration d'une quantité suffisante de protéine MBNL1 afin de corriger le phénotype musculaire. Ainsi, les souris issues du croisement d'une souris HSA^{LR} avec une souris surexprimant *MBNL1*, montrent que l'expression de *MBNL1* est suffisante pour prévenir les phénotypes musculaires squelettiques y compris la myotonie (Chamberlain et Ranum 2012). Ces travaux indiquent donc l'implication directe des protéines MBNL dans la maladie (Kanadia et al., 2006).

I.3.3.2 Dérégulation des protéines de la famille CELF

Les protéines de la famille MBNL1 ne sont pas les seules protéines affectées par le mécanisme de gain de fonction toxique des transcrits *DMPK* mutés. En effet, une augmentation anormale des protéines CELF1 est observée dans la DM1. Initialement connues sous le nom de CUG binding protein ou CUG-BP (Timchenko et al., 1996), les protéines CELF1 (Elav-like family member 1) sont les premières protéines identifiées *in vitro* comme ayant une forte affinité pour les ARN riches en UG. Cependant, elles ne colocalisent pas avec les *foci* nucléaires toxiques *DMPK* dans les cellules dérivées de patients (Fardaei 2002; Timchenko et al. 2001). Le niveau de *CELF1* est augmenté dans les tissus squelettiques et cardiaques de patients (Auinash

Kalsotra et al. 2008; Timchenko et al. 2001) et sa surexpression chez la souris reproduit une myopathie, une mortalité précoce et des troubles de la conduction cardiaque avec une cardiomyopathie (Braz et al. 2018; Koshelev et al. 2010; Ward et al. 2010). La surexpression de *CELF1* est associée à une stabilisation accrue suite à une hyperphosphorylation anormale par la protéine kinase C (PKC) (Kuyumcu-Martinez, Wang, et Cooper 2007). Ainsi, l'inhibition de la voie PKC conduisant à la diminution de la quantité de protéines CELF1 améliore le phénotype de souris transgéniques exprimant un transgène *DMPK* humain contenant 960 CTG (Kuyumcu-Martinez et al. 2007; Morriss et al. 2018; Wang et al. 2009). Néanmoins, le mécanisme par lequel l'expression d'ARN CUG active la PKC reste inconnu à ce jour. Quant à la DM2, les études sont contradictoires, certaines décrivant une surexpression de *CELF1* comme dans la DM1 (Salisbury et al. 2009) tandis que d'autres ne relèvent aucun changement dans des cellules de patients DM2 (Pelletier et al. 2009).

Il est clairement établi que le mécanisme de gain de fonction du transcrit *DMPK* contenant des CUG induit une perte de fonction des protéines MBNL et provoque la dérégulation vers l'augmentation des protéines CELF1.

I.3.3.3 Dérégulation d'autres protéines de liaison à l'ARN

En plus de la dérégulation de l'activité des protéines MBNL et CELF, il a été proposé que les fonctions d'autres protéines de liaison à l'ARN soient altérées par l'expression de répétitions CTG, tels que les Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP), les hélicases de la famille DEAD-box (DDX) ou STAUFEN1.

Contrairement aux protéines MBNL, les protéines hnRNP (hnRNP H, H2, H3, F, A2/B1, K et L) ne reconnaissent pas les répétitions CUG et seule une faible quantité de *foci* montre une colocalisation avec les hnRNP et DEAD-box (moins de 10% des *foci*). Ces protéines sont impliquées dans le métabolisme des ARNm par l'intermédiaire des mécanismes post-traductionnels tels que l'épissage alternatif, l'exportation nucléaire ou encore la traduction (Kim 2005). Le niveau des protéines hnRNPH et hnRNPA1 a été trouvé élevé dans des biopsies de tissus musculaires de patients DM1. Une expression accrue de *hnRNPH* perturbe l'épissage alternatif (Kim et al. 2005; Paul et al. 2011) et la surexpression de *hnRNPA1* aggrave le phénotype observé chez la souris HSA^{LR} (Li et al. 2020). Deux ARN-hélicases, DEAD box protein 5 (DDX5) et DEAD box protein 6 (DDX6), ont été identifiées comme interagissant avec les répétitions CUG et pourraient moduler la structure en épingle à cheveux en déroulant les molécules d'ARN, jouant ainsi un rôle dans la formation et/ou la stabilité des *foci*. Ainsi la

surexpression de DDX5 (p68) dans les cellules DM1 entraîne une réduction d'agrégats d'ARN et une correction partielle de certains événements d'épissage dérégulés dans la DM1 (Jones et al. 2015; Laurent et al. 2012; Pettersson et al. 2015). STAUFEN1 s'est également avérée élevée dans les muscles squelettiques DM1 et les modèles de souris DM1 (DMSXL et HSA^{LR}), mais sans preuve directe de localisation dans les agrégats d'ARN *in vivo*. STAUFEN1 est impliquée dans le transport et la localisation des ARNm dans différents compartiments cellulaires et pourrait jouer un rôle dans l'exportation nucléaire de molécules d'ARN toxiques non agrégés vers le cytosol (Ravel-Chapuis et al. 2012). Sa surexpression régule plusieurs événements d'épissage alternatif altérés dans la DM1, indiquant son rôle en tant que modificateur de la maladie (Bondy-Chorney et al. 2016). D'ailleurs, sa surexpression dans le muscle squelettique de souris DM1 induit des anomalies phénotypiques au niveau musculaire avec une atrophie, une faiblesse musculaire et des défauts histologiques (Crawford Parks et al. 2020). Plusieurs anomalies moléculaires de la DM1 ont été reliées à la dérégulation d'autres protéines que MBNL1 et CELF1 tels que hnRNP ou STAUFEN1. Cependant, la contribution exacte de ces protéines dans la physiopathologie de la DM1 n'est pas clairement établie (Pettersson et al. 2015; Sznajder et Swanson 2019)

I.4 Mécanismes physiopathologiques dans la DM

Les protéines de liaisons à l'ARN CELF1 et MBNL sont les acteurs majeurs dérégulés par le gain de fonction du transcrit *DMPK* muté. Ces protéines ont la particularité d'être des régulateurs clés du métabolisme de l'ARN (Dasgupta et Ladd 2012; Konieczny, Stepniak-Konieczna, et Sobczak 2014a) et contrôlent le passage des isoformes fœtales à adultes au cours du développement tissulaire. La perturbation de ce mécanisme pourrait jouer un rôle central dans la physiopathologie musculaire et cérébrale de la DM1.

I.4.1 Dérégulation de l'épissage alternatif dans la DM

L'épissage alternatif est une étape clé dans la maturation des pré-ARNm. Localisé dans le noyau, l'épissage est le processus par lequel les pré-ARN transcrits à partir de l'ADN génomique subissent des coupures et ligatures qui conduisent à la conservation des exons et l'élimination des introns. Ce mécanisme donne lieu à des ARN messagers (ARNm) dits « matures » pouvant être exportés vers le cytoplasme pour être traduits en protéines. Ceci permet de diversifier le protéome d'une cellule à partir d'un nombre limité de gènes. L'épissage alternatif est donc incontournable pour le développement tissulaire et une différenciation

cellulaire normale. La perte de fonction de MBNL et/ou l'hyperphosphorylation de CELF1 induite par l'expression d'ARN-CUG provoque un déséquilibre dans la régulation de l'épissage alternatif de transcrits cibles et l'expression d'isoformes fœtales immatures pour de nombreux transcrits dans un tissu adulte mature. Cet effet trans-dominant des ARN-CUG sur l'épissage alternatif est considéré comme un mécanisme majeur responsable du phénotype multisystémique. La DM1 est ainsi considérée comme une maladie de l'épissage alternatif. À ce jour, plus d'une centaine d'événements de mauvais épissage de l'ARN ont été identifiés chez les patients et certains d'entre eux, basés sur des études sur des modèles animaux, ont été associés à des symptômes observés chez des patients et sont résumés dans le (**Tableau 1**).

Organes	Symptômes	Gène	Exon(s)	Evènement	Fonction de la protéine	Conséquence moléculaire	Références
Muscle	Faiblesse musculaire	CACNA1S	29	Exclusion	Canal calcique voltage-dépendant CaV1.1 impliqué dans le couplage excitation/contraction	Augmente la conductance de CaV1.1 et la sensibilité au voltage. Dans les fibres matures, augmente la libération de Ca2+	Tang et al., 2012
		BIN1	11	Exclusion	Régulation de la biogenèse des tubules transverses	Tubules transverses anormaux	Fugier et al., 2011
		SERCA1	22	Exclusion	Pompe sarcoplasmique permettant le repompage du Ca2+	Dérégulation de l'homéostasie du Ca2+ dans le réticulum sarcoplasmique. Couplage excitation/contraction perturbé	Kimura et al., 2005
		RYR1	70	Exclusion	Canal calcique essentiel pour la libération du Ca2+ dans le réticulum sarcoplasmique		
	Myotonie	CLCN1	7a	Inclusion	Canal calcique responsable de la conductance transmembranaire au chlore	Dégradation des ARN non-sens qui induit la perte de fonction de la protéine	Mankodi et al., 2002 Charlet et al., 2002 Wheeler et al., 2009
	Atrophie musculaire	PKM2	10	Inclusion	Kinase essentielle pour la glycolyse aérobie	Défauts du métabolisme glycolitique énergétique	Gao et al., 2013
	Processus dystrophique	DMD	78	Exclusion	Protéine structurale et de signalisation qui lie le cytosquelette d'actine à la matrice extracellulaire	Activité anormale de la dystrophine par régression de la partie C-terminale adulte en feuillets β en une forme embryonnaire en hélice α amphipatique	Rau et al., 2015
	Résistance à l'insuline	INSR	11	Exclusion	Récepteur à l'insuline impliqué dans le stockage et le métabolisme du glucose	Augmente l'affinité pour l'insuline et accélère son recyclage et son internalisation	Savkur et al., 2001
	Symptômes progressifs de la pathologie	MBNL1 MBNL2	5 7 8	Inclusion	Protéines de liaison à l'ARN Régulatrices du métabolisme des ARN	Translocation nucléaire des protéines. Altération de l'activité de l'épissage alternatif, la localisation et le choix du site de polyadénylation	Sznajder et al., 2016 Kino et al., 2015 Tran et al., 2010 Yuna et al., 2007

Cœur	Arythmie et délai de conduction	SCN5A	6a 6b	Inclusion Exclusion	Canal sodique responsable de l'excitabilité des cardiomyocytes et de la contraction cardiaque	Excitabilité réduite	Freyermuth et al., 2016
		RBFOX2	43 nt	Exclusion	Protéine de liaison à l'ARN régulatrice de l'épissage alternatif	Epissage alternatif de canaux sodiques et potassiques voltage-dépendants altéré	Misra et al., 2020
Cerveau	Déficit cognitif	MAPT	2 3 6c 6d 10	Exclusion Exclusion Exclusion Inclusion Exclusion	La protéine Tau associée aux microtubules stabilise les microtubules, majoritairement dans les neurones	Apparition progressive d'enchevêtrements fibrillaires formés d'agrégats de MAPT hyperphosphorylée	Sergeant et al., 2001 Leroy et al., 2006 Jiang et al., 2004
	?	CAMKK2	16	Exclusion	Regulateur du développement neuronal	Modifications de l'allongement/de la ramification des neurites	Nakamori et al., 2022
	Mémoire défaillante	NMDAR1	5	Inclusion	Récepteur ionotropique à la synapse neuronale impliqué dans la plasticité synaptique	Délocalisation des dendrites vers le soma	Jiang et al., 2004

Tableau 1 : Événements d'épissage alternatif altérés et associés aux symptômes de la DM

I.4.2 Mécanismes additionnels

Aux défauts d'épissage alternatif dérégulé s'ajoutent d'autres mécanismes moléculaires qui témoignent de la complexité de la maladie.

I.4.2.1 Dérégulation des facteurs de transcription

Des études réalisées sur des biopsies musculaires de patients DM1 et sur des modèles murins de la pathologie révèlent également une altération globale de l'expression des gènes (Du et al. 2010; Wang et al. 2012a; Otero et al. 2021). L'activité de certains facteurs de transcription comme la specificity protein 1 (SP1), le récepteur gamma à l'acide rétinoïque (RAR γ) (Ebraldize et al. 2004) et la protéine de répression associée à SMRT/HDAC1 (SHARP) seraient d'ailleurs altérés dans des cellules musculaires DM1 suite à leur délocalisation de la chromatine par les ARN mutés ou encore une expression diminuée comme NK2 homeobox 5 (NKX2-5) dans le tissu cardiaque des patients DM1 (Yadava et al. 2008).

I.4.2.2 Traduction, localisation et stabilité des ARN

Les protéines MBNL et CELF se lient aux régions introniques et exoniques des ARNm pour réguler l'épissage alternatif. Des expériences de *cross-linking immunoprecipitation* (CLIP) ont également révélé des sites de liaison de ces protéines dans la partie 3'UTR de certains ARN, suggérant des fonctions régulatrices supplémentaires (Dasgupta et Ladd 2012; Wang et al. 2012a). La région 3'UTR étant notamment impliquée dans la localisation, l'efficacité de la traduction et la stabilité de l'ARNm (Andreassi et Riccio 2009), l'altération de l'activité de MBNL1 et CELF1 impacte également le métabolisme de ces ARNm cibles (Masuda et al. 2012; Wang et al. 2012a, 2015). De plus, le choix du site de polyadénylation est également affecté. Dans le modèle murin HSA^{LR}, ces défauts sont principalement dus à la séquestration de MBNL, dont l'interaction dans le 3'UTR est essentielle au choix du site de polyadénylation de certains transcrits (Batra et al. 2014).

I.4.2.3 Dérégulation des miARN

Les miARN sont de petits ARN non-codants régulant l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel. Certaines dystrophies musculaires montrent que l'expression et la distribution intracellulaire de ces miARN sont considérablement dérégulées (Eisenberg, Alexander, et Kunkel 2009; Perbellini et al. 2011). Ainsi, l'expression de plusieurs miARN tels que miR-1, miR-7, miR-10 et miR-335, miR-29b et miR-33 est altérée dans des cellules musculaires dérivées de patients DM (Perbellini et al. 2011; Fernandez-Costa et al. 2013). Dans les tissus cardiaques des patients atteints de DM1, une vingtaine de miARN ont une expression diminuée, associée à des arythmies et à de la fibrose. Parmi ces miR, le niveau de miR-1 est notamment diminué et contribue aux dysfonctions cardiaques observées chez les personnes affectées (Kalsotra et al. 2014; Rau et al. 2011). Sa diminution provoque l'augmentation de l'expression de la sous-unité alpha1 A du canal calcique voltage-dépendant (CACNA1C) et la protéine alpha-1 de la jonction Gap (GJA1). MBNL est elle-même impliquée dans le processing de miR-1 en se liant aux séquences pré-miR-1 et en favorisant leur maturation. La séquestration des protéines MBNL1 par les grandes répétitions (CUG)_n, rend le pré-miR-1 indisponible pour son activation par DICER qui est la ribonucléase responsable de la biogénèse des miARN et des siRNA. D'autres sites de liaisons de MBNL1 ont également été identifiés dans plusieurs autres pré-miARN, suggérant un rôle similaire des protéines MBNL1 pour ces autres cibles (Rau et al. 2011). De plus, il a été montré que miR-7 est diminué dans les biopsies de patients DM et il s'est avéré réguler l'autophagie et le système ubiquitine-protéasome dans les cellules

musculaires humaines (Sabater-Arcis et al. 2020). L'autophagie est le processus de recyclage des composants cellulaires (Kim et Lee 2014) et a été montrée comme hyperactivée dans les cellules musculaires de patients DM1 (Loro et al. 2010). L'inhibition de miR-7 conduit à un défaut de fusion des myoblastes en myotubes en promouvant le processus d'autophagie. Ce défaut est réversible par une surexpression de miR-7 et ne semble pas dépendant de MBNL1 (Sabater-Arcis et al. 2020).

I.4.2.4 L'ARN interférence

La présence des répétitions CUG entraîne la formation d'une structure en épingle à cheveux et les ARN mutés sont retenus dans le noyau. Il a été suggéré qu'ils puissent être clivés par la ribonucléase DICER générant de petits ARN interférants pouvant réguler négativement l'expression de plusieurs transcrits (Krol et al. 2007). Or, le processus de maturation des pré-miARN par DICER étant cytoplasmique, l'hypothèse proposée est peu probable (White et al. 2014). De plus, aucune corrélation n'a été décrite chez les patients et ce processus d'interférence n'a été démontré que dans le modèle *C. elegans* de DM1 (Qawasmi et al. 2019).

I.4.2.5 Transcription des ARN antisens

Les ARN antisens sont transcrits à partir du brin opposé à celui du transcrit sens des gènes codants ou non-codants pour des protéines, et sont soumis à l'activité des gènes voisins. Contrairement aux ARN codants qui s'accumulent dans le cytoplasme, le transcrit antisens s'accumule préférentiellement dans le noyau et est parfois associé à la chromatine. Issus de la transcription bidirectionnelle, les transcrits antisens peuvent réguler l'expression de leurs gènes cibles à une ou plusieurs étapes du processus d'expression génique, de la transcription et de la traduction, jusqu'à la dégradation de l'ARN (Pelechano et Steinmetz 2013). La production d'ARN antisens au locus DM1 a été confirmée et détectée dans des modèles de souris reproduisant la pathologie, mais également dans des tissus fœtaux post-mortem humains (Cho et al. 2005; Batra, Charizanis, et Swanson 2010; Michel, Huguet-Lachon, et Gourdon 2015; Huguet et al. 2012). L'ARN antisens *DMPK* original s'étend sur plus de 6 kb et comporte plusieurs sites d'initiation à la transcription. Soumis à l'épissage alternatif, il produit différents ARN messagers, contenant ou pas des répétitions CAG (Cho et al. 2005; Gudde et al. 2017). L'expression des (CTG)_n provoque l'augmentation d'ARN antisens dans les tissus humains. Leur abondance restant faible, elle augmente pourtant avec la sévérité de la maladie. L'effet de ces transcrits antisens n'est pas clairement établi, mais ils pourraient jouer un rôle dans

l'organisation nucléaire de la chromatine du locus DM1, l'instabilité des répétitions (Nakamori, Pearson, et Thornton 2011), la formation des *foci* et dans la traduction sans CAG (Gudde et al. 2017). De plus, la présence de transcrits antisens a été montrée dans le cytoplasme de myoblastes DM1 (Gudde et al. 2017).

I.4.2.6 Traduction sans ATG : traduction RAN

La traduction RAN (Repeat Associated Non-AUG) est un mécanisme de traduction de protéines qui se produit sans codon d'initiation AUG. Elle se produit lorsque l'ARN messager contient une expansion de séquences répétées provoquant le repliement de l'ARNm en structures secondaires favorisant la traduction RAN. Cette traduction est présente dans de nombreuses maladies causées par des mutations d'expansion répétées dans l'ADN. La DM1 (Zu et al. 2011) et la DM2 (Zu et al. 2017) sont concernées par ce phénomène produisant notamment des polypeptides de polyglutamine dans le tissu squelettique et dans le sang de patient DM1, et des tétrapeptides à motifs répétés Leu-Pro-Ala-Cys à partir du brin sens et Gln-Ala-Gly-Arg à partir du brin antisens dans le cerveau de patients DM2. Leur rôle toxique dans la DM1 n'est pas clairement établi mais la présence des produits protéiques issus de la RAN pourrait participer au mécanisme pathologique. Il a été montré que ces produits forment des agrégats protéiques qui colocalisent avec la Capsase8 et se retrouvent également au niveau de l'appareil de Golgi. Leur présence anormale suggère un rôle dans l'induction de l'apoptose et la mort cellulaire appuyant ainsi un mécanisme supplémentaire dans la cytotoxicité cellulaire (Zu et al. 2011; Koehorst et al. 2021).

Conclusion sur la pathologie et les mécanismes impliqués dans la maladie

La Dystrophie Myotonique de type 1 est une maladie complexe et depuis la découverte de la mutation, les chercheurs ont proposé plusieurs mécanismes physiopathologiques. L'origine génétique de la pathologie est l'expression de séquences CTG anormalement répétées dans le gène *DMPK*. La rétention nucléaire des ARN mutés a permis de proposer un modèle défini par un gain de fonction toxique. Continuellement produit, ces ARN séquestrent les protéines de la famille MBNL dans le noyau. Ainsi, la perte de fonction des protéines MBNL induit une dérégulation du transcriptome. La perturbation de ces régulateurs provoque la dérégulation d'un nombre élevé d'épissages alternatifs dont certains ont été corrélés à des symptômes cliniques. En particulier, l'anomalie d'épissage du canal chlore *CLCN1* est associée à la myotonie. De plus, la polyadénylation alternative, la localisation, la stabilité et la traduction de nombreux de transcrits cibles sont perturbées. Enfin, les transcrits *DMPK* mutés sont à l'origine de la perturbation de la biogénèse de miR, de la production d'ARN interférants et de polypeptides (**Figure 11**).

La nécessité de compréhension des mécanismes physiopathologiques de la DM1 est cruciale pour le développement de thérapies pour les patients et passe par le développement de modèles d'études pertinents.

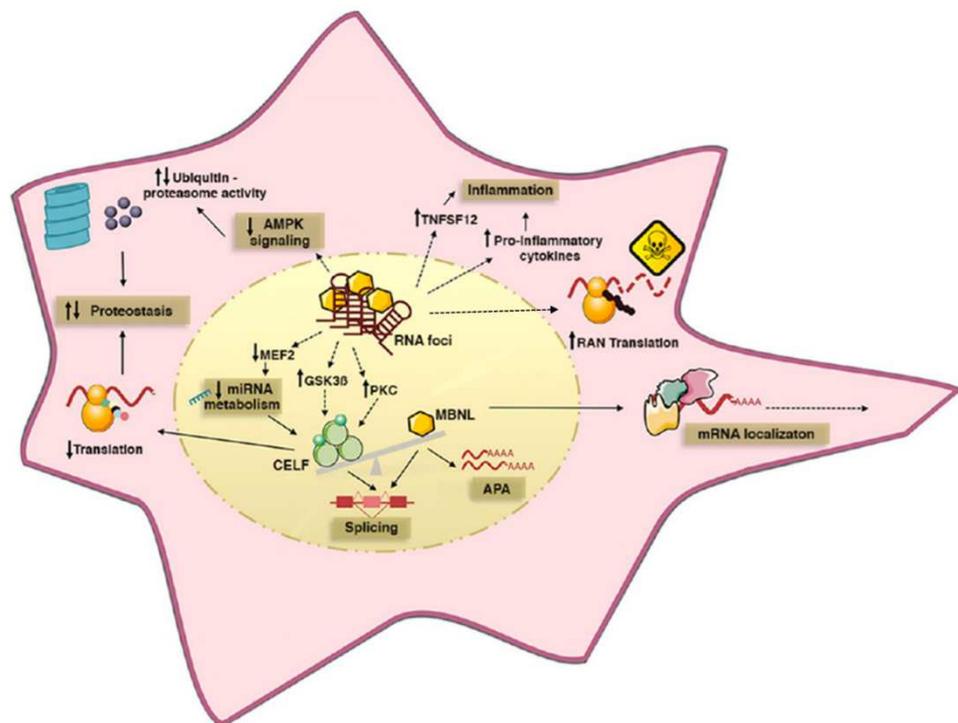


Figure 10 : Les principaux mécanismes moléculaires induits par le transcrit *DMPK* pathologique dans la physiopathologie de la DM1. (Adapté de Braz et al., 2018).

II. Modèles de la maladie

Depuis l'identification de la mutation, plusieurs modèles *in vivo* et *in vitro* ont été développés et utilisés pour déterminer les mécanismes pathologiques de la DM. Ces différents modèles récapitulent plusieurs caractéristiques de la maladie comme la formation de *foci*, la séquestration des protéines MBNL1 et les défauts d'épissage. La pathologie faisant partie des maladies les plus hétérogènes et complexes, aucun modèle ne récapitule l'ensemble des phénotypes. De plus, il existe aussi un besoin de modèles cellulaires pertinents pour comprendre les mécanismes moléculaires liés à la pathologie et évaluer les approches thérapeutiques.

II.1 Modèles cellulaires

II.1.1 Modèle d'expression plasmidique des CTG

L'expression exogène de répétitions CTG dans différents types cellulaires a été largement utilisée comme outil pour confirmer le rôle des répétitions dans les mécanismes pathologiques de la DM1. La majorité des modèles propose une insertion de la partie 3'UTR du gène *DMPK* partiellement complet, principalement sous le contrôle du promoteur Cytomégalovirus (CMV). Ces transcrits sont exprimés de manière transitoire ou stable dans des lignées cellulaires humaines ou murines bien caractérisées (Amack et Mahadevan 2001; Lee, Bennett, et Cooper 2012). Malgré l'absence d'une partie du contexte génomique complet de l'expansion CTG et de son propre promoteur, ces modèles récapitulent certaines caractéristiques associées à la DM1 telles que la formation des agrégats ribonucléaires colocalisant avec les protéines MBNL, et des défauts d'épissage caractéristiques de la DM1 (Ho et al. 2005; Philips, Timchenko, et Cooper 1998; Warf et Berglund 2007). À ce jour, plusieurs constructions contenant des répétitions CTG de différentes tailles ont été décrites et manipulées (Kang et al. 1995; Philips et al. 1998; Amack et Mahadevan 2001; Kim et al. 2005; Kelley, Haerle, et Wang 2022). L'expression exogène de répétitions longues et pures à l'aide de plasmides représente tout de même un défi technique en raison de leur instabilité, limitant ainsi considérablement les longueurs de répétitions clonées (Amack et Mahadevan 2001; Kang et al. 1995; Kim et al. 2005; Philips et al. 1998). Cependant, certaines équipes ont partiellement surmonté cette contrainte en clonant des répétitions atteignant 800 ou 914 CTG ininterrompus dans le contexte 3'UTR du gène *DMPK* (Huichalaf et al. 2010; Nakamori, Pearson, et al. 2011). Afin d'assurer la stabilité de l'expansion, le problème de clonage de répétitions pures a été contourné par l'insertion de séquence CTCGA toutes les 20 répétitions CTG. Ainsi, une construction

exprimant 960 répétitions CTG interrompues a été établie et utilisée dans de multiples études sur les mécanismes moléculaires et la validation d'approches thérapeutiques (Ho et al. 2005; Piotr Konieczny et al. 2017). Les modèles cellulaires *in vitro* exprimant des répétitions CTG exogènes ont donc largement été utilisés et sont de bons modèles pour le criblage de petites molécules ou les études moléculaires. Cependant, ils présentent des limites notamment celui du niveau de surexpression des CTG puisque que ces répétitions ne sont pas sous le contrôle du promoteur *DMPK* endogène. De plus, la pureté, la taille des répétitions ou l'absence du contexte génomique *DMPK* complet limite leur utilisation dans des études spécifiques de mécanismes tissulaires, moléculaires ou de criblage de molécules thérapeutiques.

II.1.2 Modèles cellulaires issus de patient DM1

Les cellules primaires obtenues à partir de biopsies faites sur des patients représente une source de matériel biologique pour créer des modèles cellulaires, si elles reproduisent les caractéristiques moléculaires. Pour la DM1, les cellules issues de patients représentent des modèles précieux puisque les expansions CTG sont exprimées dans leur contexte naturel et reproduisent les caractéristiques de la maladie telles que les *foci* d'ARN CUG qui colocalisent avec les protéines de la famille MBNL (Fardaei et al. 2002; Miller 2000) et l'altération de l'épissage alternatif de nombreux transcrits (Buj-Bello et al. 2002; Gao et al. 2016; Marteyn et al. 2011). Cependant, il est important de prendre en considération la variabilité des échantillons issus de patients atteints de formes différentes de la maladie (de congénitale à adulte) et de la variabilité de la taille des expansions au sein d'un même individu.

II.1.2.1 Cellules humaines primaires : Fibroblastes et myoblastes

Les cultures de cellules primaires sont principalement constituées de fibroblastes dermiques et de cellules musculaires squelettiques, également appelées myoblastes. Ces cellules sont isolées directement des biopsies de patient par une digestion enzymatique de la matrice extracellulaire ou par la technique d'explant (prélèvement de petits morceaux de biopsie mis en cultures à partir desquels les cellules migrent et prolifèrent). Les cellules primaires ont la capacité de conserver les caractéristiques physiologiques de leur environnement tissulaire dont elles sont issues. Les fibroblastes primaires sont souvent utilisés en raison de leur simple accessibilité et de leur facilité de manipulation en culture. Les myoblastes primaires ont l'avantage d'initier une différenciation myogénique qui aboutit à leur fusion et à la formation de myotubes.

Parallèlement, au cours du processus de différenciation myogénique, l'expression du gène *DMPK* sain et muté (dans le cas de la DM1) est augmentée. Ainsi plusieurs caractéristiques des muscles DM1 sont conservées dans les cellules musculaires DM1 différenciées en culture, telles que la présence d'agrégats nucléaires (Furling et al. 2001) et des défauts de maturation de certains transcrits spécifiques du muscle tels que *ATP2A1*, *DMD*, *IR* ou *RyR1* (Kimura et al. 2005; Langlois et al. 2003; Nakamori et al. 2007). Néanmoins, l'accessibilité aux biopsies musculaires de patients reste complexe. Une alternative à cette source cellulaire a été développée. Les fibroblastes primaires issus de peau sont transduits avec une construction virale exprimant le facteur myogénique MYOD (Chaouch et al. 2009). Cette trans-différenciation conduit à la formation de cellules musculaires différenciées présentant des *foci* ainsi que des anomalies d'épissage similaires à celles trouvées dans les myoblastes primaires DM1 et les muscles des patients (Savkur, Philips, et Cooper 2001; Kuyumcu-Martinez et al. 2007; Larsen et al. 2011; Ravel-Chapuis et al. 2012).

Malgré cela, la manipulation des cellules primaires présente certaines contraintes. Toutes les cellules somatiques ont une capacité de prolifération limitée et entrent en sénescence répllicative après un nombre défini de divisions. Inversement corrélé à l'âge du donneur, cet arrêt de prolifération est dû au raccourcissement des télomères qui a lieu à chaque division cellulaire (Renault et al. 2000) et qui se retrouve encore plus prononcé dans les cellules de patients DM (D. Furling, L. Coiffier, et al. 2001; Bigot et al. 2009; Thornell et al. 2009). De plus, les cellules primaires reflètent la variabilité entre les individus dont elles sont isolées. Le comportement *in vitro* sera également influencé par l'origine du muscle prélevé (distale ou proximale), l'âge du patient, sa sévérité d'atteinte et enfin la taille des répétitions (Thornell et al. 2009). Pour finir, les conditions expérimentales différentes d'un laboratoire à un autre peuvent conduire à des résultats non reproductibles. Afin de contourner la problème de sénescence répllicative précoce observé dans les cellules DM et de maintenir les cellules dans un état prolifératif, des lignées cellulaires immortalisées ont été établies à partir de fibroblastes primaires DM1, de fibroblastes trans-différenciés et de myoblastes (Larsen et al. 2011; O'Leary et al. 2010).

II.1.2.2 Cellules humaines immortalisées

Divers stimulus peuvent induire le programme de sénescence incluant une taille réduite des télomères et l'expression anormale de certaines protéines comme l'inhibiteur de cycle cellulaire p16. Contrairement aux cellules tumorales, les cellules normales ne se divisent pas indéfiniment, et ont une capacité limitée de division en culture (Hayflick et al. 1965). Cette

limite de capacité proliférative causée par l'accumulation des divisions cellulaires successives conduit à un arrêt permanent du cycle cellulaire. Au cours des divisions cellulaires, une partie de l'extrémité du chromosome est perdue en raison de l'incapacité de la machinerie conventionnelle à répliquer les extrémités des chromosomes. Cette perte d'ADN télomérique est compensée par une transcriptase inverse spécialisée appelée télomérase qui assure la synthèse *de novo* des répétitions télomériques sur les télomères préexistants, assurant ainsi leur longueur (Greider et Blackburn 1985). L'activité de la télomérase est présente dans les cellules germinales (qui ne subissent pas la sénescence) et les lignées cellulaires immortelles (qui ont échappé à la sénescence). À l'inverse, la majorité des cellules somatiques ont peu ou pas d'activité télomérase (Harley, Futcher, et Greider 1990). Il est maintenant bien établi que le raccourcissement excessif des télomères déclenche la sénescence. De plus, l'activation de la voie p16 en réponse au stress cellulaire est un mécanisme additionnel responsable de l'entrée en sénescence répliquative des myoblastes humains. Afin de contourner le processus de sénescence, la réintroduction de la sous-unité catalytique de la télomérase humaine (hTERT) dans les fibroblastes suffit à reconstituer une activité télomérase stabilisant la longueur des télomères et engageant les cellules dans le processus d'immortalisation. En ce qui concerne les myoblastes humains, il faut en plus inhiber conjointement la voie p16, par surexpression de son ligand naturel CDK4 (Zhu et al. 2007; Shiomi et al. 2011; Mamchaoui, Trollet, Bigot, Negroni, Chaouch, Wolff, Kandalla, Marie, Di Santo, J. L. St Guily, et al. 2011). Ainsi, à partir des cellules primaires de patients DM1, les lignées cellulaires immortalisées présenteront un nombre illimité de divisions sans entrer en sénescence, tout en conservant la majorité des caractéristiques spécifiques du tissu malade. Puis, afin d'obtenir des cultures cellulaires homogènes, une sélection clonale sera effectuée post-immortalisation. Ces cellules immortalisées sont d'une grande utilité puisqu'elles permettent de fournir une quantité importante de matériel pour des études sur l'instabilité, le criblage ou de développement d'approches thérapeutiques (Ketley et al. 2014; Klein et al. 2019; O'Leary et al. 2010).

II.1.2.3 Cellules souches pluripotentes (hPSCs)

La DM1 étant une pathologie multisystémique, il faut donc prendre en considération le besoin de cellules non musculaires pour l'étude des mécanismes d'une manière tissu-spécifique. Comme pour les cultures des cellules musculaires, les cellules humaines neuronales ou cardiaques, par exemple, constituent un défi majeur en raison de la disponibilité limitée des biopsies. La technologie de reprogrammation tissulaire permet aujourd'hui de générer des types

cellulaires spécifiques à partir de cellules souches pluripotentes (hPSC) offrant l'occasion d'étudier le mécanisme de la maladie d'une manière cellule-spécifique. L'innovation scientifique consiste à prélever n'importe quelle cellule chez un adulte et à la reprogrammer génétiquement pour la rendre pluripotente, c'est à dire capable de se différencier « à la demande » dans tous les types cellulaires qui composent un organisme adulte. L'utilisation de cellules souches pluripotentes porteuses de la mutation provoquant la pathologie peut permettre d'identifier de nouveaux acteurs moléculaires.

L'obtention de ces cellules repose actuellement sur deux méthodes : la dérivation des cellules souches embryonnaires (hCSE) à partir de la masse interne du blastocyste d'un embryon obtenu par fécondation *in vitro*, et la conversion par manipulation génétique de cellules somatiques en cellules souches pluripotentes (hIPS, pour *induced pluripotent stem cells*). Ces deux types cellulaires partagent les mêmes propriétés, à savoir l'immortalité, la pluripotence et expriment l'activité télomérase (Thomson et al. 1998; Yu et al. 2007; Takahashi et al. 2007). Cependant, la recherche sur les cellules hCSE est très controversée et se heurte à des questions éthiques. Pour éviter leur utilisation, une technique basée sur la découverte que les noyaux des cellules somatiques sont reprogrammables vers un état embryonnaire est apparue. Ainsi, suite à l'identification des techniques de reprogrammation génique, plusieurs équipes ont tenté de reproduire les mécanismes de pathologies monogéniques à l'aide de lignées hIPS (Park et al. 2008; Han, Williams, et Eggan 2011). Néanmoins, dans le domaine de la DM1, l'utilisation de cellules neurales issue des cellules hCSE a permis de montrer l'altération de la voie mTOR ou de révéler un défaut de formation de neurites et de la synapse (Denis et al. 2013; Marteyn et al. 2011). La reprogrammation des cellules somatiques à partir de fibroblastes humains a été utilisée pour générer des cardiomyocytes, des neurones et des myocytes couramment affectés dans la DM1, facilitant les études sur l'instabilité des répétitions ou l'évaluation d'approches thérapeutiques (Gao et al. 2016; Dastidar et al. 2018, 2022). Ainsi, les IPS peuvent être créées à partir de multiples sources cellulaires en utilisant des procédures invasives minimales. Outre les fibroblastes issus de biopsie de peau, les IPS peuvent être générées à partir de cellules épithéliales rénales présentes dans l'urine (Zhou et al. 2012) ou directement à partir de prélèvements sanguins (Martineau et al. 2018).

Au cours de ces dernières années, les progrès technologiques obtenus en culture et différenciation des cellules hIPS présentent l'avantage d'un approvisionnement presque sans limite. Cependant la maturation de ces cellules peut varier, et ne présente pas l'intégralité du phénotype de cellules matures tel que retrouvé dans les modèles *in vivo*. Cette technologie reste

cependant une opportunité d'étudier des types cellulaires pathologiques tels que les cellules neuronales ou cardiomyocytes pour lesquelles il n'existe pas encore de modèles cellulaires ou animaux.

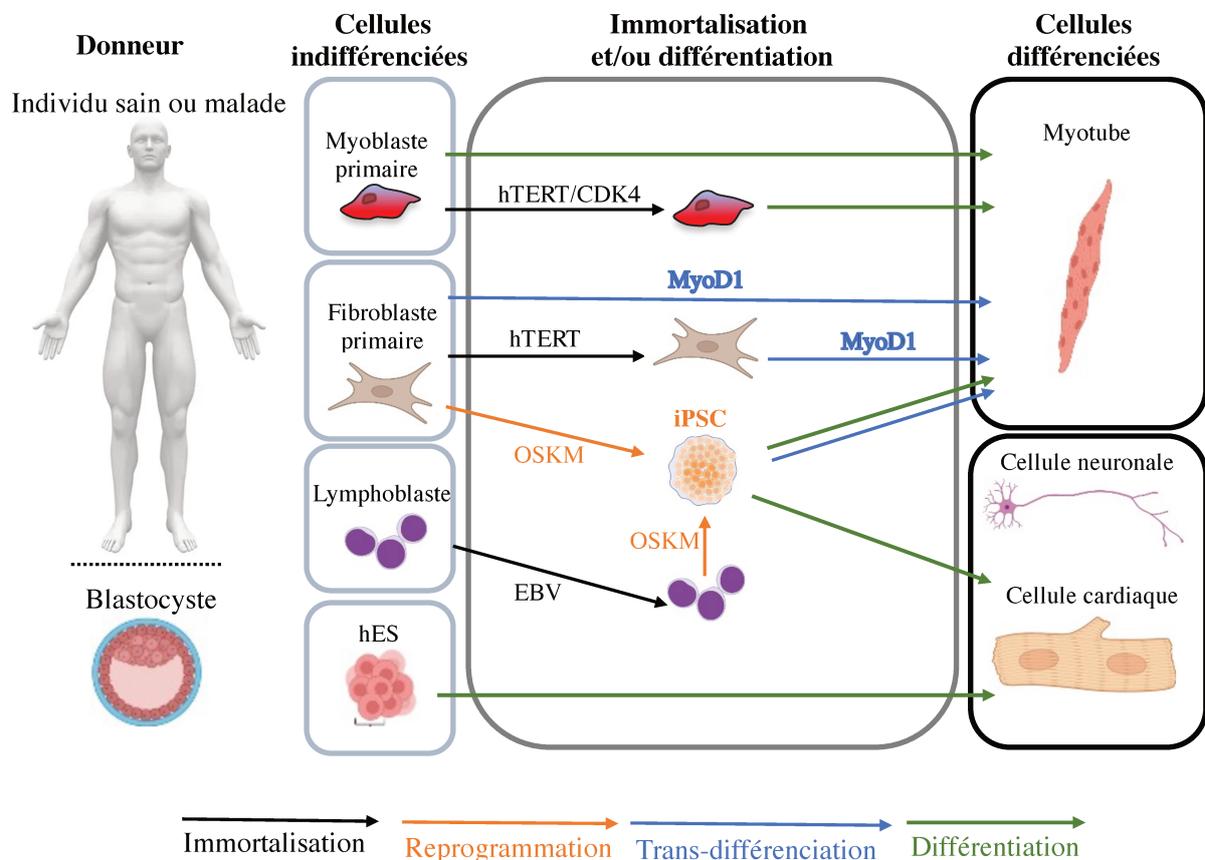


Figure 11 : Modèles de cellules dérivées à partir de patient DM1 ou d'individu sain (d'après Matloka et al. 2018)

II.2 Modèles animaux

Plusieurs années après la description de la mutation, des organismes simples (invertébrés) comme les mouches (*Drosophila melanogaster*), les vers (*Caenorhabditis elegans*) ou le poisson zèbre (*Danio rerio*) ont été utilisés pour créer des modèles de la DM1. Bien qu'éloignés de l'homme, ils récapitulent plusieurs caractéristiques de la DM. L'expression d'ARN CUG chez *D. melanogaster* entraîne la formation d'agrégats nucléaires d'ARN, ainsi que des défauts d'épissage liés à la séquestration des protéines MBNL1. Ces mouches développent des défauts histopathologiques tels que la réduction de taille des fibres musculaires, des défauts de maturation de la rétine et de l'hypercontraction (Garcia-Lopez et al. 2008; Picchio et al. 2013). Des *foci* d'ARN toxiques et des défauts morphologiques ont également été retrouvés chez le

poisson zèbre et dans le modèle *C. elegans* (Chen et al. 2007; Wang et al. 2011; Todd et al. 2014). Même si ces invertébrés semblent conserver le mécanisme central de toxicité via l'expression d'ARN muté, ces organismes simples diffèrent de l'Homme. Afin d'étudier les mécanismes pathologiques de la DM dans un contexte plus proche de l'humain, les modèles murins ont été générés et ont validé ou invalidé les hypothèses sur les mécanismes pathologiques telles que l'haploinsuffisance de *DMPK* ou le gain de fonction toxique de l'ARN muté (**Tableau 2**). Parmi tous ces modèles, les souris HSA^{LR}, DMSXL ou encore déficientes pour MBNL sont les modèles murins les plus utilisés puisque plus proches des symptômes observés chez l'homme et seront détaillés ci-après. Ces modèles ont permis de confirmer l'implication de l'expression des répétitions CUG combinée à la séquestration et/ou perte de fonction de MBNL1, montrant ainsi leur implication dans la maladie (**Figure 12**).

II.2.1 HSA^{LR} : Expression des CTG dans le gène de l'actine squelettique humaine

Les souris HSA^{LR} (longues répétitions) expriment entre 220-250 répétitions CTG dans le 3'UTR du gène de l'alpha actine squelettique humaine (*ACTA1* anciennement appelé *HSA*), dans une position similaire aux expansions CTG dans le gène *DMPK*. Bien que les répétitions CTG soient situées dans un gène autre que *DMPK* avec une taille réduite à 250 triplets, les souris HSA^{LR} présentent des agrégats nucléaires d'ARN avec une colocalisation de MBNL, une histopathologie musculaire anormale avec des noyaux centralisés, une taille aberrante des fibres (Mankodi et al. 2000) et de forts défauts d'épissage (Lin et al. 2006). Cependant, ce modèle ne récapitule pas toutes les caractéristiques musculaires de la DM telles que la faiblesse ou la fonte musculaire (Mankodi et al. 2000). Pourtant, il reste très important dans la compréhension des mécanismes pathologiques puisqu'il confirme le rôle de l'expression des répétitions dans l'apparition des symptômes et ainsi valide le gain de fonction toxique des ARNm. Même si l'expression des répétitions se limite au muscle squelettique, les HSA^{LR} constituent un modèle largement utilisé pour étudier la pathologie musculaire, et dans l'évaluation d'approches thérapeutiques (Batra et al. 2017; Klein et al. 2019; Mulders et al. 2009; Warf et al. 2009)

II.2.2 DMSXL : Expression des CTG dans le gène humain *DMPK*

La souris DMSXL a été générée par l'insertion d'un fragment de 45 kb de séquence génomique humaine comprenant le gène *DMPK* muté ainsi que les gènes avoisinants *SIX5* et *DMWD*. Le modèle initialement créé présentait 300 répétitions CTG dans le 3'UTR de *DMPK* (Seznec et

al. 2001). Le mécanisme d'instabilité intergénérationnelle associé à ces expansions CTG a provoqué une augmentation de la taille de la mutation au cours du temps pour atteindre plus de 1 500 répétitions (Gomes-Pereira et al. 2007). Le transgène, sous contrôle de son propre promoteur humain, a une expression ubiquitaire, similaire à celle du gène murin, et induit la formation de *foci* colocalisant avec les protéines de la famille MBNL dans les tissus musculaires squelettiques et cardiaques (Huguet et al. 2012; Michel et al. 2015), dans les tissus lisses (estomac, intestin) ainsi que dans le système nerveux central (cortex frontal). Au niveau physiologique, les souris DMSXL hétérozygotes ne se distinguent pas des souris sauvages mais les souris homozygotes présentent un phénotype sévère avec un retard de croissance, une atrophie musculaire et des déficiences neurologiques (Fernandez-Costa et al. 2013; Gomes-Pereira et al. 2007; Vignaud et al. 2010). Le niveau d'expression du transgène humain dans les muscles squelettiques et cardiaques des souris DMSXL adultes est faible par rapport à celui du gène *Dmpk* murin corrélant ainsi avec les défauts moléculaires peu marqués (Huguet et al. 2012). En revanche il plus est élevé dans le cerveau avec des défauts d'épissage plus prononcés (Gomes-Pereira et al. 2007; Hernández-Hernández et al. 2013). Les souris DMSXL récapitulent l'expression ubiquitaire du transcrit humain muté comme observée dans la pathologie, permettant ainsi d'étudier les défauts systémiques de la DM1.

II.2.3 Modèles de souris déficientes pour *Mbnl* : KO *Mbnl1* et KO *Mbnl1/2*

Plusieurs modèles de souris invalidées pour les protéines *Mbnl* ont été créés afin de répondre à l'hypothèse de la perte de fonction du facteur d'épissage dans la DM. La première souris transgénique déplétée de manière ubiquitaire a été générée par délétion du linker (exon 3) du gène *Mbnl1* (*Mbnl1^{Δ3/Δ3}*) (Kanadia et al. 2003). La perte de cet exon induirait l'élimination de toutes les isoformes capables de se lier aux répétitions CUG, reproduisant ainsi la perte de fonction induite par la séquestration de MBNL1 dans la DM (Miller 2000). Au niveau physiologique, ces souris présentent de nombreuses altérations caractéristiques des patients telles que la myotonie et la présence de fibres musculaires avec absence de canal CLCN1 membranaire, la présence de noyaux centralisés et une cataracte similaire à celle observée chez les patients DM1 (Rahul N Kanadia et al. 2003). Cependant, ni l'atrophie ni la faiblesse musculaire ne sont reproduites dans ce modèle. Les souris *Mbnl1^{Δ3/Δ3}* présentent également de robustes défauts d'épissage principalement dans le cœur et les muscles tels que *Tnnt2* et *Clcn1* et plus faiblement dans le cerveau (Kanadia et al. 2003; Lin et al. 2006; Suenaga et al. 2012; Tanner, Tang, et Thornton 2021). Le modèle *Mbnl1^{+/Δ3}* ne présente pas de défaut d'épissage

dans les muscles squelettiques et cardiaques suggérant qu'une perte de moitié de la quantité de protéines MBNL1 n'est pas suffisante pour induire des défauts moléculaires comme l'altération de l'épissage alternatif (Kanadia et al. 2003). Cette étude a notamment permis d'identifier MBNL1 comme un régulateur de l'épissage alternatif et que la perte de fonction de MBNL1 serait à l'origine d'au moins 80% des défauts observés dans la souris HSA^{LR} (Lin et al. 2006) incluant l'altération de l'épissage alternatif de CLCN1 causant la myotonie (Charlet-B. et al. 2002; Mankodi et al. 2002). La seconde souris développée est le double KO pour les gènes *Mbnl1* et *Mbnl2* qui est le modèle plus représentatif des symptômes observés dans la DM1. Ce double KO a été généré par combinaison de la déplétion de *Mbnl1* par excision de l'exon 3 (Kanadia et al. 2003) à celle de l'exon 2 comprenant le codon start ATG de *Mbnl2* (Charizanis et al. 2012). La perte conjointe de *Mbnl1* et *Mbnl2* induit des défauts musculaires plus sévères que ceux observés dans la souris KO-*Mbnl1* (K. Lee et al. 2013). Ces souris présentent des défauts de conduction cardiaque, une mortalité précoce et développent un phénotype sévère avec une atrophie et une faiblesse musculaire et des altérations plus fortes de l'épissage alternatif qu'observé dans le simple KO *Mbnl1*. De plus, la déplétion de *Mbnl2* dans le cerveau conduit à des épissages aberrants de nombreux ARNm cibles (Goodwin et al. 2015). Comme vu précédemment, *Mbnl2* est très peu exprimé dans le muscle squelettique et majoritairement dans le cerveau. Ce modèle murin démontre pour la première fois le phénomène de compensation de la perte de *Mbnl1* par la surexpression de *Mbnl2*, remettant en cause le rôle unique de MBNL1 dans le développement de la maladie, et souligne l'importance de MBNL2 dans le cerveau (Charizanis et al. 2012).

Ainsi, les observations réalisées sur le modèle HSA^{LR} et KO pour les protéines MBNL montrent des similitudes robustes, suggérant que la perte de fonction des protéines MBNL est le mécanisme prédominant dans la pathogenèse de la maladie.

Modèles souris de surexpression et Knock-Out (KO)					
Modèle transgénique	Principe	Altérations	Limites	Contribution	Références
KO Dmpk	Haploinsuffisance de DMPK dans la DM1	Problème d'homéostasie du calcium chez les souris âgées	Peu symptômes, contradictions entre les études	La perte de fonction de DMPK n'explique pas l'haploinsuffisance	Reddy et al., 1996 Carrell et al., 2016
KO Six5	Haploinsuffisance de Six5 dans la DM1	Cataractes, fertilité réduite chez les mâles, défauts cardiaques	Cataracte différente entre souris et le patient	La perte de fonction de SIX5 n'explique pas l'apparition des cataractes chez les patients DM1	Klesert et al., 2000 Sarkar et al., 2000 Wakimoto et al., 2002 Sarkar et al., 2004
tKO hétérozygote Dmpk/Six5/Mbn1	Haploinsuffisance de Dmpk, Six5 et Dmwd et réduction de Mbn1 dans la DM1	Mortalité précoce, atrophie et faiblesse musculaire, myotonie, défauts histologiques	On ne connaît pas la part de la perte de Mbn1 dans le développement du phénotype	L'haploinsuffisance de DMPK, SIX5 et DMWD peut jouer un rôle dans le développement de la DM1	Yin et al., 2019
qKO hétérozygote Dmpk/Six5/Mbn1/Dmwd		Mortalité précoce plus élevée, déformation cardiaque, myopathie du diaphragme, quelques noyaux centraux, tâches oculaires, jonctions neuromusculaires immatures			
KO Mbn1	Perte de fonction de Mbn1	Myotonie, épissage perturbé, cataracte comparable aux patients, myopathie musculaire et cardiaque, position anormale des noyaux dans la fibre	Pas de faiblesse musculaire, pas d'augmentation de CELF1	La perte de fonction de MBNL1 est un processus central dans le développement de la DM	Kanadia et al., 2003 Lee et al., 2013
Altération de MBNL2	Mutation dans l'intron 2 par piégeage de gène	Myotonie, lardose, diminution de l'aire des fibres musculaires, noyaux centralisés, fibrose	Pas d'étude du SNC, résultats incohérents avec d'autres modèles	Rôle indépendant de MBNL2 dans la DM1	Hao et al., 2008
	Mutation dans l'intron 4 par piégeage de gène	Aucune altération du muscle squelettique	Résultats incohérents avec d'autres modèles	Pas de rôle indépendant de MBNL2 dans le muscle squelettique	Lin et al., 2006
KO Mbn2	Perte de fonction de Mbn2	Épissage d'ARN altérés dans le cerveau, défauts d'apprentissage et troubles du sommeil	Expression limitée au cerveau, Pas d'altération musculaire	La perte de fonction de MBNL2 est un processus central dans le développement des altérations du CNS dans la DM	Charizanis et al., 2012
KO Mbn3	Perte de fonction de Mbn3	Régénération musculaire altérée chez les souris âgées	Peu de défauts, MBNL3 est très peu exprimé chez l'adulte	La perte de fonction de MBNL3 pourrait participer au phénotype musculaire de la DM1	Reddy et al., 1996 Carrell et al., 2016
dKO Mbn1/Mbn2 hétérozygote	Perte de fonction constitutive de Mbn1 et réduction de Mbn2	Retard de croissance, Myotonie, faiblesse et atrophie musculaires, épissage fortement altéré, noyaux centraux, bloc cardiaque, Jonction neuromusculaire affectée	Forte mortalité, Perte de fonction de Mbn2 n'est pas totale car létale au stade embryonnaire	La perte de fonction de MBNL1 et MBNL2 complète les défauts limités à MBNL1 reproduisant des défauts proches de la forme congénitale	Lee et al., 2013
dKO Mbn1/Mbn2 Myo-Cre	Perte de fonction constitutive de Mbn1 et spécifique au muscle de Mbn2	Cyphose, Myotonie, forte faiblesse et atrophie musculaires, épissage fortement altéré, noyaux exclusivement centraux	Forte mortalité, phénotypes limités au muscle squelettique	MBNL2 peut compenser la perte de fonction de MBNL1 dans le muscle squelettique et le cerveau	Lee et al., 2013 Chou et al., 2017
dKO Mbn1/Mbn2 hétérozygote	Perte de fonction constitutive de Mbn1 et réduction de Mbn2	Non décrit, le modèle a été utilisé uniquement au niveau transcriptomique	Perte de fonction de Mbn2 n'est pas totale car létale au stade embryonnaire	Les altérations d'épissage dues à la perte de MBNL1 et MBNL2 expliquent la majorité des défauts d'épissage des souris avec CUGexp	Tanner et al., 2021
dKO Mbn1/Mbn2 Nestine-Cre	Perte de fonction constitutive de Mbn1 et spécifique au SNC de Mbn2	Mortalité précoce, épissage fortement altéré dans le cerveau, défauts moteurs sévères par "grip test"	Haute mortalité précoce, phénotypes limités au cerveau	La perte de fonction de MBNL1 et MBNL2 aggrave celle limitée à MBNL2 quant à l'épissage alternatif dans le cerveau	Goodwin et al., 2015
dKO Mbn1/Mbn2 Myh6-Cre	Perte de fonction constitutive de Mbn1 et spécifique au cœur de Mbn2	Mortalité précoce, hypertrophie cardiaque, fibrose, tachyarythmies, défauts cardiaques, défauts de conduction cardiaque	Peu de défauts par rapport aux souris KO Mbn1, phénotypes limités au cœur	La perte de fonction de MBNL1 et MBNL2 dans le cœur aggrave celle limitée à MBNL1 MBNL2 peut compenser la perte de fonction de MBNL1 dans le cœur	Lee et al., 2022
tKO Mbn1/Mbn2/Mbn3 Myog-Cre	Perte de fonction constitutive de Mbn1 et spécifique au muscle de Mbn2 et Mbn3	Retard de croissance post-natal, faiblesse et atrophie musculaire, défauts histologiques, problèmes respiratoires, épissage altéré	Haute mortalité, phénotypes limités au muscle squelettique	Modèle très proche de la forme congénitale	Thomas et al., 2017
Surexpression de CELF1	Surexpression de CELF1 dans le muscle squelettique ou le cœur	Myopathie musculaire et cardiaque, défauts de conduction cardiaque, épissage altéré pour les cibles de CELF1	Mortalité précoce, reproduit une minorité de symptômes, applications thérapeutiques limitées	L'hyperactivation de CELF1 est un processus important dans le développement de la DM1	Timchenko et al., 2004 Ward et al., 2010 Koshelev et al., 2010

Modèles de souris avec expression de CTG pathogéniques					
Modèle transgénique	Principe	Altérations	Limites	Contribution	Références
Dmt	Premier modèle transgénique de la DM1. Transgène avec environ 162-750 pdb de répétitions CTG à côté de la partie 3'UTR de Dmpk.	Contractions et expansions des répétitions (-7 à +7), influence du parent porteur de la mutation, instabilité somatique au cours du temps (-20 à +540 dans le rein)	Pas de séquence promotrice donc pas d'expression des répétitions. Application exclusivement à l'instabilité	A démontré l'instabilité somatique et intergénérationnelle	Monckton et al., 1997 Fortune et al., 2000
HSA ^{LR}	Transgène avec 250 répétitions CTG dans le 3'UTR de l'actine squelettique humaine (HSA)	Foci ARN qui séquestrent Mbn1, épissage altéré, myotonie, myopathie, fibres avec noyaux mal localisé	Expression uniquement muscle squelettique au stade post-développemental et très élevée par rapport au gène Dmpk. Pas de faiblesse ou d'atrophie musculaire.	Valide le gain de fonction toxique de l'ARN de la DM1. Très utilisé pour validation d'approches thérapeutiques	Mankodi et al., 2000
DM300	Transgène du locus DMPK avec environ 300 répétitions CTG dans le 3'UTR	Instabilité somatique et intergénérationnelle. Myotonie, myopathie, défauts d'épissage de la protéine Tau	Phénotype léger, expression variable du transgène	Etude du gain de fonction toxique des répétitions CTG dans le contexte génétique humain	Seznec et al., 2000 Seznec et al., 2001
DMSXL	Lignée transgénique dérivée du modèle DM300. Exprime plus de 1000 répétitions	Epissage altéré dans le cerveau et le muscle squelettique des souris homozygotes, myotonie, myopathie, faiblesse et atrophie musculaire, agrégation de la protéine Tau dans le cerveau, jonction neuromusculaire atteinte	Dérivée d'un unique individu, faible expression du transgène, les hétérozygotes ne présentent pas de phénotype grave, l'épissage est moins altéré que dans d'autres modèles	Etude du gain de fonction toxique des répétitions CTG dans le contexte génétique humain	Gomes-Pereira et al., 2007 Huguet et al., 2012
EpA960	Surexpression tissu-spécifique de d'un transgène avec 960 répétitions CTG dans l'exon 15 de DMPK	Myotonie, myopathie, fonte musculaire, défauts de conduction cardiaque, séquestration de Mbn1 et hyperactivation de Celf1, épissage altéré	Répétitions interrompues, mortalité précoce et modèle spécifique au cœur	960 répétitions CTG mènent aux symptômes majeurs de la DM. Suggère que l'hyperactivation de CELF1 est dépendante du contexte génomique	Wang et al., 2007 Orengo et al., 2008
TRE-EGFP-CTG5 et CTG200	Lignée transgénique avec une expression inductible d'un transcrit portant 5-200 répétitions CTG	Myotonie, myopathie, défauts de conduction cardiaque, épissage altéré	Pas de foci ni de faiblesse musculaire. Mortalité précoce des souris CTG5 avec des phénotypes DM	L'induction à la doxycycline cause l'apparition de la myotonie et des défauts cardiaques, qui sont réversibles	Mahadevan et al., 2006
EpA960/CaMKII-Cre	Surexpression dans le cerveau post-développemental d'un transgène avec 960 répétitions CTG	Foci, épissage altéré, atrophie cervicale, difficulté d'apprentissage, neurodégénération, défauts axonaux et dendritiques après perte de Mbn1	Répétitions interrompues	Modèle DM1 spécifique au cerveau	Wang et al., 2017

Tableau 2 : Modèles de souris dans la DM1

Modèle	KO <i>Mbn1</i> et KO <i>Mbn1</i> 1/2	DMSXL	HSA ^{LR}
Principe	Invalidé pour MBNL1	1000 CTG dans le gène DMPK	250 CTG dans le gène <i>ACTA1</i>
Altérations	Foci d'ARN	non	oui
	Séquestration MBNL1	non	oui
	Défauts d'épissage	oui	non
	Myotonie	oui	non
Limites	Absence de faiblesse musculaire	Expression et défauts d'épissages faible dans le muscle	Expression uniquement muscle squelettique Pas de faiblesse ou d'atrophie musculaire.

Figure 12 : Résumé des principaux modèles murins utilisés dans la DM1 présentant des altérations et leurs limites d'utilisation

Conclusion sur les modèles dans la DM1

La Dystrophie myotonique de type 1 est une pathologie multisystémique affectant différemment tous les tissus. Afin de comprendre les différents mécanismes impliqués dans la maladie, des modèles cellulaires et animaux ont été développés. Les cultures cellulaires *in vitro* issues de patients constituent une ressource unique et précieuse car elles présentent les expansions CTG dans leur contexte naturel et récapitulent les défauts moléculaires de la maladie. Cependant, la difficulté d'obtenir des biopsies de patients, associée au phénomène de sénescence répllicative observé en culture rend leur utilisation limitée. Les techniques d'immortalisation tissulaire et de reprogrammation tissulaire ont permis de contourner ces problématiques majeures. La caractérisation des cellules immortalisées a permis de montrer que ces cellules présentent les mêmes défauts que les cellules primaires dont elles sont issues. De plus, la reprogrammation tissulaire offre l'accessibilité aux cellules reprogrammées telles que des cardiomyocytes ou des neurones de patients à partir de fibroblaste primaires (**Figure 11**). Cependant la maturation de ces cellules peut varier, et ne présente pas l'intégralité du phénotype des cellules matures tel que retrouvé dans les modèles *in vivo*. La création et l'utilisation de modèle murins a permis de réfuter ou d'appuyer les hypothèses avancées pouvant expliquer la pathologie telle que l'haplo-insuffisance de *DMPK*, ou le gain de fonction toxique de l'ARN mutant *DMPK*. Ainsi, des modèles de souris invalidées pour les gènes *Six5*, *Dmpk* et *Dmwd* ne récapitulent pas à eux seuls tous les phénotypes observés dans la DM1. Les souris exprimant les répétitions toxiques dans le gène *DMPK*, les souris HSA^{LR}, DMSXL et les modèles déplétés pour les protéines MBNL ont permis de confirmer l'implication de l'expression des répétitions CUG combinée à la séquestration/perte de fonction de MBNL1, montrant ainsi leur implication dans la maladie (**Figure 12**)

Au regard des modèles présents et utilisés dans la DM1, le modèle parfait récapitulant tous les signes cliniques du patient n'existe pas encore. Néanmoins, ces différents modèles restent de bons outils pour analyser et comprendre les mécanismes impliqués dans la maladie, permettant le développement d'approches thérapeutiques.

III. La famille de protéines MBNL

Les protéines de la famille Muscleblind-like (MBNL) ont été initialement identifiées chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*) comme des protéines nécessaires à la différenciation musculaire et des photorécepteurs de l'œil (Bassez et al. 1997). Leur expression est limitée aux métazoaires puisqu'elles n'ont été retrouvées ni dans les bactéries, ni dans les champignons, ni dans les plantes (Pascual et al. 2006). Alors que les invertébrés ne présentent qu'un seul gène muscleblind (*Mbl*), les vertébrés possèdent trois paralogues hautement conservés : *MBNL1*, *MBNL2* et *MBNL3*. Bien que très similaires au niveau génomique, ces paralogues ont une expression tissu-spécifique et ont acquis des fonctions distinctes.

III.1 Les protéines MBNL chez les mammifères

Chez les mammifères, les gènes *MBNL1*, *MBNL2*, *MBNL3* sont situés sur les chromosomes 3, 13 et X respectivement. Localisés sur des chromosomes différents, ils présentent cependant des organisations génomiques similaires au regard de la composition, du nombre et de la taille des exons (Fardaei 2002). Ainsi, *MBNL1* est constitué de 10 exons, *MBNL2* de 8 exons et *MBNL3* de 11 exons (Pascual et al. 2006). Les séquences nucléotidiques entre les paralogues sont très conservées, *MBNL1* et *MBNL2* étant les deux paralogues les plus proches. Soumis à l'épissages alternatif, tous ces paralogues donnent lieu à plusieurs isoformes d'ARN de *MBNL* (Pascual et al. 2006), produisant différentes isoformes protéiques (**Figure 13**). Malgré leur similitude structurelle, *MBNL1*, *MBNL2* et *MBNL3* présentent cependant des différences dans leur patron d'expression, leur capacité de liaison aux ARN et leur activité (Kino et al. 2015; Poulos et al. 2013; Terenzi et Ladd 2010; Tran et al. 2011).

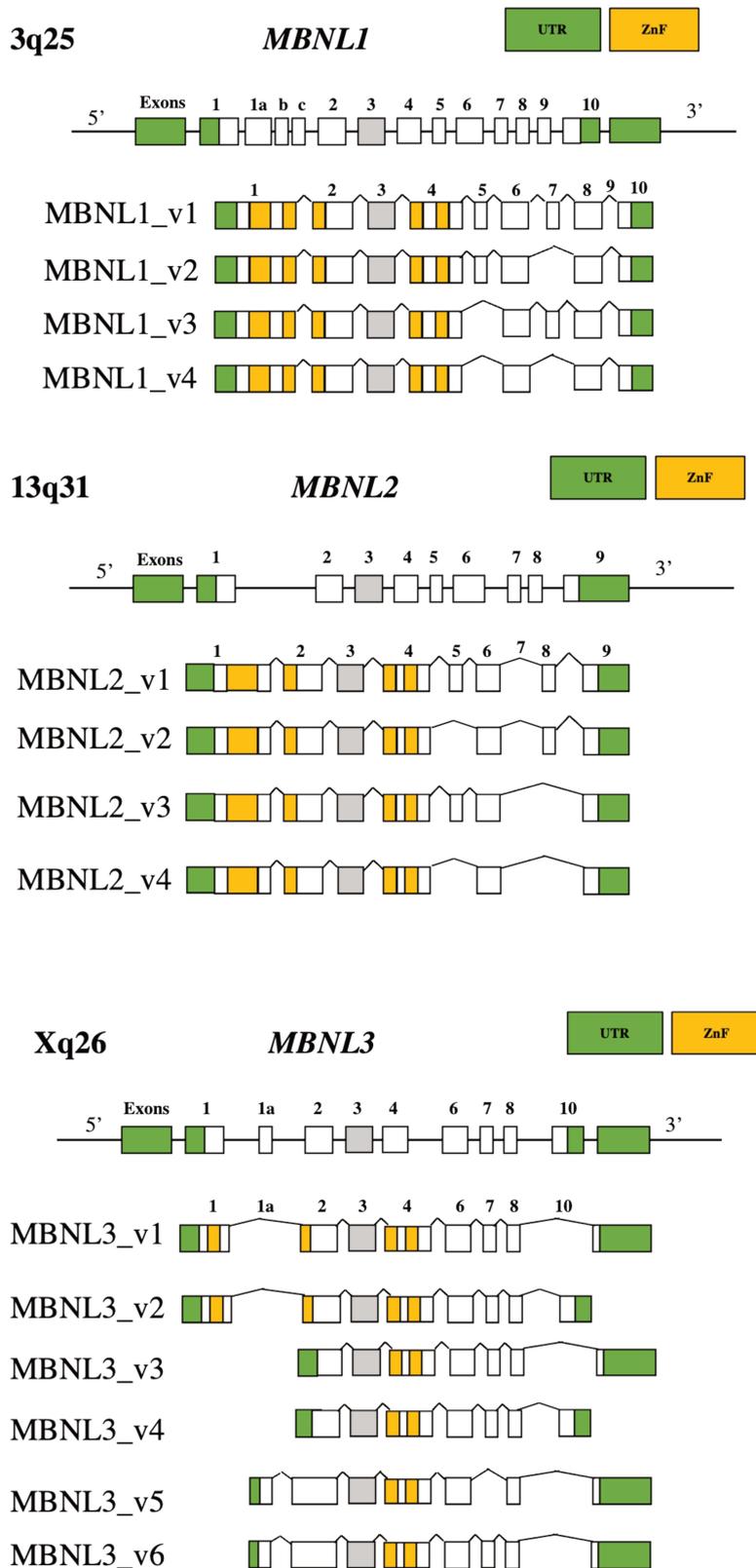


Figure 13 : Composition génomique des paralogues *MBNL1*, *MBNL2* et *MBNL3*

Représentation schématique des gènes *MBNL1*, *MBNL2*, *MBNL3*. Localisés sur les chromosomes 3, 13 et X, chaque paralogue contient plusieurs exons soumis à l'épissage alternatif produisant différentes isoformes pour chaque gène (d'après Pascual et al., 2006)

Ces trois paralogues sont exprimés de façon ubiquitaire. *MBNL1* est la forme la plus exprimée dans l'ensemble des tissus, suggérant un rôle prépondérant par rapport aux autres paralogues. *MBNL1* est surtout exprimé dans le muscle squelettique, cardiaque ainsi que dans les muscles lisses. Il est également exprimé dans le cerveau, mais *MBNL2* y est majoritaire alors que *MBNL3* est très faiblement présent (Fardaei et al. 2002; Kanadia et al. 2003). Inversement, *MBNL3* est fortement exprimé dans le placenta, le foie et la rate et peu abondant dans les muscles (Konieczny et al. 2014a) (**Figure 14**)

Dans les cellules musculaires humaines, seuls *MBNL1* et *MBNL2* sont exprimés (Fardaei et al. 2002; Holt et al. 2009). *MBNL3* est exprimé au stade développemental et est impliqué dans la régénération et la différenciation des myoblastes murins. En effet, *MBNL3* est un régulateur négatif de la protéine *myoblast determination protein 1* (MyoD) et inhibe la différenciation des cellules musculaires. La souris invalidée pour *Mbnl3* montre un retard de régénération à un âge tardif (Poulos et al. 2013). Les modèles de souris invalidées indépendamment pour *Mbnl1* ou *Mbnl2* montrent une augmentation de MBNL1 ou MBNL2 respectivement dans le muscle squelettique et cardiaque ainsi que le cerveau (K. Y. Lee et al. 2013; Lee et al. 2022; Sta Maria et al. 2021) suggérant un phénomène de compensation mutuel en réponse à la perte de fonction d'une des protéines. Ce phénomène compensatoire important pourrait s'expliquer par la similitude fonctionnelle de MBNL1 et MBNL2 et la perte conjointe des 2 paralogues est létale au stade embryonnaire.

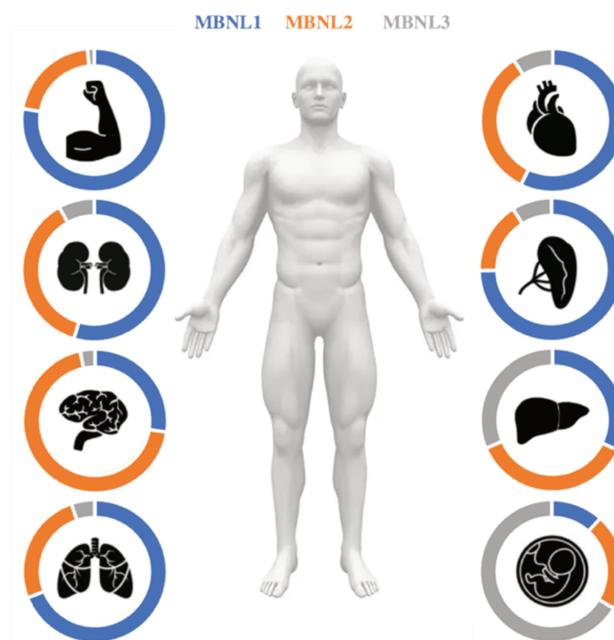


Figure 14 : Niveaux relatifs d'expression des ARNm des gènes *MBNL1*, *MBNL2* et *MBNL3* dans différents tissus. Chaque couleur représente la proportion du gène dans le tissu cible.

III.1.1 Relation structure / fonction de MBNL

Dans la DM1, de par leur forte affinité pour les CUG, la disponibilité des protéines MBNL est perturbée par la présence de transcrits *DMPK* mutés dans le noyau. Leur perte de fonction joue un rôle clé dans les mécanismes moléculaires de la maladie. Elle se traduit, entre autres, par une dérégulation de l'épissage alternatif. Afin de mieux comprendre le rôle central la perte de fonction de MBNL, plusieurs études ont permis de caractériser la structure et la fonction des MBNL. Ainsi, *MBNL1* a pu être « découpé » en deux grandes régions. Une partie N-terminale, débutant de l'exon 1 à 4, et une partie C-terminale se poursuivant de l'exon 5 à l'exon 10 (Figure 15).

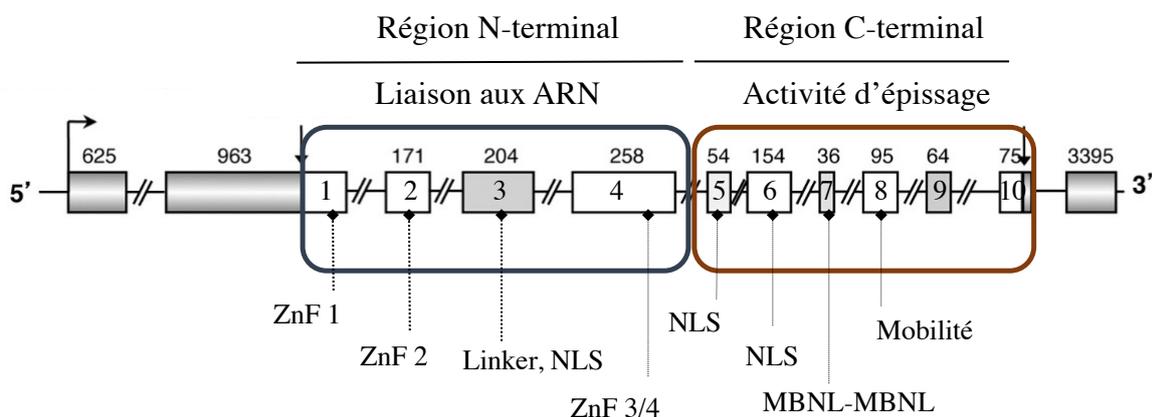


Figure 15 : Représentation schématique des deux régions de *MBNL1* ainsi que les fonctions des différents exons. Les carrés représentent les différents exons (en-dessous) et leur taille (au-dessus, en nucléotides). Numérotation 1 à 10 : exon 1 à 10, ZnF : doigt de zinc, NLS : signal de localisation nucléaire (Adapté de Tran et al., 2011 et Sznajder et al., 2019)

III.1.1.1 Propriété de liaison à l'ARN du domaine N-terminal (exon 1 à exon 4)

Bien que l'expression des paralogues soit dépendante du tissu cible, l'organisation génomique des trois *MBNL* est très similaire, notamment la région codant de l'exon 1 à l'exon 4. Ce domaine est particulier puisqu'il est composé de motifs de liaisons à l'ARN. Cette présence indique que cette partie est essentielle pour ses propriétés de reconnaissance des ARN cibles et de liaison.

III.1.1.1.1 Domaine en Doigt de Zinc (ZnF)

La DM1 est induite par la séquestration des protéines MBNL par les ARN toxiques dans les noyaux et ce, quels que soient les tissus. Cette spécificité souligne donc une région très conservée entre paralogues. La partie N-terminale comporte deux domaines en doigts de zinc (ZnF) qui lui confèrent la capacité de se lier à l'ARN. Les doigts de zinc sont référés comme ZnF1, ZnF2, ZnF3, et ZnF4, et sont arrangés en deux paires : ZnF (1/2) et ZnF (3/4). Chacun des doigts de zinc reconnaît un motif de séquence YGCY simple brin (où Y représente soit C, soit U) (**Figure 16**). Ainsi chaque molécule de MBNL1 a la capacité de reconnaître quatre motifs UGC au total. Ces motifs ARN YGCY sont retrouvés dans les ARN cibles régulés par MBNL ainsi que dans les ARN mutés CUG (Miller 2000; Yuan et al. 2007; Goers et al. 2010)



Motif de liaison de MBNL1 à l'ARN

Figure 16 : Structure d'interaction de MBNL1 avec l'ARN et son motif

Motif de séquence d'ARN prédit pour être reconnu par MBNL1. La taille des nucléotides est représentative de leur fréquence. Le motif reconnu est YGCY (ou Y est soit C ou U)

La première paire de doigt de zinc (ZnF1/2) est située sur les exons 1 et 2, alors que la seconde paire (ZnF3/4) est sur l'exon 4. Ces deux paires de doigts de zinc se situent de part et d'autre de l'exon 3. Chaque motif ZnF comprend trois cystéines suivies d'une histidine (CCCH). La superposition de séquences des 2 paires de ZnF montre une similarité de séquence élevée ainsi qu'une ressemblance structurale caractérisée par un espacement identique entre les résidus de cystéine et d'histidine dans ZnF1 et ZnF3 (CX₇CX₆CX₃H, où X est n'importe quel acide aminé), et ZnF2 et ZnF4 (CX₇CX₄CX₃H) (Fardaei et al. 2002) (**Figure 17**). Au regard du degré élevé de similitude, et de la séparation due à la présence de l'exon 3, il a été proposé que les deux domaines de liaison ZnF ont des propriétés de liaison et de fonctionnement identiques. Cependant des analyses de mutagènes réalisées sur les quatre doigts de zinc ont révélé que les paires ne fonctionnent pas de façon équivalente et peuvent réguler l'épissage de manières différentes (Purcell et al. 2012). La protéine MBNL1 composée d'une seule paire de doigt de zinc fonctionnelle ZnF1/2, conserve une affinité de liaison élevée aux ARN cibles avec environ 80% de l'activité d'épissage normale. La protéine MBNL1 composée seulement de la deuxième paire ZnF3/4 présente une liaison aux transcrits cibles réduites, avec seulement la moitié de son

activité d'épissage (Purcell et al., 2012). Cette baisse d'interaction fait suite à la suppression du premier domaine de liaison de MBNL, diminuant considérablement l'interaction de MBNL1 avec l'ARN toxique dans les cellules DM1 *in vitro* (Kino 2004; Rehman et al. 2014). Une récente étude a confirmé que les deux paires de doigts de zinc agissent indépendamment avec des spécificités de liaison à l'ARN différentes : la paire ZnF1/2 reconnaît spécifiquement les motifs de liaison MBNL contrôlant la régulation de l'épissage alternatif, alors que la paire ZnF3/4 sert de domaine de liaison plus général permettant la reconnaissance d'un large éventail de cibles (Hale et al. 2018). De plus, une région flanquant la paire ZnF 1/2 a été identifiée comme contribuant à la localisation nucléaire des protéines (Kino et al. 2015).

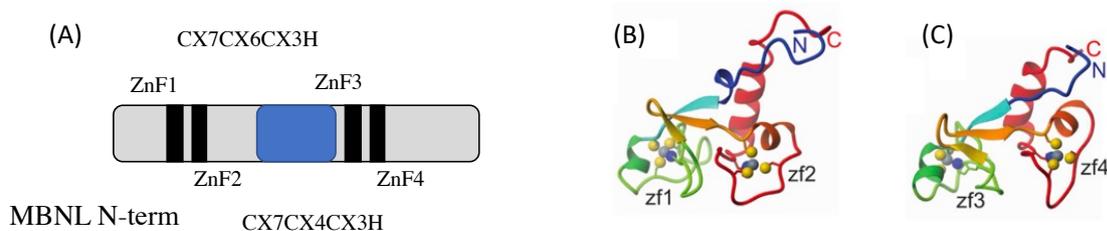


Figure 17 : Architecture des domaines doigt de zinc (ZnF) des protéines MBNL

(A) Représentation schématique de la partie N-terminale de MBNL avec les quatre domaines en doigts de zinc indiquant l'espace entre les cystéines (C) et les histidines (H), X représente n'importe quel acide aminé. Le carré bleu représente l'exon 3. (B) Structure de la paire de ZnF 1/2 et (C) ZnF 3/4.

III.1.1.1.2 Exon 3 : un exon essentiel

L'interaction entre l'ARN et les protéines MBNL est déterminée par une séquence de 80 acides aminés codée par l'exon 3, séparant les deux paires de doigts de zinc et contenant un signal de localisation nucléaire (NLS) (Sznajder et Swanson 2019). Même s'il ne contient aucun domaine de liaison à l'ARN, la délétion complète de cet exon perturbe fortement l'affinité de liaisons pour les pré-ARN indiquant que sa présence est nécessaire pour une fonction optimale des domaines ZnF (Kino 2004; Tran et al. 2011). L'explication proposée repose sur la possibilité que cet exon apporte de la flexibilité, facilitant les interactions et jouant un rôle essentiel pour le maintien de l'intégrité de la conformation de la protéine (Cass et al. 2011; Tran et al. 2011). Il existe également des régions régulatrices, au sein de la séquence de l'exon 3, essentielles pour la régulation des exons alternatifs tels que les récepteurs de l'insuline (IR) ou de la troponine T cardiaque (cTNT) (Grammatikakis et al. 2011). La présence de séquences de liaison dans l'exon 3 est nécessaire au maintien des propriétés d'affinités pour les ARN. L'absence de l'exon 3 réduit ses capacités de régulation de l'épissage des transcrits cibles, mais il n'est pas essentiel

pour la liaison aux ARN, puisque les formes de MBNL1 dépourvues d'exon 3 colocalisent avec les *foci* dans des modèles DM1 (Grammatikakis et al. 2011; Tran et al. 2011). Cet exon semble jouer un rôle primordial dans le maintien de l'intégrité de la structure et de la fonction de MBNL, indiquant des rôles légèrement différents de chaque paralogue (Grammatikakis et al. 2011).

III.1.1.2 Propriétés de la partie C-terminale (exon 5 à exon 10)

La partie C-terminale des protéines MBNL est la partie qui varie le plus entre les paralogues (exon 5 à 10). Ne contenant aucun motif de liaison à l'ARN, sa présence n'est pas requise pour la reconnaissance de l'ARN. En effet, les protéines MBNL1 délétées de la partie C-terminale présentent une affinité similaire pour ses ARN cibles, tout comme la protéine pleine longueur (Kino 2004; Terenzi et Ladd 2010), mais sa capacité à réguler l'épissage est réduite ou perdue (Kino 2004).

III.1.1.2.1 Localisation nucléaire : exon 5 et exon 6

Localisé juste après le dernier domaine ZnF (Znf4), l'exon 5 est l'élément crucial pour la localisation nucléaire des protéines MBNL. L'épissage alternatif de l'exon 5 induit la présence ou l'absence de cet exon. Hautement conservé, l'exon 5 est présent dans les ARNm de *Mbnl1* et *Mbnl2* et partage 72 % de similarité. Par contre, aucune séquence de ce type n'existe dans *Mbnl3* ce qui explique la prédominance de la protéine MBNL3 dans le cytoplasme (Gates, Coonrod, et Berglund 2011). L'exclusion de l'exon 5 des transcrits *MBNL1* et *MBNL2* génère des protéines principalement localisées dans le cytoplasme, alors que l'inclusion conditionnera une localisation principalement nucléaire (Kino et al. 2015; Lin et al. 2006; Terenzi et Ladd 2010; Tran et al. 2011). Ces observations suggèrent l'existence d'un ou plusieurs motifs de localisation nucléaire NLS, permettant l'adressage des protéines du cytoplasme vers le noyau. Des études sur le modèle *Drosophila melanogaster* ont montré que l'exon 5 ne constitue qu'une partie d'un NLS et un second motif NLS à cinq acides aminés très conservé entre *C. elegans* et les vertébrés a été identifié dans l'exon 6 constitutif de tous les paralogues de MBNL. La localisation nucléaire de tous les MBNL nécessite donc un signal qui se situe en partie dans l'exon 5 et dans l'exon 6 (Fernandez-Costa et al. 2011) et la fonctionnalité du NLS présent dans l'exon 6 ne se fera qu'en présence de l'exon 5. La présence de l'exon 6 est essentielle pour l'activité d'épissage de MBNL. L'exon 5 subit une autorégulation d'épissage alternatif et peut être pris en charge par tous les paralogues grâce à la présence de plusieurs sites de liaison dans

l'intron 4 (Gates et al. 2011). Dans la DM1, la boucle d'autorégulation est fortement perturbée. La titration des protéines MBNL dans le noyau par les ARN toxiques provoque la perte de fonction de l'activité d'épissage et l'augmentation de l'inclusion de l'exon 5. De par la présence de l'exon 5 contenant une séquence NLS, ces isoformes s'accumulent dans le noyau et sont titrées par les ARN toxiques conduisant à la progression de la maladie et à l'aggravation du phénotype de la DM.

III.1.1.2.2 Multimérisation de l'exon 7

L'exon 7 est également très conservé avec une forte similarité entre les paralogues (60-82%) et code pour une très courte séquence de 12 acides aminés. Sa fonction exacte est mal connue mais sa présence induit la formation de conformations multimériques en forme d'anneau (Yuan et al. 2007). Des études complémentaires ont montré l'existence d'un phénomène d'auto-dimérisation des protéines MBNL1 dépendante de l'exon 7 (Tabaglio et al. 2018; Tran et al. 2011), et sa présence pourrait améliorer l'affinité de la protéine pour les ARNm (Sznajder et al. 2016). Dans la DM1 l'inclusion de l'exon 7 semble contribuer à la pathogenèse de la maladie, puisque les isoformes MBNL contenant l'exon 7 sont élevées. Son inclusion inappropriée pourrait contribuer à une auto-association des protéines MBNL et à la formation de *foci* (Tran et al. 2011). Parallèlement à la DM1, *MBNL1* est bien décrit dans la progression de certains cancers et joue un rôle en tant que suppresseur de tumeur (Fish et al. 2016). Notamment, les isoformes dépourvues de l'exon 7, inhibent la survie et la migration des cellules cancéreuses de la prostate (Tabaglio et al. 2018).

III.1.1.2.3 Exon 8

L'exon 8 est composé de 95 nucléotides et montre une conservation élevée entre les trois paralogues de MBNL, atteignant près de 87% de similitude. Comme les exons 5 et 7, son expression subit des changements importants au cours du développement tissulaire, mais montre également un épissage aberrant dans la DM (Sznajder et al. 2016). Alors que la plupart des exons de MBNL sont régulés par MBNL elle-même, l'inclusion de l'exon 8 de MBNL2 est régulée également par les protéines CELF1 (Kalsotra et al. 2008; Wang et al. 2015). Bien que la fonction de cet exon soit mal connue, il a été suggéré que sa présence pourrait favoriser la bonne régulation de l'épissage alternatif des protéines MBNL en exerçant un effet positif sur l'exclusion des exons alternatifs (Sznajder et al. 2016). De plus, il pourrait jouer un rôle dans la mobilité des protéines MBNL séquestrées au sein des *foci* (Sznajder et Swanson 2019).

III.1.1.2.4 Éléments régulateurs supplémentaires de MBNL1

En plus de la boucle d'autorégulation de l'exon 5 qui détermine la localisation nucléaire des MBNL, une autre régulation par rétroaction a été décrite pour l'exon 1. Cet exon constitue mutuellement la région 5' non traduite (5'UTR) et l'extrémité N-terminale de la protéine qui englobe la première paire de ZnFs. L'épissage alternatif de l'exon 1 est régulé par tous les paralogues de MBNL. L'expression de MBNL1 est conditionnée par la présence de l'exon 1 car son exclusion déplace le début de la traduction vers l'exon 2, ce qui entraîne un ARN messager mature auquel il manque la première paire de ZnF (ZnF 1/2). La stabilité de ce transcrit dépourvu d'exon 1 est affectée de même que son activité d'épissage. Il est important de noter que la régulation de l'exon 1 dépend du site d'initiation de la transcription qui varie d'un tissu à l'autre. Dans la DM, l'inclusion de l'exon 1 et l'activation/désactivation de la boucle de rétroaction autorégulatrice sont fortement perturbées, dû au manque de protéines MBNL fonctionnelles (Konieczny et al. 2017). De plus ce phénomène est restreint à MBNL1 et absent pour les deux autres paralogues. En plus de sa fonction d'autorégulation, l'exon 1 de MBNL1 joue un rôle important dans d'autres mécanismes de boucle de rétroaction négative. Chez l'homme, MBNL1 se lie dans l'intron 1 du pré-ARN messager de MBNL1, provoquant l'élimination de l'exon 1 et sa circularisation (cirRNA MBNL1). Cet ARN circulaire contient des sites de liaison potentiels aux protéines MBNL et peut agir comme une éponge titrant ainsi les protéines (Ashwal-Fluss et al. 2014). Récemment, il a également été découvert qu'un sous-ensemble d'ARN circulaires est traduit *in vivo* (Pamudurti et al. 2017) y compris les ARN circulaires générés à partir de MBNL1 (Konieczny et al. 2017), mais le rôle de ce polypeptide est inconnu. L'analyse de muscle contrôle et de patient DM a montré des niveaux similaires d'ARN circulaires, malgré une augmentation significative des niveaux de transcription de *MBNL1* contenant l'exon 1 chez les patients DM (Patryk Konieczny et al. 2017). Néanmoins, plusieurs autres ARN circulaires sont dérégulés dans le tissu musculaire squelettique DM1, indiquant le rôle potentiel de la circularisation de l'ARN dans la progression de la maladie (Voellenkle et al. 2019).

Même si la localisation cellulaire de MBNL est principalement déterminée par la présence d'un signal de localisation nucléaire influencé par la présence ou l'absence de l'exon 5, il ne s'agit pas du seul mécanisme influençant la localisation de MBNL. Au cours du développement du cerveau, l'ubiquitination de MBNL1 liée à la lysine63 contrôle sa localisation cytoplasmique indépendamment de l'épissage de l'exon 5 de MBNL1. Cette localisation cytoplasmique est

importante pour la morphogénèse des neurites, car seules les isoformes MBNL1 cytoplasmiques favorisent la croissance des neurites. Un modèle de souris DM exprimant des répétitions toxiques dans le cerveau a montré un niveau réduit d'ubiquitination de MBNL suggérant que la présence de ces ARN provoque une désubiquitination de MBNL1, entraînant ainsi une translocation des protéines MBNL du cytoplasme vers le noyau. Cette translocation anormale induit une diminution du MBNL1 cytoplasmique contribuant à l'altération morphologique et à la pathogénèse neurale dans la DM1 (P.-Y. Wang et al. 2018).

III.2 Les fonctions de MBNL1

III.2.1.1 Régulateur de l'épissage alternatif

Les protéines MBNL régulent le profil d'épissage alternatif de centaines de transcrits au cours du développement, en favorisant l'inclusion ou l'exclusion de certains exons. Cette fonction dépend généralement de la position de liaison par rapport à l'exon régulé (Charizanis et al., 2012 ; Goers et al., 2010 ; Kalsotra et al., 2008 ; Wang et al., 2012) (**Figure 18**). En se liant en amont d'un exon (sur l'exon ou dans la région intronique), MBNL1 a tendance à réprimer l'inclusion de cet exon. Au contraire, lorsqu'elle se lie dans la région intronique en aval de l'exon à réguler, elle activera son exclusion de l'ARN.

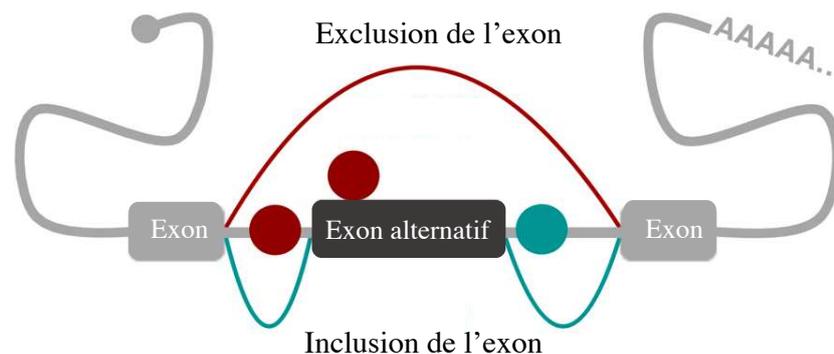


Figure 18 : Représentation schématique de la régulation des exons alternatifs dépendant de MBNL. L'inclusion ou l'exclusion d'exons alternatifs dépend du site de liaison des protéines MBNL. En général, la liaison dans les régions indiquées par les points rouges induit l'exclusion de l'exon et dans la région marquée par le point vert, l'inclusion de l'exon.

Lors du développement du tissu cérébral, cardiaque ou musculaire par exemple, MBNL1 et 2 régulent l'expression d'isoformes d'épissage embryonnaire (ou fœtal) afin d'effectuer la transition vers le stade adulte (Konieczny et al. 2014) (**Figure 19**). Cette transition est en partie due à la translocation des protéines MBNL du cytoplasme vers le noyau au cours du développement (Lin et al. 2006). Dans le cas de la DM1, la présence des ARN toxiques

séquestrant les protéines MBNL empêche la maturation des transcrits des isoformes fœtales à adultes et induit la re-expression de protéines fœtales (Konieczny et al. 2014a). MBNL1 et MBNL2 régulent des événements d'épissage alternatif distincts ou les mêmes mais avec des efficacités différentes. Ceci peut s'expliquer par une affinité différente pour les cibles d'ARN, probablement dû à des différences de structure au sein de l'exon 3.

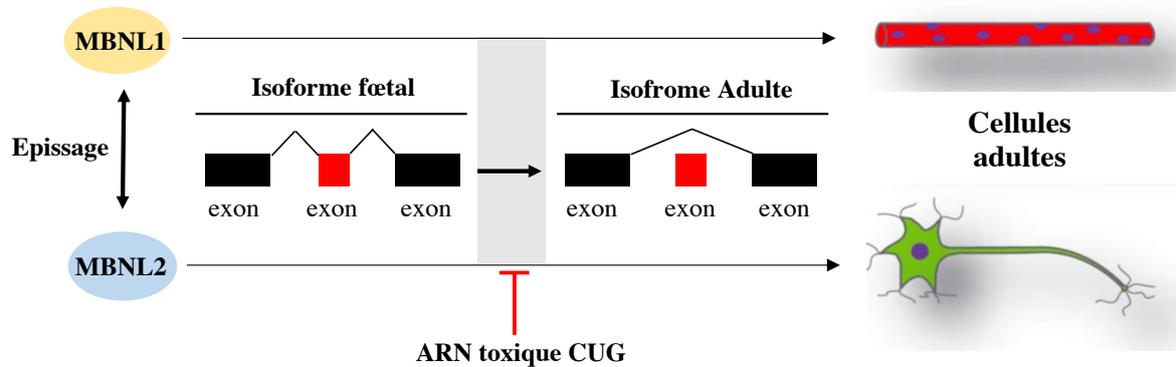


Figure 19 : MBNL1 et MBNL2 régulent la transition des isoformes fœtales à adultes des ARN messagers. Modèle représentant l'action des protéines MBNL1 dans le muscle et MBNL2 dans le cerveau favorisant l'épissage alternatif d'isoformes d'ARN adulte. L'activité d'épissage est inhibée par la présence de répétitions CUG dans la DM1 provoquant un retour vers des formes néonatales immatures.

III.2.1.2 Régulation des processus dépendants des 3' UTR

En plus de son rôle principal dans la régulation de l'épissage alternatif, MBNL se lie également dans la région 3' non traduite (3' UTR) de nombreux transcrits (Wang et al. 2012a). Cette interaction préférentielle indique l'implication des protéines MBNL dans la régulation de processus cellulaires passant par l'utilisation des 3'UTR.

III.2.1.2.1 Polyadénylation alternative

La maturation transcriptionnelle du pré-ARN messenger implique trois étapes : le coiffage, l'épissage alternatif et la formation d'une extrémité 3' par clivage et ajout d'une queue poly (A). Pour de nombreux transcrits, il existe des sites alternatifs de clivage et de polyadénylation (PAS) qui peuvent générer plusieurs isoformes d'ARNm avec différentes tailles de 3' UTR). Ce phénomène, appelé polyadénylation alternative (APA), génère des terminaisons 3' différentes et permet, à partir d'un seul gène, de créer plusieurs transcrits, chacun avec un contenu différent. Ces différents 3' UTR alternatifs sont caractérisés par la présence ou l'absence d'éléments régulateurs tels que les sites de protéines de liaison à l'ARN, des sites de liaison aux micro ARN (miARN) ou longs ARN non codants (lncRNA) (Barreau, Paillard, et Osborne 2005; Fabian,

Sonenberg, et Filipowicz 2010). Les sites poly(A) alternatifs situés dans des introns ou exons produiront différentes isoformes de protéines. Dans d'autres cas, les sites APA tous situés dans la région 3' UTR, donneront des transcrits avec des 3' UTR de longueurs différentes mais codant pour la même protéine (**Figure 20**). Ces sites permettent donc la régulation de l'expression des gènes en modifiant soit l'abondance du transcrit, la stabilité ou l'efficacité de la transcription (Tian et Manley 2017).

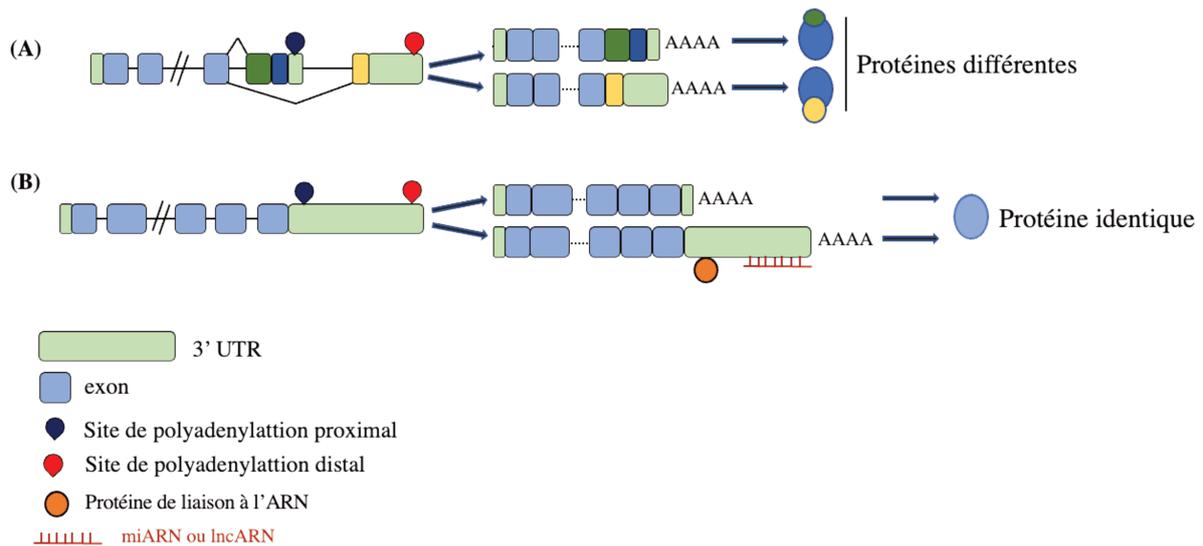


Figure 20 : Représentation schématique de la polyadénylation alternative (APA)

(A) Production d'isoformes d'ARNm avec des régions codantes C-terminales distinctes, entraînant des isoformes protéiques distinctes. (B) Production d'isoformes d'ARNm distinctes de longueurs de 3' UTR différentes codant pour la même protéine. Les 3' UTR plus longs contiennent des éléments régulateurs, tels que les lncARN, des miARN ou des sites de liaison aux protéines. Boîte vert clair : régions 3' non traduites. Boîtes vert foncé et bleu clair : régions codantes identiques. Boîtes bleu foncé et jaune : régions codantes différentes. Lignes : introns. Queue polyA : AAAA (d'après Di Giammartino et al, 2012)

Dans la DM1, il a été démontré que les protéines MBNL sont des régulateurs importants du changement développemental lors du passage de l'état embryonnaire à l'état adulte des sites de polyadénylation (Batra et al. 2014). En se liant sur des motifs YGCY, situés en amont du signal de polyadénylation (AAUAAA), MBNL régule le choix entre divers exons terminaux, en activant ou en réprimant le mécanisme de polyadénylation conduisant à des tailles différentes de 3' UTR. Ces modifications vont permettre un adressage et une localisation des ARN messagers différents. Il est donc proposé que MBNL1 régule l'APA de ses ARN cibles et que la perte de fonction de MBNL1 entraîne une prise en charge aberrante de l'extrémité 3' de ces

cibles. La maturation de ces ARN et leur localisation sont donc affectées et pourraient participer aux symptômes de la maladie (**Figure 21**).

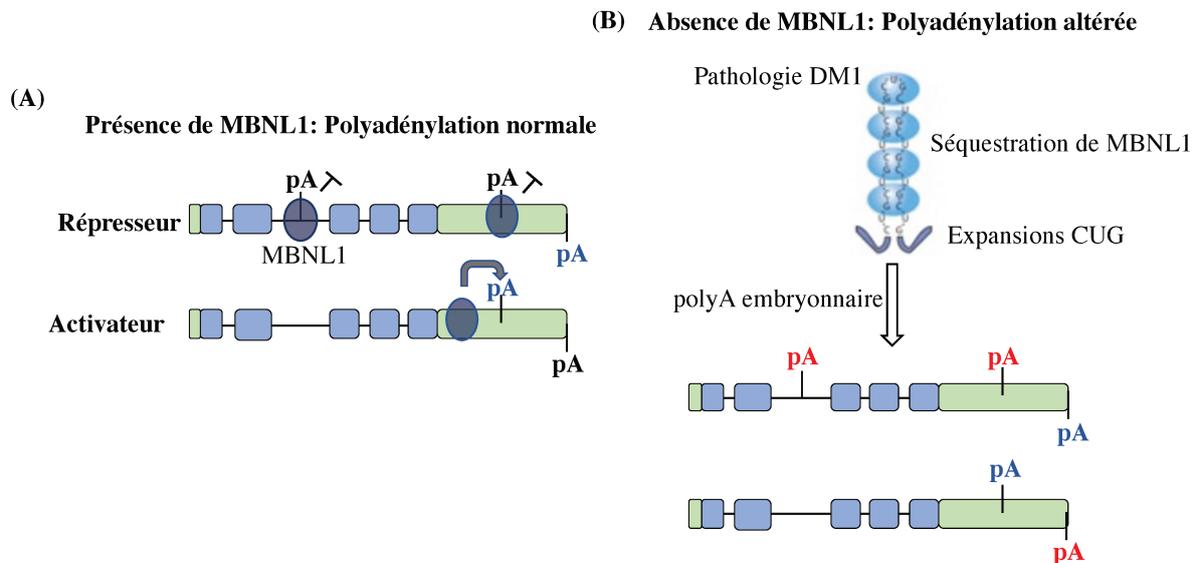


Figure 21 : MBNL1 régule la polyadénylation des ARN :

(A) Lorsque la protéine MBNL recouvre un site polyA, elle réprime le mécanisme de polyadénylation, tandis que la liaison en amont active le mécanisme sur le site en aval. (B) L'épuisement de l'activité MBNL dû à la séquestration par les ARN-CUGexp entraîne une activation aberrante des sites polyA normalement exprimés au cours de l'embryogenèse (pA rouge) et l'extinction des sites polyA adultes (pA bleu) (Adapté de Batra et al., 2014)

III.2.1.2.2 Localisation

Les protéines MBNL1 sont présentes dans le noyau mais également dans le cytoplasme et sont majoritairement accolées à la membrane plasmique. *In vivo*, MBNL1 montre une forte concentration aux disques Z du sarcomère (Denes, Kelley, et Wang 2021). L'ancrage de MBNL à la membrane a en effet été démontré dans des myoblastes via la partie non structurée C-terminale de MBNL1 (Hildebrandt et al. 2022). Impliquées dans la régulation de l'épissage alternatif et la polyadénylation des ARN, les protéines MBNL jouent également un rôle important dans la détermination de la localisation des ARN dans le muscle squelettique (Adereth et al. 2005; Wang et al. 2012a). Ainsi, MBNL2 se lie sur le 3' UTR de l'ARN messager de l'intégrine $\alpha 3$ et détermine sa localisation à la membrane plasmique (Adereth et al. 2005). Ces résultats ont été renforcés par une étude sur l'implication de MBNL1 dans la localisation des ARN au sein des neurones. Ces travaux ont montré qu'un grand nombre d'ARN possèdent une région 3' UTR alternative grâce à l'utilisation d'un exon terminal qui sera soit proximal, soit distal. L'utilisation de l'exon terminal proximal localisera l'ARN au niveau des corps

cellulaires (soma) alors que l'utilisation de l'exon distal orientera l'ARN au niveau des neurites du neurone (Taliaferro et al. 2016) (**Figure 22**). De plus, la déplétion de MBNL1 dans des cellules en culture engendre des défauts de localisation de nombreux ARN messagers identifiés pour leur potentielle liaison avec MBNL1 dans leur régions 3' UTR. Ainsi, il a été proposé que les protéines MBNL1 servent d'intermédiaire entre les ARN à transporter dans les différents compartiments et les protéines de transport intracellulaire (Wang et al. 2012a). De même que pour la polyadénylation alternative, une localisation inadéquate de certains ARN messagers due à la séquestration de MBNL1 pourrait également participer aux symptômes de la maladie. Notamment, les structures cellulaires telles que les jonctions neuromusculaires (NMJ) seront impactées (Otero et al. 2021) puisque la formation des neurites et des synapses est fortement dépendante d'une localisation correcte des ARN. Ces défauts morphologiques des NMJ au niveau du diaphragme ont été identifiés chez un modèle murin DM1 (Panaite et al. 2008). Ces altérations de structure pourraient expliquer les défauts respiratoires caractéristiques de la maladie. De plus, la localisation des protéines MBNL1 n'est pas uniforme dans le cytoplasme.

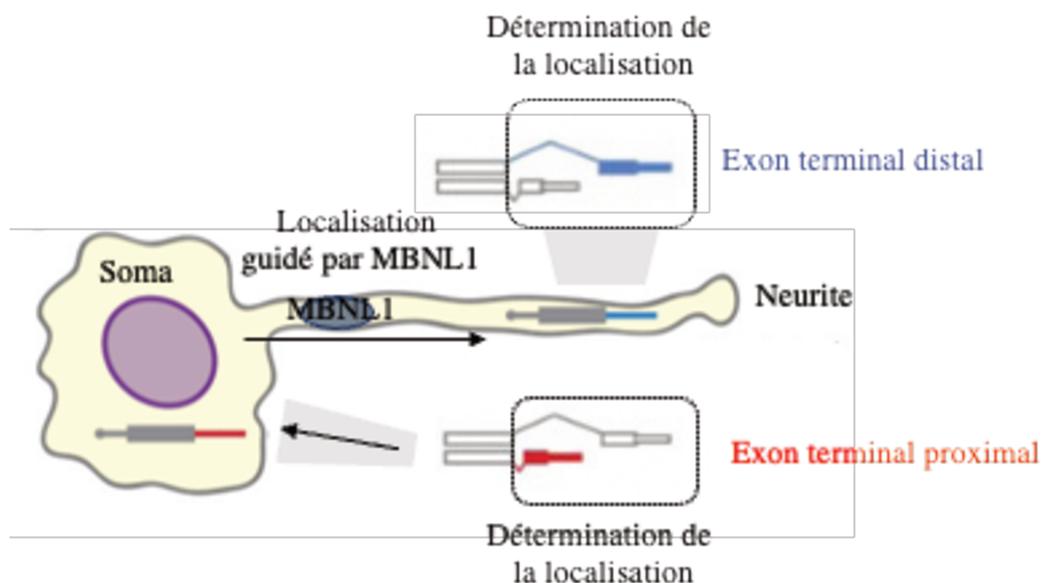


Figure 22 : Localisation des ARN neuronaux selon leur épissage

La localisation finale des ARN est dépendante du choix de l'exon terminal inclus. L'inclusion de l'exon proximal (rouge) dirigera l'ARN vers le corps cellulaire (soma) du neurone. En revanche, l'inclusion de l'exon distal (bleu) dirigera l'ARN vers les neurites. La localisation de ces derniers est guidée par MBNL1 (Adapté de Taliaferro, et al., 2016)

III.2.1.2.3 Stabilisation des ARN

Les protéines se liant au pré-ARN messager régulant l'épissage alternatif peuvent également se lier à l'ARN messager pour réguler la stabilité ou la traduction. Les protéines de la famille

MBNL se lie sur les sites du 3' UTR de transcrits cibles modulant ainsi la polyadénylation alternative, la localisation mais également la dégradation de ces transcrits cibles (Masuda et al. 2012; Osborne et al. 2009). L'analyse de ces ARN cibles a montré qu'ils sont particulièrement riches en gènes codant pour des protéines du cytosquelette et des facteurs de transcription tel que PTIX2 (paired like homeodomain 2) qui est impliqué dans la formation de l'œil et du cœur (Masuda et al. 2012).

III.2.1.3 La prise en charge des miARN

Les micro ARN (miARN) sont de petits ARN ayant une longueur d'environ 22 nucléotides régulant l'expression des gènes, de façon post-transcriptionnelle. La liaison des miARN dans la région 3' UTR des ARN cibles inhibe la traduction ou provoque leur dégradation. Plusieurs familles de miARN ont été identifiées comme dérégulées chez les patients DM1 et DM2. Plus particulièrement, miR-1, miR-7, miR-10 et miR-29 dans la DM1 et miR221-3p, miR34c-5p et miR125b-5p dans la DM2, semblent être altérés dans des cellules musculaires dérivées de patients DM (Fernandez-Costa et al. 2013; Greco et al. 2012; Perbellini et al. 2011). Notamment, la famille des miR-1 montre une expression réduite dans le tissu cardiaque des patients DM1, dû à la séquestration de MBNL1. Les protéines MBNL1 sont directement impliquées dans la maturation de ce miARN en se liant à un seul motif UGC du pré-miR-1. La perte de fonction de MBNL1 entraîne une diminution de la maturation du pré-miR1 et donc la diminution de l'expression de miR-1 mature. En conséquence, la régulation de transcrits cibles comme *CACNA1C* et *GATA1* est perturbée et conduit à l'expression accrue des protéines correspondantes qui sont associées aux symptômes cardiaques présents chez les patients DM1. Afin de faciliter le diagnostic des patients et de suivre la progression de la maladie, il a été proposé que les miARN puissent être de bons candidats biomarqueurs. En effet, ces miARN sont présents en quantité significative dans le plasma et le sérum, permettant une détection non-invasive. Plusieurs miARN sont spécifiquement retrouvés accrus dans des échantillons sanguins, ou diminués dans le muscle squelettique de patients DM1 (Koutsoulidou et al. 2015; Perfetti et al. 2014). Cependant une étude en contradiction avec ces résultats a montré que ces miARN ne pouvaient être utilisés en tant que biomarqueurs (Fernandez-Costa et al. 2016).

Conclusion

La famille des protéines de liaison à l'ARN MBNL joue un rôle important dans le développement tissulaire et leur dérégulation engendre les principaux symptômes DM (Miller 2000). Dans le cas de la DM1, la perte de fonction des protéines MBNL induite par la séquestration dans les *foci* (Miller 2000), perturbe toutes ces fonctions. Notamment, la dérégulation de l'épissage alternatif dans les différents tissus implique la réexpression de protéine fœtale, moins ou non fonctionnelle dans un tissu mature (Konieczny et al. 2014a). Combiné aux défauts de localisation et de stabilité des ARN messagers cibles, tous ces dysfonctionnements participent collectivement aux symptômes musculaires et non musculaires observés dans la maladie ((Batra et al. 2014; Masuda et al. 2012; Rau et al. 2011, 2015; Wang et al. 2012b).

IV. Les approches thérapeutiques dans la DM1

À ce jour, il n'existe pas de traitement curatif dans les DM. Seule la prise en charge des symptômes individuels (atteintes cardiaque, respiratoire, myotonie, douleur ...) pour améliorer la qualité de vie et réduire les risques de mort subite, est proposée aux patients. Cependant, les progrès constants dans la compréhension de la pathologie ainsi que le développement de nouveaux modèles cellulaires ou murins, ont permis la caractérisation approfondie des mécanismes et le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. De plus, des études précliniques ont démontré que plusieurs marqueurs de la pathologie pouvaient être corrigés suite à un traitement thérapeutique et ce, à plusieurs niveaux.

Ainsi, dans un contexte de développement d'approches thérapeutiques, quatre points principaux doivent être pris en considération dans le mécanisme pathologique. 1) Les ARN mutés contenant les grandes répétitions CUG sont retenus dans le noyau, séquestrant les facteurs d'épissage de la famille MBNL et induisant une perte de fonction délétère. 2) Les *foci* formés suite à l'expression des ARN mutés sont des assemblages dynamiques qui constituent un état réversible (Sznajder et al. 2016). 3) La séquestration des MBNL semble dépendre de la longueur des répétitions. Ainsi en présence de courtes répétitions, une faible proportion de MBNL est piégée. En revanche, en présence d'ARN contenant une grande taille de CUG, la plupart des protéines MBNL sont séquestrées conduisant à l'épuisement des protéines MBNL libres (Sznajder et al. 2016). 4) L'inclusion anormale de l'exon 5 de MBNL dans la DM1 augmente la proportion des isoformes MBNL présentant un NLS, renforçant leur quantité dans le noyau et réduisant leur présence dans le cytoplasme. Ce déséquilibre de localisation et de perte de fonction perturbe toutes les activités de MBNL décrites précédemment. Grâce à la compréhension fine des mécanismes et l'identification des partenaires moléculaires impliqués dans la maladie, différentes approches thérapeutiques ont été développées ou sont en cours de développement.

IV.1 Différentes stratégies pour traiter la Dystrophie Myotonique

Dans le contexte de la DM1, les transcrits *DMPK* mutés et leurs interactions délétères avec les protéines MBNL sont les cibles privilégiées pour développer des approches thérapeutiques.

Les différentes options thérapeutiques proposées peuvent donc cibler toutes les étapes des mécanismes pathologiques exposés précédemment. Ainsi elles peuvent consister à : A) réduire ou enlever les répétitions CTG directement au niveau de l'ADN génomique, B) inhiber l'expression de l'allèle *DMPK* muté, C) dégrader directement les transcrits *DMPK* mutés, D)

concurrer l'interaction entre les ARN-CUG et les protéines MBNL1, E-F) augmenter spécifiquement le niveau endogène de MBNL ou diminuer les niveaux de CELF1, G) cibler directement les conséquences et les effets de la maladie (**Figure 23**).

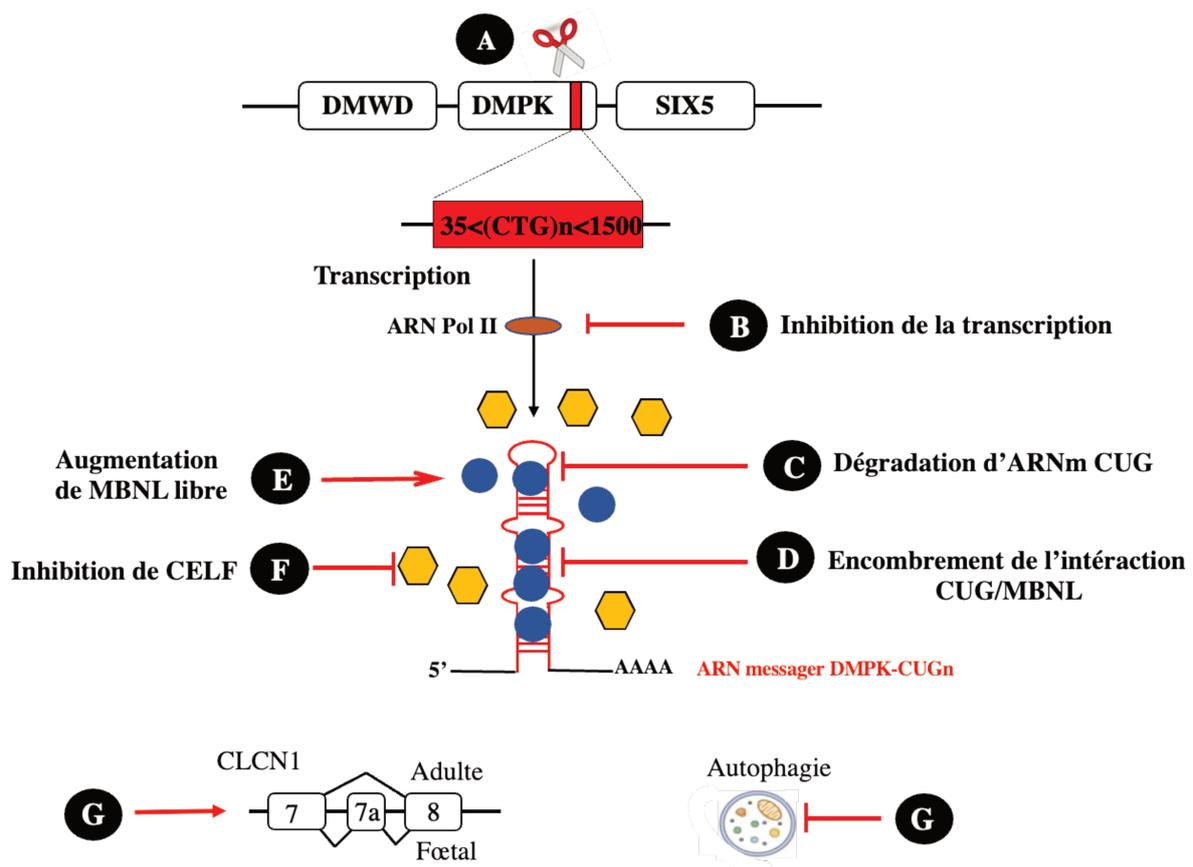


Figure 23. Exemples d'approches thérapeutiques ciblées pour la Dystrophie Myotonique de type 1. (A) Élimination ou réduction de la taille des répétitions à une taille non pathogène par ingénierie génomique. (B) Inhibition de la transcription en ciblant les cofacteurs de l'ARN polymérase. (C) Dégradation du transcrit par utilisation d'oligonucléotides antisens (ASO) qui se lie aux transcrits mutants et déclenchent leur dégradation par la RNase H ou le clivage de l'ARNm activé par la nucléase. (D) Encombrement stérique de la liaison CUG/MBNL par l'utilisation de peptides, molécules ou d'ASO. (E) Augmentation des protéines MBNL libres par surexpression de protéines MBNL ou l'utilisation d'antagomiR. (F) Inhibition de la surexpression de CELF1 par l'utilisation de petites molécules. (G) Correction ciblée de l'autophagie ou des défauts d'épissage du canal chlore par utilisation d'ASO.

IV.1.1 Contraction/Élimination des répétitions CTG par l'ingénierie génomique

IV.1.1.1 Contraction des CTG dans *DMPK*

La DM1 est une maladie caractérisée par une instabilité des séquences répétées (CTG), provoquant généralement une expansion du nombre de triplets au cours de génération (Tomé

et al. 2009, 2013; Viterbo et al. 2016) mais dans de rares cas, certaines familles présentent des contractions des répétitions CTG, associées à une amélioration des symptômes (O’Hoy et al. 1993; Tomé et al. 2018). Ce phénomène de contraction montre que la réduction de la taille des répétitions est une piste thérapeutique envisageable. Une approche par utilisation de nucléases effectrices de type activateur de transcription (TALEN) a permis une cassure précise à l’intérieur de la région contenant les expansions CTG provoquant une contraction efficace des répétitions à une longueur non pathogène dans les cellules de levure (Mosbach et al. 2018; Richard et al. 2014).

IV.1.1.2 Élimination des CTG dans *DMPK*

Les technologies émergentes d’ingénierie du génome, notamment d’édition ciblée de gènes ou de leur régulation, ont déjà été envisagée pour plusieurs pathologies neuromusculaires. Dans le cas de la DM1, le ciblage spécifique des répétitions a pour but d’empêcher définitivement la production des transcrits contenant des répétitions CTG. Ainsi, plusieurs études ont été réalisées afin de provoquer des cassures de l’ADN spécifiquement de part et d’autre des répétitions CTG à l’aide du système CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR Associated protein 9) (**Figure 24A**). La nucléase Cas9 est orientée par une paire de guides ARN vers des séquences spécifiques en amont et en aval des répétitions CTG. En coopération avec le système de réparation de l’ADN, les cassures double brin produites permettent l’élimination de la séquence interne contenant les triplets CTG, induisant la diminution du nombre de *foci* et la correction des défauts d’épissage (van Agtmaal et al. 2017; Provenzano et al. 2017; Y. Wang et al. 2018; Dastidar et al. 2018; Lo Scudato et al. 2019; Ikeda et al. 2020)

IV.1.1.3 Insertion de signaux de polyadénylation (PAS)

Une alternative à l’excision complète ou partielle des répétitions CTG est de modifier le génome en insérant des séquences de signaux de polyadénylation (PAS) exogènes en amont des CTG (**Figure 24B**). Grâce à des approches utilisant des TALEN ou CRISPR/Cas9, l’insertion de PAS suite à des cassures double brin de l’ADN, conduit à un arrêt prématuré de la machinerie de transcription et, par conséquent, à la prévention de la production d’ARNm mutants toxique. Ces deux approches ont montré une correction des phénotypes dans différents types cellulaires, y compris des cellules musculaires ou des cellules iPS issues de patients DM1 (Xia et al. 2015; Gao et al. 2016; Y. Wang et al. 2018)

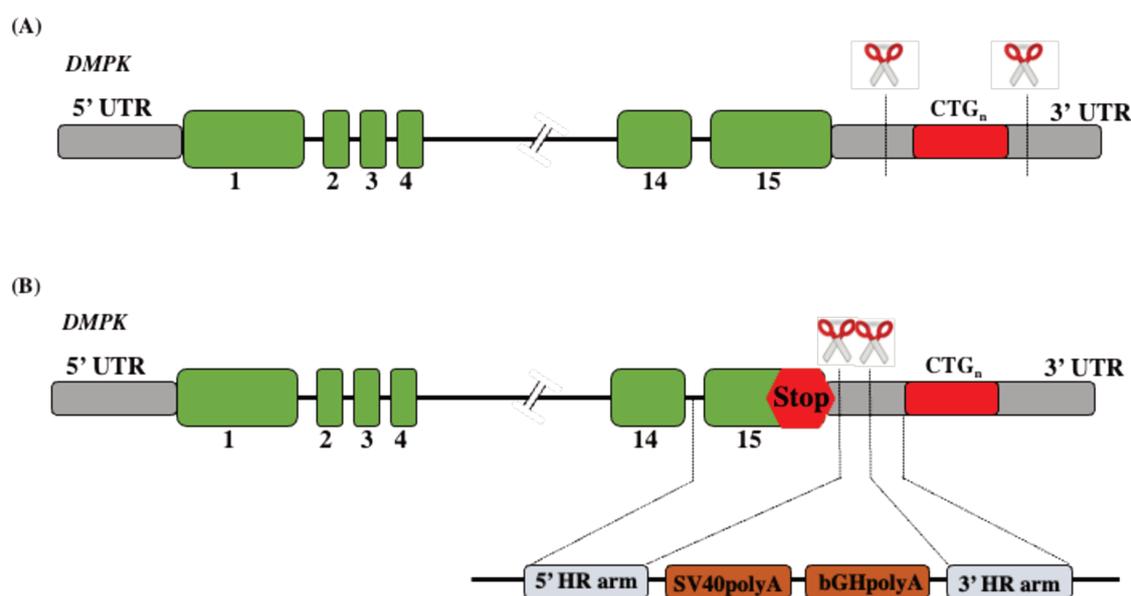


Figure 24 : Les approches d'ingénierie génomique dans le cadre de la DM1.

Approche consistant à éliminer les répétitions au niveau de l'ADN par (A) coupures de l'ADN à l'aide du système d'ingénierie génomique CRISPR/Cas9 de part et d'autre des CTG situés en 3' UTR du gène *DMPK*, ou par (B) insertion de séquences de signaux poly(A) exogènes à l'aide des systèmes d'ingénierie génomique TALEN ou CRISPR/Cas9, empêchant la transcription des répétitions CTG du gène *DMPK* muté (Adapté de Raaijmakers et al. 2019).

IV.1.2 Inhibition de la transcription du transcrit muté

Dans la perspective de réduire la quantité d'ARN toxique, l'inhibition ou la réduction de la transcription des CTG est une approche thérapeutiques possible. L'utilisation de molécules pharmaceutiques déjà appliquées en thérapie humaine pour le traitement des maladies rares peut représenter une stratégie intéressante et rapide pour la DM1. De plus, la manipulation de l'ingénierie génomique permet également de proposer une alternative innovante.

IV.1.2.1 Petites molécules pharmaceutiques

L'actinomycine D est un intercalant à l'ADN pouvant se lier aux régions riches en GC. Connue comme inhibiteur général de la transcription, son utilisation a montré sa capacité à réduire l'expression de l'ARN contenant des CUG et de corriger les anomalies d'épissage dans les souris HSA^{LR} (Ruth B. Siboni et al. 2015). L'utilisation d'un antibiotique déjà utilisé chez l'homme, l'Érythromycine, a montré une forte affinité pour les répétitions CUG. Il a été observé une réduction du nombre de *foci* et une correction des défauts d'épissage sur des cellules DM1 en culture et sur le modèle murin HSA^{LR} (Nakamori et al. 2016). De même, un médicament antiparasitaire, la Pentamidine, et d'autres antibiotiques apparentés, ont montré des effets bénéfiques dans les modèles DM1. Ces différentes molécules utilisent le même mécanisme de liaison aux CTG que l'Actinomycine D. Les cellules DM1 traitées à la Pentamidine ont montré une relocalisation des protéines MBNL dans le noyau, une diminution de l'expression des transcrits CUG associée à la correction des défauts d'épissage de manière dose-dépendante (Warf et al. 2009; Coonrod et al. 2013), et l'administration chez des souris HSA^{LR} a entraîné une inversion partielle des défauts d'épissage. Néanmoins, l'effet bénéfique n'a pas perduré après l'arrêt du traitement et les doses requises pour observer des changements phénotypiques significatifs ont montré une toxicité limitant l'utilisation du médicament (Warf et al. 2009). L'Heptamidine, un analogue moins toxique que la Pentamidine, corrige les défauts d'épissage et la myotonie chez les souris HSA^{LR} de manière rapide et plus efficace que le traitement à la Pentamidine (Coonrod et al. 2013). L'effet inhibiteur de la séquestration des protéines MBNL et de la diminution du transcrit muté a également été observé pour d'autres molécules comme la Furamidine (Jenquin et al. 2018, 2019). De même, le mécanisme d'inhibition de l'élongation de la transcription a été reproduit par un outil issu de l'ingénierie génomique ciblant les expansions CTG. En effet, un complexe CRISPR/dCas9, dans lequel l'activité nucléase de la Cas9 (dCas9) a été abolie, se lie directement aux répétitions CTG à l'aide de gRNA dirigés contre cette séquence répétée. Cette liaison stable bloque le processus d'élongation par la RNA polymérase, entraînant une diminution des ARN toxiques et une correction des défauts d'épissage dans les cellules humaines (Pinto et al. 2017) (**Figure 25**).

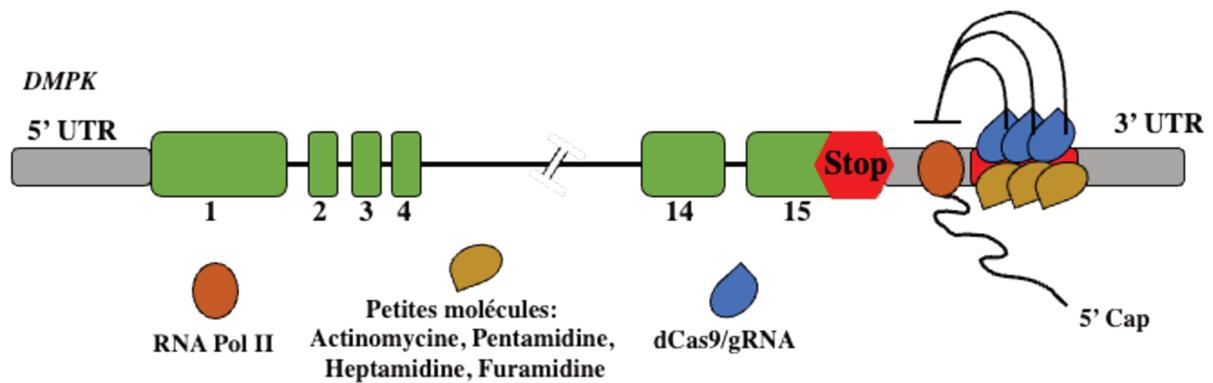


Figure 25 : Différentes approches d'inhibition de la transcription

Approches visant à bloquer la transcription par encombrement stérique au niveau des répétitions CTG sur le gène *DMPK* muté, par l'utilisation de petites molécules pharmacologiques ou par le complexe CRISPR/dCas9. L'interaction entre ces outils et les répétitions CTG empêche le passage de l'ARN polymérase II. L'arrêt de la polymérase entraîne alors la formation de transcrits tronqués rapidement dégradés. Les quantités des transcrits *DMPK* pathologiques responsables de la DM1 sont diminuées améliorant les anomalies spécifiques de la DM1 (Adapté de Raaijmakers et al. 2019).

Même si ces approches semblent prometteuses, leur efficacité reste modérée. Par ailleurs il se pose également la question de la toxicité due à l'utilisation de ces molécules pharmacologiques ou la dCas9/gRNA-CTG qui sont des inhibiteurs de l'élongation, perturbant possiblement la transcription de beaucoup de cibles et pouvant induire un nombre important d'effets secondaires.

IV.1.3 Inhibition post-transcriptionnelle par réduction du transcrit muté

Dans le contexte de la DM1, l'ARN *DMPK* muté constitue une cible de choix en raison de son rôle central dans la physiopathologie de la maladie et plusieurs options thérapeutiques ont été développées pour dégrader directement les transcrits *DMPK* toxiques.

IV.1.3.1 Utilisation de ribozymes dirigés contre les transcrits *DMPK* mutés

Les ribozymes sont des séquences d'ARN naturelles capables de cliver directement l'ARN ciblé ou de remplacer des séquences cibles par les séquences incorporées dans les ribozymes (Castanotto et Rossi 2004). La génération d'un ribozyme issu d'un intron de groupe I (*Tetrahymena*) a permis de cibler 12 répétitions CUG dans le 3' UTR des transcrits *DMPK* humains, et de les remplacer par une séquence plus courte contenant 5 répétitions CUG. Cette approche a montré son efficacité dans des fibroblastes humains en culture (Phylactou, Darrah,

et Wood 1998). L'utilisation d'un autre type particulier de ribozyme en tête de marteau permettant de cibler et de cliver l'ARN *DMPK* muté a été testée dans des myoblastes primaires contenant 750 répétitions. Grâce à ce système, le traitement a montré une réduction de 63% du niveau de transcrit muté, associée à une diminution du nombre de *foci*, de leur intensité et à la correction partielle du défaut d'épissage du récepteur à l'insuline. Néanmoins le ribozyme a également affecté l'allèle sauvage, provoquant une réduction de 50% de son expression. Ces études ont démontré pour la première fois que le clivage de l'ARNm de *DMPK* muté pouvait être considéré pour le traitement de la DM1 (Langlois et al. 2003). Malgré l'efficacité limitée des stratégies à ribozymes, ces approches ont ouvert la voie au développement d'outils visant à dégrader efficacement et spécifiquement les transcrits *DMPK* mutés par l'utilisation d'endonucléases exogènes, des oligonucléotides ou des petites molécules chimiques dirigées contre le transcrit pathologique.

IV.1.3.2 Utilisation d'endonucléases dirigées contre les transcrits *DMPK* mutés

Tout comme les stratégies à ribozymes, les répétitions CUG ont été ciblées grâce à l'utilisation de complexes protéiques synthétiques. Plus spécifiquement, ces complexes sont composés d'un domaine de reconnaissance dirigé contre les répétitions CUG, fusionné à un domaine PIN (issu de la protéine humaine SMEG6) qui possède une activité endonucléase. L'expression de ce complexe PUF/PIN dans des fibroblastes DM1 trans-différenciés a démontré une diminution de la quantité de transcrits mutés, du nombre de *foci* ainsi que la correction du défaut d'épissage de certains transcrits dérégulés (Zhang et al. 2014). Une approche similaire a également été développée en combinant le domaine de reconnaissance deadCas9 (dCas9) au domaine PIN. Cette dCas9, dérivée du système CRISPR/Cas9, a la particularité de se lier ici à l'ARN contenant les CUG, sans induire son clivage et l'activité catalytique est assurée par le domaine PIN. L'expression du complexe dCas9/PIN dans les cellules DM1 a réduit la quantité d'ARN toxique et corrigé une grande quantité des défauts d'épissage observés dans les cellules DM1 (Batra et al. 2017) (**Figure 28**).

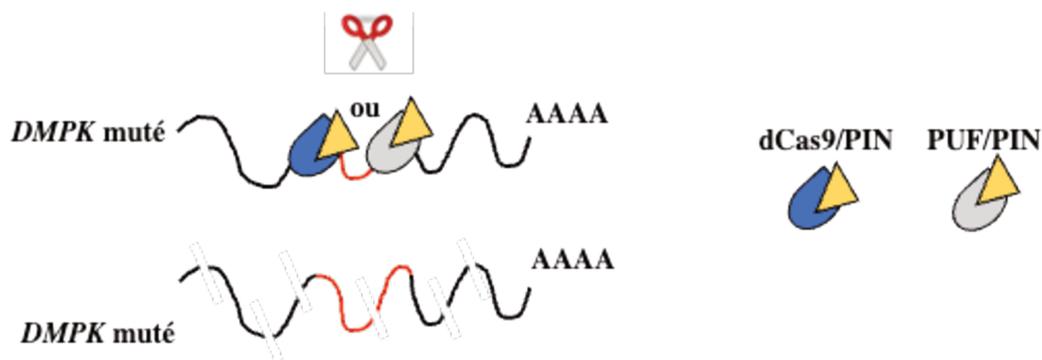


Figure 26 : Différentes approches de dégradation de *DMPK* par l'utilisation d'endonucléases. Dégradation spécifique des transcrits *DMPK* mutés à l'aide d'endonucléases guidées vers les transcrits mutés par les protéines PUF ou deadCas9. (Adapté de Raaijmakers et al., 2019).

IV.1.3.3 Utilisation d'ARN interférent dirigé contre les transcrits *DMPK* mutés

Les oligonucléotides antisens (ASO) sont des courtes séquences d'acides nucléiques synthétiques qui se lient spécifiquement et de façon complémentaire à l'ARN cible, inhibant leur traduction ou provoquant leur dégradation. Un des mécanismes étudiés pour lutter contre la toxicité induite par la présence de transcrits mutés, est celui de l'interférence à l'ARN (ARNi) via l'action de la ribonucléase DICER. Cette protéine est cruciale dans la voie d'interférence à l'ARN car elle reconnaît les séquences d'ARN double brin et induit leur clivage en duplex plus courts de 21 nucléotides. Ces duplex sont ensuite recrutés dans le complexe RISC (RNA-induced silencing complex) pour servir de guide et induire la dégradation de l'ARN cible. Par ailleurs, d'autres stratégies utilisant l'ARN interférence ont été développées. Ainsi, de petites séquences nucléiques exogènes tels que les siRNA (small interfering RNA) ou shRNA (small hairpin RNA) ont été synthétisées pour cibler soit une région en amont des répétitions CUG dans le gène *DMPK* (Langlois et al. 2005), soit directement les CUG ou la région 3' UTR du transgène HSA du modèle murin HSA^{LR} (Sobczak et al. 2013; Bisset et al. 2015). Dans chacune de ces approches, il a été observé une diminution importante des quantités de transcrits, associée à une réduction du nombre de *foci*, une relocalisation de MBNL et une correction des défauts d'épissage. Notamment, dans le modèle HSA^{LR}, la correction du défaut d'épissage du canal chlore *Cln1* a été corrélée à l'abolition de la myotonie après administration locale de siRNA par électroporation. De même, les résultats similaires obtenus par injection systémique *in vivo* montre la possibilité de détruire les ARN mutés par une approche de thérapie génique par AAV (Bisset et al. 2015). Néanmoins, l'utilisation de shRNA dans les cellules DM1 montre une réduction de l'allèle sauvage (Langlois et al. 2005) et un effet négatif sur le transcrit *Txlnb*

contenant 9 répétitions CUG dans son 3' UTR (Sobczak et al. 2013). Ces approches visant à dégrader les transcrits mutés *DMPK* montrent que la prise en charge de l'acteur principal est efficace mais provoque également des effets secondaires délétères. De plus, ces résultats ont montré que l'ARNi pouvait être efficace dans les noyaux des cellules et non uniquement dans le cytoplasme, puisque les transcrits DM1 mutés séquestrés dans le noyau sont dégradés par ce système. Actuellement, un essai clinique mené par la compagnie Avidity est en cours, utilisant des siRNA dirigés contre *DMPK* couplés à un anticorps contre le récepteur à la transferrine anti-TRF1 permettant une meilleure pénétration cellulaire (NCT05027269). Les premiers résultats semblent encourageants, puisque tous les patients injectés montrent une réduction significative de *DMPK*, une amélioration des défauts d'épissage et une amélioration de la myotonie chez certains patients.

IV.1.3.4 OligoAntisens (ASO) Gapmers

Une autre stratégie basée sur la dégradation de l'ARN est l'utilisation d'oligonucléotides antisens (ASO) de type gapmers (ASO-gapmers). Cette stratégie implique l'utilisation d'ASO dont les extrémités 5' et 3' sont constituées de bases chimiquement modifiées (pour augmenter la liaison aux ARN, la résistance aux nucléases et la pénétration tissulaire) et dont le cœur central (ou « gap ») est constitué de 8 à 10 nucléotides d'ADN non-modifié. L'ASO-gapmer lié à son ARN cible forme ainsi au niveau de sa partie centrale, un hétéroduplex ADN/ARN reconnu par la RNase H qui dégradera l'ARN cible (**Figure 27**).

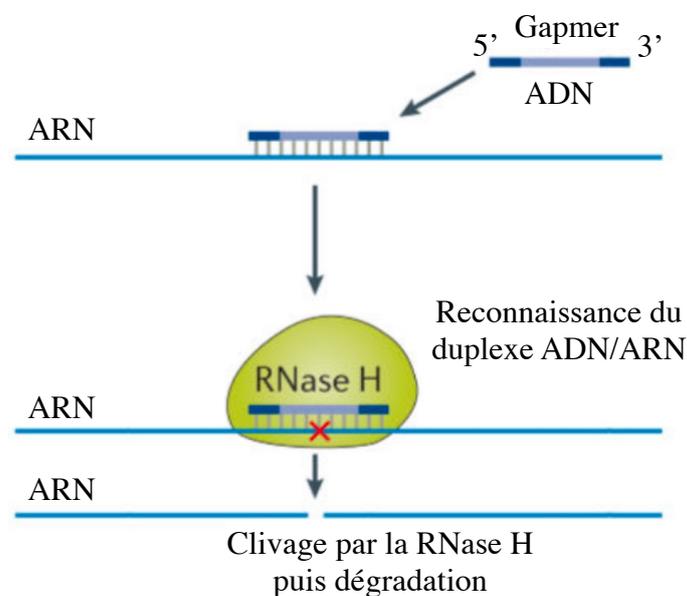


Figure 27 : Principe de dégradation spécifique des transcrits *DMPK* mutés à l'aide d'oligonucléotides antisens gapmer. Les gapmers sont des oligonucléotides antisens présentant une conformation spécifique caractérisée par la modification chimique au niveau de

leurs deux extrémités 5' et 3'. Ces modifications confèrent au gapmer une meilleure affinité pour les acides nucléiques et une résistance aux nucléases. La partie centrale du gapmer présente des déoxynucléotides non modifiés. Au moment de l'hybridation du gapmer sur sa séquence d'ARN cible, la présence de ces oligonucléotides centraux non modifiés permet la reconnaissance de l'hétéroduplex gapmer/ARNm par la nucléase RNase H et sa dégradation. (Adapté de Matsui and Corey, 2017)

Dans la DM1, et de façon comparable à l'utilisation des siRNA, des ASO-gapmers ont été spécifiquement développés pour reconnaître soit directement les répétitions CUG grâce à une séquence antisens (CAG)₇₋₉ (Lee et al. 2012; Manning et al. 2017), soit ciblant le transcrit muté *DMPK* (Jauvin et al. 2017; Nakamori, Gourdon, et Thornton 2011; Wheeler et al. 2012) ou le transcrit *HSA-CUGexp* (Wheeler et al. 2012) en amont ou en aval des répétitions CUG. Ces stratégies ont été testées sur plusieurs modèles murins de la DM1. Le traitement avec ces composés entraîne une diminution importante de 80% des transcrits *DMPK*, accompagnée d'une baisse de la quantité de *foci* dans les muscles squelettiques et dans le cœur des souris DM1, d'une correction des défauts d'épissage mesurés ainsi que de la myotonie (Jauvin et al. 2017; Overby et al. 2018; Yadava et al. 2020). De plus, des études du phénotype musculaire réalisées sur les modèles murins HSA^{LR} et DMSXL injectés par voie systémique conduisent respectivement à une amélioration de la myotonie (Wheeler et al. 2012), à une augmentation de la masse corporelle et une amélioration de la force musculaire (Jauvin et al. 2017). Il est important de noter que ces effets bénéfiques sont maintenus jusqu'à un an après la fin du traitement dans la souris HSA^{LR} (Wheeler et al. 2012). Cependant, la région ciblée par les ASO-gapmers est située en amont des répétitions et donc, dans un contexte humain, cible les deux transcrits *DMPK* induisant également une diminution importante du transcrit normal (Jauvin et al. 2017). Néanmoins, les résultats obtenus dans les souris KO pour le gène *DMPK* (Carrell et al. 2016; Reddy et al. 1996b) et les singes traités avec les ASO-gapmers (Pandey et al. 2015) montrent que l'absence de la protéine DMPK au cours du développement ou chez l'adulte n'a que peu d'impact sur l'organisme. Considérant ainsi une balance bénéfique/risque favorable, l'ASO-gapmer ISIS 486178 (de la compagnie IONIS) ciblant une séquence non répétée du transcrit *DMPK* humain a été testé dans un essai clinique de phase I/IIa sur une cohorte de 48 patients DM1 afin d'évaluer la tolérance, la sûreté et l'efficacité sur les marqueurs cliniques (NCT02312011). Malheureusement, la faible absorption cellulaire de cet ASO observée chez les patients DM1 n'a pas permis à cet essai d'atteindre une efficacité suffisante (Overby et al., 2018). Récemment, un nouvel essai clinique qui utilise une stratégie gapmer contre *DMPK* (dont la région ciblée est inconnue) couplée à un anticorps anti-TRF1 est mené par Dyne Therapeutics (NCT05481879) chez 64 patients DM1.

IV.1.4 Blocage de l'interaction ARN-protéine

L'utilisation d'outils thérapeutiques permettant la dégradation et la réduction de la quantité des transcrits mutés montre des effets thérapeutiques encourageants. Ces approches permettent une correction globale des dysfonctionnements moléculaires qui est accompagnée par la redistribution des protéines MBNL dans le noyau. Compte tenu de la très haute affinité de MBNL pour les répétitions, des approches thérapeutiques consistant à perturber la liaison délétère entre l'ARN-CUG et les protéines MBNL ont été proposées afin de restaurer les fonctions de MBNL. Plusieurs molécules pharmacologiques mais également des ASO sans activité RNase H, ont été développés pour empêcher la séquestration des protéines MBNL, ou délocaliser les protéines MBNL séquestrées.

IV.1.4.1 Blocage stérique des répétitions par l'utilisation de petites molécules

Plusieurs petites molécules pharmacologiques ont été identifiées par criblage sur la base de leur capacité inhibitrice de l'interaction des répétitions CUG avec les protéines MBNL. Parmi celles-ci, on peut trouver des molécules anti-cancéreuses (Daunorubicine), des molécules anti-parasitaires (Pentamidine) (Coonrod et al. 2013) ou des antibiotiques (Lomofungine et Érythromycine) (Nakamori et al. 2016). Pourtant, l'utilisation de certaines de ces molécules est très limitée en raison de leur toxicité élevée *in vivo* (Piotr Konieczny et al. 2017; Reddy et al. 2019). Des molécules dérivées de la Pentamidine (dont le mécanisme d'action est celui d'inhibition de la transcription de l'allèle *DMPK* muté et non de bloqueur stérique) ont été développées afin de pallier la toxicité de ces molécules. Certains de ces dérivés (4 sur 7) permettent une correction des défauts d'épissage des minigènes *INSR* et *TNNT2* dans un modèle cellulaire exprimant 960 triplets CUG. Parmi ces dérivés, l'Heptamidine montre une efficacité supérieure aux autres composés, permettant une amélioration des altérations d'épissage, notamment le canal chlore *Cln1*, associée à une abolition de la myotonie chez les souris HSA^{LR} suite au traitement intra-péritonéal (Coonrod et al. 2013). Une molécule semblable à la Pentaminide, la Furamidine, a été identifiée pour son affinité pour l'ARN muté avec une toxicité réduite *in cellulo*, sa capacité à relocaliser les protéines MBNL et à induire une réduction de l'ARN-CUG_{exp} dans la souris HSA^{LR} (Jenquin et al. 2018). De même, son administration sur le modèle HSA^{LR}, montre une correction partielle des transcrits *Atp2a1* et *Cln1* et une redistribution nucléaire de MBNL1 (Ruth B. Siboni et al. 2015). De par sa haute affinité pour les CUG, l'Érythromycine provoque la diminution d'une quantité de *foci* et une correction partielle des défauts d'épissage sur des fibroblastes issus de patients DM1.

L'administration systémique et orale sur le modèle murin HSA^{LR} induit toutefois une réduction de la myotonie, corrélée à la correction d'épissage du *Cncl1*, associée à une bonne tolérance préclinique (Nakamori et al. 2016). Au regard de ces résultats limités mais encourageants sur l'utilisation indépendante de ces deux molécules, un traitement combiné avec l'Érythromycine et la Furamidine a été testé sur le modèle HSA^{LR} (Jenquin et al. 2019). L'administration orale corrige partiellement la myotonie et montre une correction élevée du nombre de transcrits dérégulés dans ce modèle. Basé sur la capacité à inhiber la séquestration des protéines MBNL, le criblage de petites molécules chimiques a permis d'identifier des candidats pour le traitement de la DM1. Néanmoins, ces molécules, seules ou en combinaison, ne permettent qu'une amélioration partielle des défauts moléculaires spécifiques de la DM1. Cependant, l'Érythromycine est en cours d'essai clinique de phase II, sur 30 patients par l'université d'Osaka (jRCT2051190069s).

IV.1.4.2 Oligonucléotides Antisens (ASO) sans activité RNase H

Contrairement aux ASO-gapmer utilisés pour la dégradation de l'ARN ciblée, des ASO sans activité RNase H ont été conçus pour se lier spécifiquement aux séquences répétées CUG et se composent de répétitions CAG entièrement modifiées d'environ 15 à 30 nucléotides. Deux premières études ont utilisé des ASO de séquences répétées CAG et entièrement modifiés avec des chimies différentes (PMO ou 2'-OME, respectivement) dans des modèles murins de la DM1. Les modifications chimiques augmentent l'affinité pour l'ARN, les rendent résistants à la dégradation par les nucléases, évitant l'activation de la RNase H (Rinaldi et Wood 2018) (**Figure 28**). Ainsi, le traitement avec un PMO-CAG₂₅ permet un déplacement de MBNL1 séquestré dans les *foci* conduisant à la relocalisation de la protéine MBNL et à la restauration de son activité fonctionnelle (Wheeler et al. 2009).

Enfin, afin d'accroître leur pénétration dans les tissus et ainsi leur efficacité après un traitement systémique, ces ASO ont été conjugués à différents composés comme des groupements lipidiques, des anticorps ou encore des *cell-penetrating peptides* (Roberts, Langer, et Wood 2020). Par exemple, l'injection d'un CAG₇-ASO couplé à un peptide, le pip6a, par voie systémique dans le modèle HSA^{LR} a montré une correction complète de la myotonie et des défauts d'épissage 6 mois après traitement (Leger et al. 2013; Klein et al. 2019). Bien que ces ASO-CAGn ne soient pas destinés à induire la dégradation de l'ARN muté mais à empêcher la liaison délétère CUG/MBNL, leur utilisation a entraîné une réduction importante des ARN mutés dans les cellules DM1 (González-Barriga et al. 2013; Mulders et al. 2009) et dans les modèles murins de la DM1 (Mulders et al. 2009; Wheeler et al. 2009) et ce, sans activer les

liaison à l'ARN. Quelle que soit l'approche utilisée, la correction des défauts moléculaires et phénotypiques spécifiques de la DM1 observée dans les différents modèles est toujours corrélée à une redistribution des protéines MBNL fonctionnelles dans le noyau des cellules. Ainsi, le développement d'approches thérapeutiques a donc été proposé pour cibler les acteurs secondaires de la DM1 à savoir la dérégulation des protéines MBNL et CELF1.

IV.1.5.1 Dérégulation des protéines CELF

Les protéines CELF sont des protéines impliquées dans la régulation du métabolisme de certains ARN et participent à la splicéopathie observée dans la DM1. Dans la maladie, les niveaux de la protéine CELF1 sont augmentés. Cette dérégulation de CELF1 est liée entre autres à son hyperphosphorylation initiée par la kinase PKC. Ainsi, plusieurs approches visant à cibler les voies de signalisation activées en aval de l'expression des CUG, en particulier PKC et GSK3 β , ont été testées.

IV.1.5.1.1 Inhibiteurs pharmacologiques de kinases intracellulaires

L'utilisation de composés inhibiteurs de la kinase PKC administrés chez les souris EpA960 tel que Ro-31-8220 a conduit à la normalisation des niveaux de protéines CELF1. La diminution de la quantité des protéines CELF1 induit la correction des défauts d'épissage dépendant de CELF1 tel que l'exon 21 du transcrite *Ank2*, suivie de l'amélioration du phénotype cardiaque et de la survie des souris (Wang et al. 2009). Cette molécule a également été identifiée au cours d'un criblage de molécules capables d'inhiber la formation de *foci* dans une lignée de fibroblastes de patients DM1. En plus de sa capacité à inhiber la formation de *foci*, cette molécule permet une diminution des protéines CELF1. Toutefois, il a été montré que le mécanisme d'action impliqué était indépendant de l'inhibition de la protéine PKC, mais proviendrait de l'inhibition de kinases complémentaires telle que GSK3 β (Davies et al. 2000). Malgré l'amélioration sensible des quantités de protéines CELF1, la molécule Ro-31-8220 ne permet qu'une faible correction des défauts d'épissage de *INSR* et de *ATP2A1* (Ketley et al. 2014).

IV.1.5.1.2 Inhibiteurs pharmacologiques de la kinase GSK3B

Plusieurs inhibiteurs de la voie GSK3 β ont été testés comme approches thérapeutiques afin d'équilibrer le niveau des protéines CELF. Notamment, l'utilisation du TDZD-8 (4-benzyl-2-méthyl-1,2,4-thiadiazolidine-3,5-dione) et du lithium entraînent une amélioration de la

myotonie et de la force musculaire des souris HSA^{LR} traitées (Jones et al. 2012). Une autre molécule inhibitrice de la kinase GSK3 β , le 6-bromoindirubin-3'-oxime (BIO), administrée sur des souris HSA^{LR}, permet la correction pratiquement complète de la quantité de la kinase GSK3 β , avec un effet persistant sur un an, mais également une amélioration importante de la myopathie et de la force musculaire (Wei et al., 2018). L'utilisation du Tideglusib (TG) (4-Benzyl-2-(naphthalen-1-yl)-1,2,4-thiadiazolidine-3,5-dione), a montré sa capacité à diminuer la quantité de protéines GSK3 β amenant à une normalisation des quantités des protéines CELF1 dans des cellules musculaires de patients DM1 et dans les tissus musculaires des souris traitées des modèles HSA^{LR} et DMSXL. Une diminution du transcrit muté a aussi été observée, associée à une diminution du nombre de *foci*, à une amélioration de la force musculaire pour les HSA^{LR} et de la myopathie pour souris HSA^{LR} et DMSXL. Des effets du TG sont également observés dans le système nerveux central des souris DMSXL traitées avec une correction de défauts d'épissage mais également une amélioration de la survie postnatale, la croissance et l'activité neuromotrice des souris DMSXL (Wang et al. 2019). Au regard de ces résultats prometteurs, le TG est actuellement évalué dans une étude clinique de phase II incluant 16 patients DM1 atteints des formes congénitale et juvénile (ClinicalTrials.gov : NCT02858908) (M. Wang et al., 2019).

IV.1.5.2 Augmentation thérapeutique de la quantité de protéine MBNL

Décrites précédemment, les protéines de la famille MBNL sont impliquées dans la maturation de plusieurs transcrits et jouent un rôle central dans la pathologie. La perte de fonction des protéines MBNL1 est impliquée dans l'altération de la biogénèse de certain miR ainsi que dans la localisation, la polyadénylation et l'épissage alternatif des ARN messagers. Les différentes stratégies développées provoquant la réduction des ARN toxiques ont pour but de libérer les protéines MBNL1 et de restaurer leurs fonctions. Une stratégie simple consiste à restaurer les niveaux fonctionnels de MBNL1 soit par sa surexpression directe, soit en modulant l'abondance des protéines MBNL endogènes par l'utilisation de modificateurs d'expression génique.

IV.1.5.2.1 Surexpression exogène des protéines MBNL1

Le remplacement de protéines par l'apport exogène via la thérapie génique est une approche qui a montré son efficacité dans plusieurs pathologies telles que la maladie de Duchenne ou l'Amyotrophie Spinale (Aguti, Malerba, et Zhou 2018). Dans le cas de la DM1, la surexpression de MBNL1 par injection locale de vecteur rAAV1-MBNL1 (recombinant Adenovirus Associated Virus) dans le modèle murin HSA^{LR} a montré une correction partielle des défauts

d'épissage testés. Parmi ces transcrits, la correction du transcrit murin du canal chlore *Cln1*, conduit à une normalisation de la myotonie. Cependant, aucun signe d'amélioration de l'histopathologie musculaire n'a été observé (Kanadia et al. 2006). De plus, le croisement d'une souris surexprimant MBNL1 dans le muscle squelettique avec une souris HSA^{LR} montre une correction efficace des défauts, associée à une abolition de la myotonie dans plusieurs muscles testés. La surexpression de MBNL1 à l'état embryonnaire permettrait de prévenir la mise en place de la myopathie, puisqu'il a été observé une réduction importante de fibres nécrotiques ou de fibres présentant des noyaux internalisés (Chamberlain et Ranum 2012). En revanche, des résultats contradictoires obtenus dans une étude de surexpression dans un modèle murin portant 200 répétitions CTG inductibles montrent que la surexpression de MBNL1 n'est pas suffisante pour inverser les phénotypes DM1 tels que la myotonie ou les anomalies de la conduction cardiaque. Corrélée à l'absence d'amélioration phénotypique, la correction des épissages alternatifs aberrants reste mineure. Pire, une surexpression exogène trop importante de MBNL1 aggraverait même la pathologie musculaire caractérisée alors par une réduction de la taille des fibres et une augmentation de la quantité de fibres présentant des noyaux centralisés (Yadava et al. 2019).

IV.1.5.2.2 Augmentation de l'expression endogène de MBNL

Le concept thérapeutique d'augmentation de la quantité de protéines MBNL basé sur l'étude de l'expression des gènes *MBNL* a permis d'identifier, par exemple, l'implication de miR endogènes dans la régulation de leur expression. Ces différents mécanismes sont donc des cibles potentielles thérapeutiques pour accroître les quantités de protéines MBNL endogènes et restaurer une activité MBNL1 dans les cellules DM1. Des approches visant à augmenter le niveau de MBNL endogène en ciblant les miARN ou par utilisation de molécules chimiques permettent une modulation de l'expression des protéines MBNL.

IV.1.5.2.2.1 Inhibition des miR anti-MBNL1

Une étude réalisée dans un modèle sauvage de drosophile a démontré l'implication de miR dans la régulation des transcrits des protéines MBNL. Particulièrement, les miR-277 et miR-304 endogènes induisent la diminution de la quantité de protéines MBNL dans les muscles des mouches (Cerro-Herreros et al. 2016). Des oligonucléotides antisens (ASO) complémentaires agissant comme des « éponges » sur ces miR ont donc été conçues dans le but de les neutraliser et d'induire l'augmentation des protéines MBNL1 (**Figure 29**)

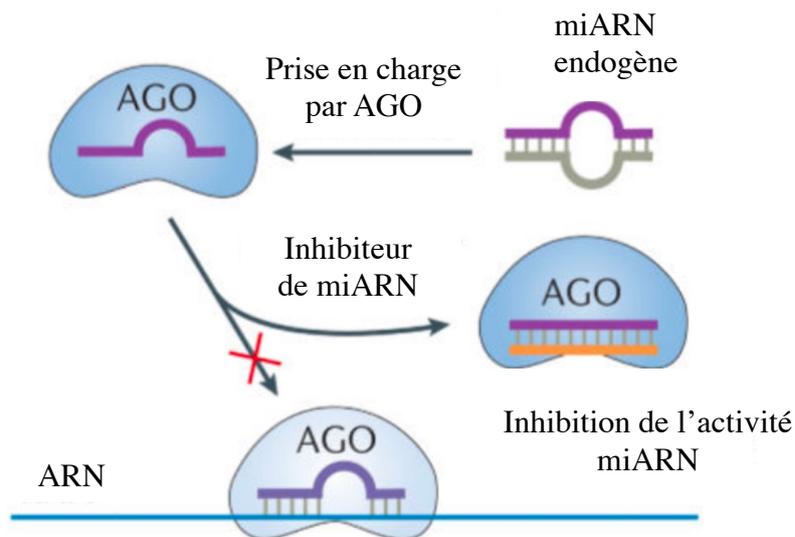


Figure 29 : Principe de neutralisation d'un miR (miARN) endogène à l'aide d'une séquence complémentaire inhibitrice spécifique (antagomiR ou éponge à miR). L'interaction entre l'antagomiR et le miR empêche ce dernier d'exercer sa fonction inhibitrice en association avec la protéine argonaute (AGO) au niveau de son transcrite cible. (Adapté de Matsui and Corey, 2017)

Ainsi, ces « éponges » ont permis une augmentation des quantités de protéines MBNL endogènes dans des drosophiles sauvages. Leur utilisation dans un modèle de drosophile exprimant un transgène avec 480 répétitions CUG interrompues a permis une amélioration de la myopathie et la survie des mouches adultes DM1 (Cerro-Herreros et al. 2016). Les miR-23b et miR-218 ont été identifiés comme des modulateurs de l'expression des protéines humaines MBNL1 et MBNL2 dans une lignée cellulaire tumorale humaine. L'utilisation d'ASO complémentaires de ces deux miR (antagomiR) a permis une augmentation entre 2 et 4 fois du niveau de protéines MBNL1 et MBNL2 dans des cellules musculaires de patients DM1 et environ 2 à 3 fois dans le tissu musculaire du modèle murin HSA^{LR} (Cerro-Herreros et al. 2016, 2020). L'augmentation de ces protéines est accompagnée d'une correction légère des défauts d'épissage et est corrélée à une réversion partielle de la myotonie. Quatre jours après administration de ces antagomiR par voie systémique, les auteurs observent une diminution du pourcentage de fibres présentant des noyaux internalisés (Cerro-Herreros et al. 2018). Par conséquent, l'identification des répresseurs de miARN de tous les paralogs MBNL pourrait être très prometteuse comme future cible thérapeutique afin de restaurer des niveaux de protéines adéquats. Néanmoins et de façon comparable à l'utilisation des ASO gapmer ou d'encombrement stérique, les propriétés pharmacologiques de ces antagomiR montrent de

faibles biodistributions et absorptions cellulaires (Rinaldi et Wood 2018). De plus, un miR possède généralement plusieurs centaines de transcrits cibles. L'utilisation d'antagomiR agissant comme des séquences « éponges » induisant la neutralisation d'un miR spécifique peut alors conduire à une dérégulation indésirable de ces transcrits (López Castel, Overby, et Artero 2019). Par conséquent, l'utilisation de molécules pharmacologiques approuvées et utilisées dans d'autres pathologies a été investiguée dans un objectif similaire d'accroître la quantité des protéines MBNL endogènes fonctionnelles.

IV.1.5.2.2.2 Modulation pharmacologique de l'expression de MBNL

Le criblage de différentes banques de molécules a été réalisé dans le but d'identifier des composés capables d'augmenter la quantité de MBNL endogène. Parmi ces molécules, des inhibiteurs d'histones désacétylases (HDAC), tels que le Vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid ou SAHA), ISOX (5methylisoxazole-3-carboxylic acid) et l'anti-inflammatoire non stéroïdien, le phénylbutazone (ou PDZ) (4-butyl-1,2-diphénylpyrazolidine-3,5-dione) ont montré une augmentation d'environ 2 fois la quantité des protéines MBNL, corrigeant partiellement les défauts d'épissage testés dans différents modèles cellulaires (Zhang et al. 2017) et le modèle murin HSA^{LR} (Chen et al. 2016). Alors que les inhibiteurs HDAC semblent avoir un impact minime en réduisant l'intensité des *foci*, l'anti-inflammatoire PDZ empêche l'interaction protéines MBNL-CUG basée sur l'observation de la diminution de la colocalisation des protéines MBNL1 avec les *foci* (Chen et al. 2016; Zhang et al. 2017). Cependant, l'utilisation clinique des inhibiteurs de HDAC pourrait être problématique car ces molécules induisent également l'arrêt du cycle cellulaire, l'inhibition de la réparation de l'ADN ou encore l'apoptose (Manal et al., 2016).

IV.1.6 Cibler les effets en aval

Parmi les différentes stratégies thérapeutiques développées pour la DM, certaines se limitent à corriger un symptôme ou un mécanisme altéré dans cette pathologie. Plus spécifiquement, ces stratégies visent le défaut d'épissage du canal chlore responsable de la myotonie ou la dérégulation de l'autophagie liée à l'atrophie musculaire chez les patients DM.

IV.1.6.1 Correction spécifique de défauts d'épissage du canal chlore CLCN1

Traiter certains effets de la maladie et non la cause est une approche alternative envisageable pour la DM. Considérant la DM comme une pathologie induite par des défauts d'épissage

directement liés aux signes cliniques de la maladie, cibler spécifiquement ces transcrits anormaux pourrait améliorer individuellement les caractéristiques de la maladie. Ainsi l'altération d'épissage de la protéine membranaire canal chlore *CLCN1* induite par la dérégulation des protéines *MBNL* et *CELF1*, a pour conséquence l'apparition de la myotonie chez les patients. Plusieurs approches ont été testées pour atteindre cet objectif. La première des stratégies consiste à cibler directement l'exon 7a au niveau du pré-ARN de *CLCN1*. Cet exon présente un codon stop qui est anormalement inclus en présence du *DMPK* muté, provoquant l'absence de protéine *CLCN1* fonctionnelle localisée aux membranes de la fibre. Un oligonucléotide antisens (ASO) morpholino dirigé contre l'exon 7a a ainsi été injecté intramusculairement chez la souris *HSA^{LR}*. Cet ASO a pour but d'empêcher l'inclusion anormale de l'exon 7a en masquant l'accès de la machinerie d'épissage au site d'épissage 3' du pré-ARN messager de l'exon 7a (**Figure 30**). Ainsi, une exclusion efficace de cet exon permet la restauration de la production de protéines fonctionnelles relocalisées au niveau membranaire conduisant à l'abolition de la myotonie. Néanmoins, la pénétration étant réduite, l'administration de l'ASO nécessite une perméabilisation tissulaire par électroporation rendant l'approche efficace localement (Wheeler et al. 2007). De plus les ASO sont caractérisés par une élimination rapide de l'organisme (Rinaldi et Wood 2018). La seconde approche a été d'identifier par criblage à partir d'une banque de 472 molécules pharmacologiques, un composé pouvant corriger spécifiquement le défaut d'épissage du canal chlore *CLCN1 in vitro*. L'antibiotique Manumycin A a été identifié comme candidat pouvant moduler uniquement le défaut d'épissage de *Clcn1* dans le modèle *HSA^{LR}*. Toutefois, le mécanisme conduisant à cette modification n'est actuellement pas connu.

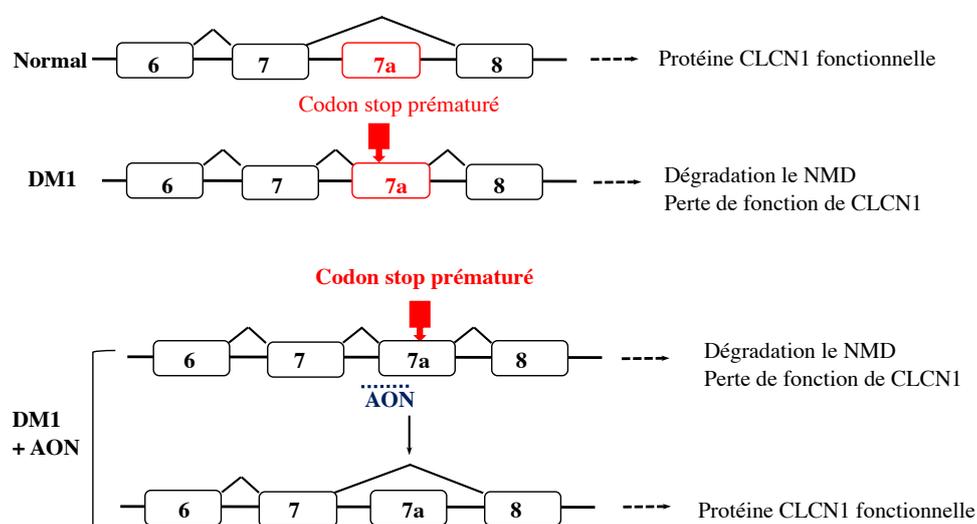


Figure 30 : Stratégie utilisant des oligonucléotides antisens (ASO) pour corriger l'épissage alternatif du canal chlore *CLCN1*. Un ASO dirigé contre les sites de régulation de l'épissage de l'exon 7a de *CLCN1* permet d'empêcher l'inclusion de cet exon dans une cellule DM1 et ainsi restaure la production d'une protéine fonctionnelle (Adapté de Wheeler et al. 2007)

IV.1.6.2 Correction spécifique de l'autophagie cellulaire responsable de l'atrophie musculaire

En plus de la faiblesse musculaire, l'atrophie musculaire est à l'origine de la majorité des décès prématurés des patients en raison d'insuffisances respiratoires. L'atrophie observée chez les patients pourrait s'expliquer par une dérégulation de la voie de l'autophagie résultant de la présence de transcrits *DMPK* mutés. Une étude de la physiologie de la DM1 révèle une dérégulation des éléments de contrôle de l'autophagie cellulaire comme la diminution de la quantité de miR-7 (Sabater-Arcis et al. 2020) ou l'altération des voies de signalisation AMPK/mTOR (Brockhoff et al. 2017). Les options thérapeutiques développées consistent donc à normaliser ces régulateurs de l'autophagie.

Ainsi, une réduction de miR-7 est retrouvée dans un modèle de drosophile DM1 et dans des biopsies musculaires de patients (Fernandez-Costa et al. 2013). L'utilisation d'une séquence nucléotidique similaire au miR-7 (agomiR) conduit à la normalisation des protéines régulatrices de l'autophagie ATG4A ou ATG7. Cette normalisation conduit à une correction de l'hyperactivation de l'autophagie puis une amélioration de la différenciation cellulaire de cellules musculaires de patients DM1 (Sabater-Arcis et al. 2020). La voie AMPK est également nettement réprimée dans le modèle de souris HSA^{LR} et dans des myoblastes dérivés de patients DM1. L'activation pharmacologique chronique de la signalisation AMPK chez les souris DM1 avec AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside) a de multiples effets bénéfiques sur le phénotype DM1. Notamment, le traitement avec AICAR dans des modèles murins et cellulaires de la DM1, améliore l'histologie musculaire et corrige plusieurs événements associés à la toxicité de l'ARN muté tels qu'une diminution du nombre de *foci*, une correction du défaut d'épissage du canal chlore *Clcn1* (Ravel-Chapuis et al. 2018) et une abolition de la myotonie (Brockhoff et al. 2017). L'hyperactivation de la voie AMPK via l'administration chronique de AICAR présente des effets positifs dans la DM1. Cependant il a été rapporté que l'hyperactivation d'AMPK induit également une toxicité neuronale observée chez les patients atteints de la maladie Huntington (Ju et al. 2011). Récemment, l'utilisation de la chloroquine, connue comme un bloqueur de l'autophagie, a montré une amélioration modeste de la dérégulation de l'épissage alternatif dans les cellules musculaires de patients DM1 et des

caractéristiques fonctionnelles dans le modèle murin HSA^{LR}. Ces améliorations sont le résultat d'une diminution de la dégradation autophagique des protéines MBNL1 (Bargiela et al. 2019). Néanmoins, l'utilisation répétée de la chloroquine est associée à des troubles du rythme cardiaque potentiellement graves. Cet effet secondaire délétère non négligeable se rajouterait alors aux troubles cardiaques déjà observés chez les patients atteints de DM1.

L'inhibition directe de l'autophagie ou de sa régulation conduit à des améliorations de certains aspects de la pathologie tels que la réduction du nombre de *foci* ou une normalisation partielle de certains défauts d'épissage. Cependant, ces différentes options thérapeutiques présentent des effets secondaires limitant leur potentielle utilisation pour le traitement de patients. En conséquence, de nouvelles options thérapeutiques alternatives sont nécessaires pour espérer atteindre une meilleure efficacité thérapeutique.

Conclusion

Les différentes études publiées montrent l'intérêt de cibler le gène *DMPK* contenant les CUG, soit en dégradant l'ARN muté directement, soit en bloquant l'interaction délétère entre les ARN mutés et les protéines MBNL1. Les ASO remplissent en partie ces fonctions mais la faible efficacité de pénétration tissulaire limite les effets chez les patients. Certaines molécules chimiques remplissent également les fonctions de bloqueurs ou d'inhibiteurs de l'expression mais leur utilisation à long terme pourrait devenir toxique. Néanmoins, ces études précliniques montrent que cibler l'interaction de MBNL avec les CUG permet de libérer les protéines MBNL1 des *foci*, de restaurer leur activité d'épissage et de corriger la myotonie dans le modèle murin HSA^{LR}.

Objectifs

Problématiques et objectifs du travail de thèse

La dystrophie myotonique de type 1 est une maladie multisystémique qui touche principalement le système nerveux central, le cœur et les muscles. Plusieurs années après l'identification de la mutation, et le développement d'approches thérapeutiques aucun traitement curatif n'est disponible à ce jour. Toutefois, de nombreux modèles *in vivo* et *in vitro* ont été développés et utilisés comme outils pour confirmer le rôle des répétitions CUG dans la DM. Ces différents modèles présentent plusieurs caractéristiques associées à la pathologie comme la formation de *foci*, la séquestration des protéines MBNL et les défauts d'épissage. Cependant, aucun modèle ne récapitule de manière complète le mécanisme physiopathologique de manière idéale. Il existe donc toujours un besoin de modèles cellulaires pertinents pour comprendre les mécanismes moléculaires et pour évaluer l'efficacité des approches thérapeutiques. En raison de ces besoins dans la DM, mon travail de thèse a reposé sur deux objectifs. Premièrement, le développement et la caractérisation de modèles de cellules musculaires immortalisées issues de patients atteints de DM1. Le second objectif a été de développer et d'évaluer une nouvelle stratégie de thérapie génique pour la DM dans ces modèles cellulaires et dans un modèle murin de la maladie.

Développement de lignées musculaires humaines immortalisées de la dystrophie myotonique pour l'évaluation d'approches thérapeutiques.

Le but de ce travail a été de développer et de caractériser de nouveaux modèles cellulaires stables à partir de tissus musculaires issus d'un patient atteint de DM et d'un individu sain. Afin d'évaluer la fiabilité de ces modèles cellulaires pour l'évaluation *in vitro* des effets des composés thérapeutiques, une preuve de concept a été réalisée en utilisant deux approches antisens associées à une analyse transcriptomique. L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude ont donné lieu à la publication de l'article «Immortalized human myotonic dystrophy muscle cell lines to assess therapeutic compounds» dans le journal *Disease Model and Mechanisms* dont je suis premier auteur (Arandel et al. 2017).

Développement et évaluation d'une approche de thérapie génique basée sur une stratégie de leurre.

Le but de ce travail a été de conceptualiser et de valider une approche de thérapie génique basée sur l'utilisation d'une protéine de liaison à l'ARN MBNL1 modifiée. La preuve de concept a

été réalisée en utilisant cette stratégie de leurre dans des cellules humaines immortalisées puis sur un modèle murin de la DM1 par l'administration d'un vecteur viral. Nous nous sommes intéressés à déterminer à la fois le mécanisme d'action et le potentiel thérapeutique de cet outil à inverser les phénotypes DM associés. Ces travaux ont amené à un dépôt de brevet en 2015 (Treatment for Myotonic Dystrophy, PCT/EP2015/ 058111) et à la publication de l'article « Decoy gene therapy based on engineered expanded-repeat binding protein prevents RNA toxicity in Myotonic Dystrophy » dans le journal *Nature Biomedical Engineering* dont je suis premier auteur (Arandel et al. 2022).

Matériel et méthodes

Culture cellulaire

Les biopsies musculaires et cutanées ont été obtenues auprès de la banque de tissus MyoBank-AFM pour la recherche, partenaire du réseau européen EuroBioBank, conformément à la recommandation européenne et à la législation française. Les biopsies musculaires ont été obtenues à partir du muscle semi-tendineux d'un homme de 25 ans non atteint (Ctrl), d'un muscle quadriceps d'une patiente de 53 ans atteinte de DM2 (4000 CCTG dans le muscle) et d'un muscle gastrocnémien d'une patiente de 11 ans atteinte d'une forme infantile de DM1 (1300 CTG dans le sang, 2600 CTG dans les cellules musculaires). Les cellules primaires ont été isolées à partir des biopsies comme décrit précédemment (Chaouch et al. 2009; Mouly et al. 1993). Les myoblastes sont cultivés dans un milieu de prolifération composé d'un mélange de milieu 199/DMEM (rapport 1/4 ; Life Technologies) complété par 20% de FBS (Life Technologies), 50 µg/mL de gentamycine (Life Technologies), 25 µg/mL de Fetuin, 0,5 ng/mL de bFGF, 5 ng/mL d'EGF et 0,2 µg/mL de dexaméthasone (Sigma-Aldrich). Les fibroblastes immortalisés MyoD-inductibles sont cultivés dans un milieu de croissance DMEM complété par 10% de FBS et 50 µg/mL de gentamycine. La différenciation myogénique est induite par le changement du milieu de culture des cellules confluentes en milieu DMEM complété par 5 µg/mL d'insuline pour les myoblastes, et un supplément de 4 µg/mL de doxycycline (Sigma-Aldrich) pour les fibroblastes immortalisés MyoD-inductibles. Pour la mise en place des lignées musculaires stables exprimant les constructions GFP-MBNL1 ou GFP-MBNL1Δ, les myoblastes humains immortalisés dérivés de l'individu sain et du patient DM1 ont été transduits avec des vecteurs lentiviraux Tet-On GFP-MBNL1 ou GFP-MBNL1Δ et sélectionnés en présence d'Hygromycine (1 µg/mL, Life Technologies) pendant une semaine. L'induction des constructions conditionnelles Tet-On GFP-MBNL1Δ ou Tet-On GFP-MBNL1 est réalisée en ajoutant de la doxycycline (4 µg/mL, Sigma-Aldrich) au milieu de culture cellulaire. Pour les expériences d'extinction de gènes, les cellules musculaires différenciées ont été transfectées par un mélange de siRNA (Eurogentec) dirigés contre les ARNm MBNL1 et MBNL2 (siRNA MBNL1 : 5'-CAG-ACA-GAC-UUG-AGG-UAU-G-3', siRNA MBNL2 : 5'-GAA-GAG-UAA-UUG-CCU-GCU-UUU-3) en utilisant le réactif Lipofectamine RNAi Max (Life Technologies) comme décrit précédemment (Laurent et al. 2012). Pour les expériences utilisant les minigènes, des cellules HeLa (ECACC 93021013) ont été cultivées jusqu'à 70% de confluence et co-transfectées avec 1 µg de plasmide exprimant les minigènes, 1 µg de plasmide

DT960 et 3 µg de plasmide GFP, GFP-MBNL1 ou GFP-MBNL1Δ en utilisant le réactif de transfection FuGENE HD (Roche Diagnostics) selon les instructions du fabricant.

Immortalisation des myoblastes et des fibroblastes primaires

Les processus d'immortalisation et de sélection ont été effectués comme décrit précédemment par la plateforme Myololine du Centre de Recherche en Myologie (Chaouch et al. 2009; Mamchaoui, Trollet, Bigot, Negroni, Chaouch, Wolff, Kandalla, Marie, Di Santo, J. St Guily, et al. 2011). Brièvement, les ADN complémentaires *hTERT* et *Cdk4* ont été clonés dans différents vecteurs lentiviraux contenant respectivement des marqueurs de sélection de puromycine et de néomycine. Les myoblastes ont été transduits avec des vecteurs lentiviraux exprimant *hTERT* et *Cdk4* tandis que les fibroblastes ont été transduits avec un vecteur exprimant seulement *hTERT*, avec une MOI (multiplicity of infection) de 3-5 en présence de 4 µg/ml de polybrène (Sigma-Aldrich). Les cultures cellulaires transduites ont été sélectionnées avec de la puromycine (0,2 µg/mL) et/ou de la néomycine (0,3 mg/mL) pendant 8 jours. Les cellules transduites ont été ensemencées à densité clonale et des clones individuels sélectionnés ont été isolés de chaque population. Pour l'expression conditionnelle de MyoD, les fibroblastes immortalisés ont été transduits avec des vecteurs lentiviraux exprimant l'ADNc MyoD murin sous le contrôle d'une construction inductible Tet-on (Barde et al. 2006).

Clonage MBNL1Δ

La construction MBNL1Δ qui contient les acides aminés 1 à 269 de MBNL1 est marquée par la GFP puis clonée dans un vecteur lentiviral Tet-On contenant une cassette de sélection à l'Hygromycine (Chaouch et al. 2009). Les vecteurs lentiviraux ont été produits comme décrit précédemment (François et al. 2011) par la plateforme Myovector du Centre de Recherche en Myologie. Pour le transfert de gènes *in vivo*, les constructions MBNL1Δ marquées par GFP ou par V5, MBNL2Δ marquées par GFP contenant les acides aminés 1 à 271 de MBNL2, GFP et MBNL1 marquées par GFP (isoforme 41 kDa) ont été clonées en aval du promoteur du cytomégalovirus (CMV) dans un plasmide pSMD2, permettant la production de vecteurs viraux. Brièvement, les vecteurs AAV9 ont été préparés par la tri-transfection du plasmide pSMD2 contenant la construction sélectionnée décrite ci-dessus, le plasmide pXX6 codant pour les séquences virales essentielles à la production d'AAV et le plasmide codant pour la capsid du sérotype 9 dans des cellules 293 en utilisant le réactif de transfection polyéthylèneimine (PEI). Les particules virales ont été purifiées sur gradient d'iodixanol et concentrées sur des colonnes Amicon Ultra-15 100 K (Merck-Millipore). Chaque vecteur AAV a été titré en

génomés viraux (vg) par mL par PCR quantitative en temps réel (qPCR) comme décrit par ailleurs (Moulay et al. 2020). Les plasmides pGEX-6P1-MBNL1 (isoforme de 40 kDa) et pGEX-MBNL Δ ont été décrits précédemment (Tran et al. 2011). La construction MBNL1 doublement marquée avec une GST en N-terminal et un 5xHis-tag en C-terminal a été construite par réaction PCR inverse avec des amorces : 5'-TAG-CTC-GAG-CGG-CCG-CAT-CGT-3' et 5'-GTG-ATG-GTG-ATG-GTG-ATG-CAT-CTG-GGT-AAC-ATA-CTT-GT3', en utilisant le plasmide pGEX-6P1-MBNL1 comme modèle. Des minigènes exprimant soit l'exon 5 de la troponine T cardiaque (*cTNT*) (Cooper 1998) ou l'exon 11 du récepteur de l'insuline (*INSR*) (Savkur et al. 2001) et le plasmide DT960 (*DMPK* contenant 960 répétitions CTG interrompues dans le 3' UTR (don de T. Cooper)) ont été utilisés dans les expériences de co-transfections.

Traitement des cellules immortalisées par approches antisens

Pour l'expression des séquences antisens hU7-(CAG)₁₅, les myoblastes DM1 immortalisés ont été transduits par 1x10⁷ vg/mL de vecteurs lentiviraux exprimant la construction hU7-(CAG)₁₅ décrite précédemment (François et al. 2011). La transduction a été effectuée deux fois pendant 4 heures en présence de 4 μ g/mL de polybrène (Sigma-Aldrich) et les cellules transduites ont été cultivées au moins une semaine avant la différenciation et/ou les analyses. Pour le traitement par utilisation d'ASO, les myoblastes immortalisés DM1 ou les fibroblastes MyoD-convertibles DM1 ont été transfectés après 4 jours de différenciation avec 2 μ g/mL de 2-OMe-PT-(CAG)₇ ASOs en utilisant le réactif de transfection RNAi Max (Life Technologies) selon le protocole du fabricant. Les cellules ont été récoltées pour analyse 24 heures après la transfection.

Hybridation fluorescente *in situ* (FISH) et immunofluorescence (IF) :

Les expériences de FISH ont été réalisées comme décrit précédemment (François et al. 2011) à l'aide d'une sonde 2'OMe (CAG)₇ marquée au Cy3. Pour les expériences de mesure d'index de fusion, les immunofluorescences (IF) ont été réalisées comme décrit précédemment (Klein et al. 2008) à l'aide d'un anticorps anti-desmine (clone D33 1/50, DAKO). Les images ont été prises à l'aide d'un microscope Olympus BX60 et du logiciel Metamorph (Molecular Devices), et traitées avec le logiciel Adobe Photoshop (Adobe System Inc.). L'indice de fusion des cultures de cellules musculaires différenciées a été calculé en pourcentage des noyaux à l'intérieur des myotubes (>2 noyaux) par rapport au nombre total de noyaux dans les cellules positives à la desmine. Pour les études de détection de MBNL1 Δ et de MBNL1 dans les *foci*,

des expériences combinées de FISH-immunofluorescence (FISH/IF) ont été réalisées en utilisant une sonde 2'OMe (CAG)₇ marquée au Cy3 et les anticorps suivants : un anticorps polyclonal anti-GFP conjugué Alexa 488 (A-21311, Life Technologies, 1:200) pour la détection de GFP-MBNL1Δ ou un anticorps polyclonal anti-MBNL1 (A2764, don de C. A.Thornton, 1:1 000), suivi d'un anticorps secondaire anti-lapin de chèvre conjugué à Alexa Fluor 647 (A-11029, Life Technologies, 1:500) pour la détection de MBNL1 endogène. Brièvement, avant la fixation avec une solution de paraformaldéhyde à 4%, les cellules différenciées et cultivées sur des lamelles en verre recouvertes de gélatine ont été perméabilisées dans un tampon CytoSkeletal (Byron, Hall, et Lawrence 2013; Klein et al. 2020) composé de : 100 mM NaCl, 300 mM saccharose, 10 mM pipérazine-N,N'bis[acide 2-éthanesulfonique], pH 6,8, 3 mM MgCl₂, pendant 3 min sur glace (4°C). Pour les expériences de quantification du nombre de *foci* et l'intensité de MBNL1, les images ont été acquises à l'aide d'un microscope Nikon Ti2 équipé d'une platine motorisée et d'une tête à disque rotatif CSU-W1 (Yokogawa) couplée à une caméra Prime 95 sCMOS (Photometrics). Les analyses du nombre, de la forme des *foci* et de l'intensité du signal MBNL1 ont été réalisées à l'aide du logiciel Fiji et de scripts personnalisés utilisant le plugin 3D Object Counter. La valeur de MBNL1 séquestrée a été calculée par le volume de chaque *foci* multiplié par l'intensité moyenne du signal MBNL1 endogène dans les *foci* et par le nombre moyen de *foci* par noyau.

Extraction de l'ARN, PCR par transcription inverse (RT-PCR) et RT-qPCR quantitative.

Les ARN totaux ont été isolés à partir des cellules à l'aide du réactif TRI-Reagent (Sigma-Aldrich) selon le protocole du fabricant. Les tissus musculaires ont été lysés à l'aide du système Fastprep et des tubes Lysing Matrix D (MP Biomedicals). Ensuite, 1 µg d'ARN a été rétrotranscrit à l'aide du système M-MLV (Life Technologies) dans un volume final de 20 µL. Un microlitre de solution d'ADN complémentaire a ensuite été utilisé dans une analyse PCR semi-quantitative selon un protocole standard (ReddyMix, ThermoFisher). L'amplification par PCR a été réalisée pendant 18 cycles pour la détection de GFP- ou V5-MBNL1Δ, et 30-35 cycles pour l'épissage du pré-ARNm. Les produits de PCR ont été quantifiés soit avec le logiciel ImageJ, soit à l'aide du système QIAxcel Advanced (Qiagen). Le ratio d'inclusion d'exon (Psi) a été quantifié en pourcentage d'inclusion par rapport à l'intensité totale des signaux des isoformes. L'indice composite d'épissage a été calculé comme la moyenne des corrections de chaque transcrit évalué pour chaque souris, en considérant les valeurs Psi moyennes WT comme maximales et les valeurs Psi moyennes HSA^{LR} non traitées comme minimales. Pour

quantifier l'expression de l'ARNm *HSA*, la PCR en temps réel a été réalisée à l'aide d'un LC480 (Roche). Les réactions ont été réalisées avec le kit SYBR Green (Roche) selon les instructions du fabricant. Les cycles de PCR en temps réel comprenaient une étape de dénaturation de 15 minutes, suivie de 50 cycles avec une dénaturation à 94°C pendant 15 s, une hybridation à 58°C pendant 20 s et une élongation à 72°C pendant 20 s. L'ARNm *Rrlp0* de souris a été utilisé comme standard. Les données ont été analysées avec le logiciel d'analyse LC480. Toutes les amorces sont décrites en Annexe 1.

Production et purification des protéines recombinantes

Les protéines recombinantes GST-MBNL1-His isoforme 40 et GST-MBNL1 Δ ont été exprimées dans *Escherichia coli* BL21 (DE3) par induction avec 1 mM d'isopropyl- β -D-thiogalactoside pendant 3h à 25°C. Après induction, les culots cellulaires ont été extraits avec le réactif d'extraction des protéines bactériennes complètes B-PER (ThermoFisher) pendant 15 min à température ambiante. Les protéines ont été purifiées en utilisant la résine Glutathione Uniflow (BD Biosciences Clontech) selon une procédure standard. La protéine recombinante 40 kDa de MBNL1 doublement taguée (GST et His) a été secondairement purifiée en utilisant un gel d'affinité His-Nickel (Sigma-Aldrich) selon des procédures standards. Dans toutes les étapes de purification, les tampons contenaient 10% de glycérol. Les protéines recombinantes purifiées ont été dialysées contre le tampon D (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,1 M KCl, 12 mM dithiothreitol, 0,2 mM EDTA et 10% de glycérol) (Freyermuth et al. 2016). La GST-MBNL1-His et la GST-MBNL1 Δ recombinantes ont été traitées par la protéase PreScission (GE healthcare) pour éliminer le tag GST. En bref, 100 μ g de protéines GST recombinantes ont été traitées avec 2 U de protéase PreScission pendant 16h à 4°C dans du tampon D ajusté à 150 mM NaCl. La protéine a ensuite été mélangée à une sépharose de glutathion pré équilibrée avec le tampon de digestion pendant 4h à 4°C. Les protéines clivées ont été récupérées après centrifugation. La pureté des protéines a été évaluée par électrophorèse sur gel dénaturant à 12% de polyacrylamide (37,5/1).

Liaison protéine-ARN par retard sur gel *in vitro*

Le substrat ARN GCU-GCU-GUU-CGC-UGC-UG (Warf et Berglund 2007) a été synthétisé par Eurogentec et marqué radioactivement en son extrémité 5' à l'aide de T4 PNK (ThermoFisher) avec (alpha-³²P) ATP. Les nucléotides radioactifs non incorporés ont été éliminés avec une colonne microspin G50 (Sigma-Aldrich). Avant l'incubation, l'ARN radiomarqué a été dénaturé dans 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ pendant

3 min à 95°C, puis refroidi sur glace. Des complexes ARN-protéines ont été formés en incubant 1 µL de protéines recombinantes MBNL (0-4 000 nM) dans 10 µL de mélange réactionnel contenant 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,1 mg/mL d'ARN de transfert d'E. coli, 0,02% de NP40, 1 mM de dithiothréitol, 10% de glycérol et 9 µL d'ARN marqué (5 fmol). Les protéines recombinantes ont été diluées dans le tampon D contenant 0,5 mg/ml d'albumine de sérum bovin et incubées 15 min à 30°C. Du glycérol (5 µL, 25 %) contenant 0,05% de bleu de bromophénol a ensuite été ajouté. Les complexes ARN-protéines ont été séparés sur un gel de polyacrylamide natif à 5% (39/1) contenant 0,5× Tris-borate à 4°C pendant 2h à 150V. Les gels ont été séchés et autoradiographiés. Des expériences de compétition ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus, avec 1 500 nM de GST-MBNL1-his ou MBNL1Δ recombinante avec une quantité croissante de MBNL1Δ ou GST-MBNL1-his recombinante (1 500, 2 500 et 3 750 nM), respectivement. La liaison de la protéine sur l'ARN a été analysée à l'aide du PhosphorImager (Molecular Imager FX, Bio-Rad) et quantifiée avec Quantity One (Bio-Rad). Le K_d a été calculé par GraphPad Prism comme la concentration de protéine qui donne 50% de l'ARN lié à la protéine.

Séparation de phases liquide-liquide (LLPS) *in vitro*

Le plasmide pSP72 contenant 46 répétitions CTG a été obtenu comme décrit précédemment (Laurent et al. 2012). Après linéarisation avec une enzyme de restriction, le plasmide CTG contenant 46 répétitions a été transcrit avec l'ARN polymérase SP6 en utilisant le kit de transcription *in vitro* Megascript (Ambion) selon les instructions du fabricant. Les CUG marqués avec un fluorophore ont été obtenus en ajoutant 0,5 mM de Cy3-UTP (Cliniscience) dans la réaction de transcription (substitution de 10% de Cy3-UTP). Les ARN transcrits ont ensuite été traités avec de la Turbo DNase, précipités avec de l'éthanol, purifiés avec le kit Monarch RNA Cleanup (NEB) et resuspendus dans de l'eau. L'intégrité des ARN a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose. Pour les études de « droplets », l'ARN marqué au Cy3 (500 nM) a été incubé dans 20 µL d'imidazole (20 mM, pH 7), 100 mM NaCl, 10% de glycérol et 0,1 mM de dithiothréitol pendant 4h à 25°C. Les protéines recombinantes (2,5 µM) ont ensuite été ajoutées. La solution a été placée sur des lames avec chambres à fond en verre (Ibidi, 18 puits, recouvertes de 3% de BSA pendant 15 min et lavées trois fois avec de l'eau) et les images ont été acquises immédiatement (puis toutes les 30 min) à l'aide d'un microscope Nikon Ti2 équipé d'une platine motorisée et d'une tête à disque rotatif CSU-W1 (Yokogawa) couplée à une caméra Prime 95 sCMOS (Photometrics) avec une chambre d'incubation à 25°C. Toutes les images ont été acquises à l'interface de la solution, et réalisées avant que les structures

formées ne se déposent sur le fond de la lame. Le logiciel Fiji avec des scripts personnalisés a été utilisé pour analyser le nombre, la taille et la mobilité des structures. En bref, après le nettoyage et l'amélioration du contraste de l'image, les structures ont été détectées à l'aide d'une fonction de seuil automatique (RenyiEntropy). Ensuite, le nombre et la taille de chaque objet ont été calculés automatiquement. Pour le test de mobilité, le nombre de structures mobiles a été calculé en soustrayant le signal de chaque image de la précédente et en comptant les objets restants.

Expériences de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)

Les expériences FRAP ont été réalisées sur un microscope confocal Zeiss 880 inversé équipé d'un objectif x63, d'une alimentation en CO₂ par mélangeur de gaz et d'une chambre à température contrôlée réglée à 37°C. Tous les paramètres ont été maintenus constants entre les expériences indépendantes. Pour assurer une bonne extinction de la fluorescence dans toute la structure des *foci* par photoblanchiment, la zone d'extinction a été centrée sur les *foci* sélectionnés dans le noyau. Des acquisitions Z-scan ont été réalisées pour couvrir toute la profondeur des *foci*. Cinq scans de pré-photoblanchiment ont été obtenus, suivis de 40 impulsions de blanchiment avec un laser de 488 nm à 100% de puissance. Après le photoblanchiment, les images ont été enregistrées à raison de 100 ms entre les images pendant 100 cycles jusqu'à ce qu'un plateau soit atteint. Les images ont ensuite été traitées dans le logiciel ImageJ. Les séries d'images en Z ont d'abord été empilées en utilisant une projection Z d'intensité maximale. La zone de blanchiment des *foci* a été définie comme une région d'intérêt (ROI des *foci*), une ROI de contrôle (ROI CTL) de la même cellule dans le nucléoplasme (région GFP non blanchie) et une ROI de contrôle de bruit de fond (ROI BG), définie dans une région non fluorescente. Ces dernières ont été utilisées pour normaliser les intensités des pixels afin de tenir compte du photoblanchiment de la GFP et des fluctuations de la puissance du laser pendant toute la série d'acquisitions. Pour l'analyse, les intensités de la ROI *foci* et de la ROI CTL ont été corrigées pour tenir compte de la fluorescence de la ROI BG (ROI *foci* corrigée = ROI *foci* - ROI BG et ROI CTL corrigée = ROI CTL - ROI BG), puis l'intensité de la fluorescence a été corrigée entre les zones blanchies et non blanchies (ROI *foci* finale = ROI *foci* corrigée/ROI CTL corrigée). Le photoblanchiment ayant lieu au point t = 6, les intensités de fluorescence des premières images avant photoblanchiment (t ≤ 5) ont été utilisées pour normaliser les valeurs d'intensité de fluorescence pour tous les points suivants. Les intensités de fluorescence normalisées ont été utilisées pour une analyse de régression non linéaire à l'aide du logiciel PRISM pour estimer le temps de demi-vie de récupération de la fluorescence. La

fraction mobile a été calculée à partir du plateau et de la première intensité de fluorescence post-photoblanchiment (Y_0) de la courbe ajustée avec l'équation suivante : $(\text{Intensité plateau} - \text{Intensité } Y_0) / (1 - \text{Intensité } Y_0)$. Les données obtenues ont été soumises à un test statistique de normalité (test de normalité omnibus de D'Agostino et Pearson, logiciel PRISM), suivi d'un Student t-test non apparié.

Séquençage de l'ARN à haut-débit

Les échantillons d'ARN ont été traités avec la DNase RNasefree (qualifié RNA RQ1) selon le protocole du fabricant (Promega). Pour les cellules humaines, le séquençage de l'ARN total des cellules immortalisées DM1 et Ctrl a été réalisé au Centre National de Génotypage. Après un contrôle complet de la qualité de l'ARN sur chaque échantillon en utilisant le RNA6000 Nano LabChip sur Bioanalyzer (Agilent), les bibliothèques ont été préparées avec 1 μg d'ARN à l'aide du TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Kit (Illumina). La qualité des bibliothèques a été vérifiée sur Bioanalyzer, et les bibliothèques d'échantillons ont été regroupées avant le séquençage pour atteindre la profondeur de séquençage attendue. Le séquençage a été effectué sur un Illumina HiSeq2000 sous forme de lectures de séquences de 100 paires de base à l'aide des réactifs Illumina TruSeq V3.

Pour les échantillons de souris, le séquençage de l'ARN total a été réalisé sur la plateforme de l'Institut du Cerveau (iGenSeq). Le contrôle de la qualité de l'ARN de chaque échantillon a été réalisé avec TapeStation 2200 (Agilent) et les bibliothèques ont été préparées avec le kit KAPA mRNA hyperprep ROCHE, à partir de 250 ng d'ARN total. Le séquençage a été effectué sur un Illumina NovaSeq 6000 sous forme de lectures de séquences de 150 paires de base en utilisant des cellules de flux SP-300. Les séquences obtenues ont été nettoyées à l'aide de Cutadapt (v2.10)59 et alignées avec STAR (v2.7.5a) (Dobin et al. 2013). Les génomes de référence hg19 et mm10 ont été utilisés pour les alignements des séquences humaines et murines, respectivement. Les transcrits ont ensuite été quantifiés à l'aide de HTSeq (v0.12.4) (Anders, Pyl, et Huber 2015). Toutes les étapes ont été réalisées dans un pipeline Nextflow (v20.04.1) (Di Tommaso et al. 2017). Les gènes exprimés de façon différentielle (DE) ont ensuite été identifiés à l'aide de DESeq2 (v1.30.0) (Love, Huber, et Anders 2014) dans l'environnement R-Studio (R v4.0.2). Un seuil de $\log_2\text{FC} > 1$ et $P < 0,05$ ajusté a été appliqué pour sélectionner les gènes DE significatifs. L'épissage alternatif différentiel a été mesuré par rMATS (v4.1). La détection des événements a été faite avec une étape 'pré' de chaque paire de conditions (WT contre DM1 et WT contre MBNL1 Δ pour l'homme, saline contre MBNL1 Δ et saline contre GFP pour la souris), une étape 'post' de toutes les conditions ensemble et enfin

une étape 'stats' de chaque paire de conditions pour définir 'p-adjusted-value' et 'IncLevelDifference' pour chaque comparaison. Un seuil de $|\Delta\text{PSI}| > 0,20$ et un taux de fausse découverte (FDR) ajusté $P < 0,05$ ont été appliqués pour sélectionner les événements d'épissage différentiels. Enfin, le pourcentage de correction de l'épissage a été calculé pour chaque événement d'épissage, sur la base de la formule : $(\text{PSI}_{\text{MBNL1}\Delta} - \text{PSI}_{\text{DM1}}) \times 100 / (\text{PSI}_{\text{CTRL}} - \text{PSI}_{\text{DM1}})$, où PSI est le PSI moyen (ou 'IncLevelDifference') de toutes les répliquats d'une condition donnée pour un événement d'épissage. L'analyse d'enrichissement des GO terms et des processus biologiques a été effectuée à l'aide des outils en ligne ToppGene (Chen et al. 2009).

Analyse par Southern Blot

Dix microgrammes d'ADN génomique de cellules DM1 et Contrôle ont été digérés par les enzymes HindIII et SacI et soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 0,7% pendant 48 heures avec 1 kb Ladder (New England Biolabs) comme marqueur de taille moléculaire. Après dénaturation (1 M NaOH) et neutralisation (1 M Tris-HCl, 3 M NaCl, pH 8,3), l'ADN a été transféré sur une membrane Hybond-N dans du SSC 6x. L'hybridation a été réalisée à l'aide d'une sonde pM10M6 marquée au 32P, un fragment BamHI de 1,4 kb contenant les répétitions CTG (D. Furling, Coiffier, et al. 2001). La membrane a ensuite été lavée et analysée par autoradiographie. La taille des répétitions CTG a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ. L'ADN isolé de cellules témoins a été utilisé comme contrôle négatif.

Analyse par Northern blot

L'ARN total des cellules DM1 a été extrait à l'aide d'une solution de thiocyanate de guanidine (thiocyanate de guanidine 4,2 M, acétate de sodium 20 mM pH 5,2, N-lauryl sarcosine 0,5% et β -mercaptoéthanol 1% v/v). Le lysat a été déposé sur un coussin de chlorure de césium (chlorure de césium 5,7 M, EDTA 10 mM, acétate de sodium 20 mM pH 5,2) puis soumis à une ultracentrifugation pendant 18-20h à 155 000 g à 18°C en godets basculants. Le culot contenant l'ARN a été remis en suspension dans 400 μL de solution TES (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 5 mM, SDS 0,1%) et l'ARN a ensuite été purifié une première fois avec un mélange phénol acide/chloroforme (1:1) puis une seconde fois avec du chloroforme (CHCl_3) avant d'être précipité par addition d'acétate de sodium pH 5,2 (0,3 M final) et de 3 volumes d'éthanol 100%. Après centrifugation le culot est lavé deux fois avec de l'éthanol à 75% et remis en suspension dans de l'eau. L'ARN total (10 μg) a été déposé sur gel d'agarose 1% (Sigma-Aldrich) contenant du formaldéhyde 6 M et du MESA 1X, afin de séparer les ARN. Les ARN ainsi séparés sont transférés sur une membrane Hybond-N + (GE Healthcare) par transfert capillaire avec du SSC

(20×) et immobilisés par pontage aux UV (Stratalinker). Les blots ont été hybridés avec une sonde oligonucléotidique (CAG)₇ radioactive (marquée avec de l'ATP g32P par la polynucleotide kinase (NEB) dans un tampon d'hybridation ULTRAhyb-Oligo (Ambion-ThermoFisher) à 42°C pendant la nuit. Après lavage des membranes (2x SSC, SDS 0,5%) et exposition pendant une nuit, les signaux ont été analysés à l'aide d'un PhosphorImager (Molecular Imager FX, Bio-Rad) et quantifiés à l'aide d'ImageJ. Toutes les valeurs ont été normalisées par rapport au signal de l'ARN ribosomal 18S après hybridation avec une sonde oligonucléotidique spécifique de l'ARN 18S marquée avec de l'ATP g32P.

Analyse par Western blot

Les échantillons de tissu ont été lysés dans un tampon RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8, 0,1 mM acide éthylènediamine tétra-acétique (EDTA), 1% NP40, 0,5% dodécylsulfate de sodium (SDS), complété par un cocktail complet d'inhibiteurs de protéase) (Roche). Les lysats ont été soniqués et centrifugés à 14 000g pendant 10 min à 4°C. La concentration en protéines a été déterminée par dosage BCA (ThermoFisher). Les échantillons ont ensuite été dilués dans un tampon de charge réducteur Laemmli complété par 50 mM de dithiothréitol, chauffés à 70°C pendant 5 min puis séparés sur des gels de polyacrylamide Bis-Tris 4-12% (ThermoFisher), et transférés sur une membrane de nitrocellulose (Porablot NCP, Macherey-Nagel). Les membranes ont été bloquées pendant 1h dans du lait à 5% dans un tampon PBST (phosphate buffered saline, 0,1% Tween-20) et incubées avec un anticorps primaire dirigé contre MBNL1 (A2764, 1:1 000 ou MB1a, don de I. Holt et G. Morris, 1:1.000), V5 (Life Technologies, 1:1.000), GFP (Clontech, 1:1.000), GAPDH (Santa Cruz, 1:1.000) ou VINCULIN (Sigma, 1:1.000). Les anticorps secondaires anti-lapin (Life Technologies, 1:20 000) et anti-souris (Invitrogen, 1:20 000) ont été conjugués à la peroxydase de raifort et détectés à l'aide du système de substrat chimioluminescent HRP Immobilon Western (EMD Millipore).

Transfert de gènes *in vivo*, histologie musculaire et mesure de force musculaire

Toutes les procédures concernant les souris ont été effectuées conformément au protocole 01204.02 approuvé par le Comité d'éthique sur les ressources animales du Centre d'expérimentation fonctionnelle de la Pitié-Salpêtrière et sous un confinement biologique approprié. En bref, les souris ont été maintenues dans une installation conventionnelle exempte de pathogènes spécifiques avec un cycle lumineux fixe (22°C, cycle obscurité/lumière de 12h). Des souris transgéniques HSA^{LR} (longue répétition, lignée 20b) homozygotes (fournies par C. Thornton) ont été utilisées dans cette étude et génotypées pour le transgène HSA^{LR} par

quantification des niveaux d'*ACTA1* normalisés par rapport à l'*Acta1* endogène de la souris dans l'ADN génomique. Des souris de la souche de fond génétique correspondante aux souris HSA^{LR} (FVB/N) ont été utilisées comme contrôles. Des souris adultes FVB ou HSA^{LR} âgées de trois mois ont reçu une injection de solution saline ou de vecteurs AAV9 par voie intramusculaire (gastrocnémien) ou systémique (sinus rétro-orbitale). Après le sacrifice des souris, le cœur, le foie et les reins ont été congelés dans l'azote liquide et les muscles ont été congelés dans l'isopentane refroidi à l'azote liquide. L'ARN de ces échantillons a été extrait comme décrit plus haut. Les muscles ont ensuite été coupés en section de 10 µm avec un cryostat, et la coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E) a été effectuée selon des procédures standards. Les images ont été capturées par le microscope Leica DMR à l'aide d'une caméra NikonDS-Ri1 et du logiciel NIS-Element. Pour déterminer le pourcentage de fibres musculaires avec des noyaux internes, plus de 1 200 fibres (5-6 champs par section musculaire) ont été comptées. Les propriétés contractiles isométriques du muscle gastrocnémien ont été étudiées *in situ* comme décrit précédemment (Hourdé et al. 2006). Les souris ont été anesthésiées avec une solution de Kétamine/Xylazine (80 mg/kg et 15 mg/kg, respectivement). Le genou et le pied ont été fixés avec des pinces et des broches. Le tendon distal du muscle gastrocnémien a été fixé à un bras de levier d'un système servomoteur (305B, Dual-Mode Lever). Les données ont été enregistrées et analysées à l'aide du système PowerLab (4SP, ADInstruments) et du logiciel Chart 4 (ADInstruments). Le nerf sciatique (écrasé en proximal) a été stimulé par une électrode bipolaire en argent à l'aide d'une impulsion supramaximale (10V) à onde carrée d'une durée de 0,1 ms. La force tétanique isométrique maximale absolue (P₀) a été mesurée pendant les contractions isométriques en réponse à la stimulation électrique (fréquence, 25-150 Hz ; train de stimulation, 500 ms). La myotonie a été mesurée comme l'augmentation de l'aire sous la courbe force par rapport au temps de relaxation.

Test ELISA

Des échantillons de sang de souris ont été prélevés à deux reprises (avant l'injection systémique de solution saline ou de vecteurs AAV-MBNL1Δ et 7 semaines après l'injection au sacrifice) et le sérum a été séparé du sang par centrifugation à 5 500 rpm pendant 10 min. Des plaques Maxisorp (Nunc) ont été recouvertes de protéines MBNL1Δ purifiées ou de protéines AKAP4-GFP (100 µL par puit) diluées à 1 mg/mL dans un tampon carbonate pH 9,6. La solution a été incubée pendant une nuit à 4°C et remplacée par un tampon PBS contenant de la caséine (0,1%) pendant 30 min à 37°C. Après trois lavages avec du PBS/Tween-20 (0,05%), du sérum ou de l'anticorps MB1a (don de G. Morris) dilué dans un tampon PBS/BSA (0,2%) ont été ajoutés

pendant 2h à température ambiante. L'anticorps monoclonal MB1a est dirigé contre un épitope situé dans l'exon 3 de MBNL1 et présent dans MBNL1 Δ . Après trois lavages, l'anticorps secondaire dilué dans du PBS/BSA (0,2%) a été ajouté pendant 1h, puis cinq lavages supplémentaires ont été effectués. Enfin, 100 μ L de substrat TMB monocomposant soluble (ThermoFisher) ont été ajoutés dans chaque puit et la réaction a été arrêtée en ajoutant 50 μ L d'acide sulfonique. L'absorbance de chaque puit a été mesurée à 450 nm.

Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism (version 5 ou 6) et sont présentées comme moyenne \pm SEM. La distribution des données a été évaluée à l'aide du test de Kolmogorov-Smirnov avant l'utilisation du test de Mann-Whitney, test t de Student ou ANOVA selon les cas. Les différences entre les groupes étaient considérées comme significatives lorsque $P < 0,05$ (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

V. Résultats

V.1 Développement de lignées musculaires humaines immortalisées de la dystrophie myotonique pour l'évaluation d'approches thérapeutiques

Les différents modèles cellulaires développés dans la DM récapitulent plusieurs caractéristiques de la pathologie comme les défauts d'épissage, la formation de *foci* et la séquestration des protéines MBNL1. Cependant, il existe toujours un besoin de modèles cellulaires pertinents pour comprendre les mécanismes moléculaires liés à la pathologie et pour évaluer les approches thérapeutiques avant la validation *in vivo*. Les cellules primaires issues de patients DM1 sont des modèles précieux puisque les expansions CTG sont exprimées dans leur contexte naturel et présentent l'ensemble des caractéristiques cellulaires de la pathologie (François et al. 2011). Cependant, plusieurs difficultés limitent l'utilisation de ces cellules comme l'accessibilité aux biopsies de patients ou une capacité proliférative limitée des myoblastes en culture qui est encore plus réduite avec les cellules DM1 (Bigot et al. 2009; D. Furling, L. Coiffier, et al. 2001). **Afin de contourner ces problématiques, nous avons généré en collaboration avec la plateforme interne au Centre de Recherche, Myoline, plusieurs lignées immortalisées de myoblastes et de fibroblastes provenant d'un patient DM1, d'un patient DM2 et d'un individu sain.**

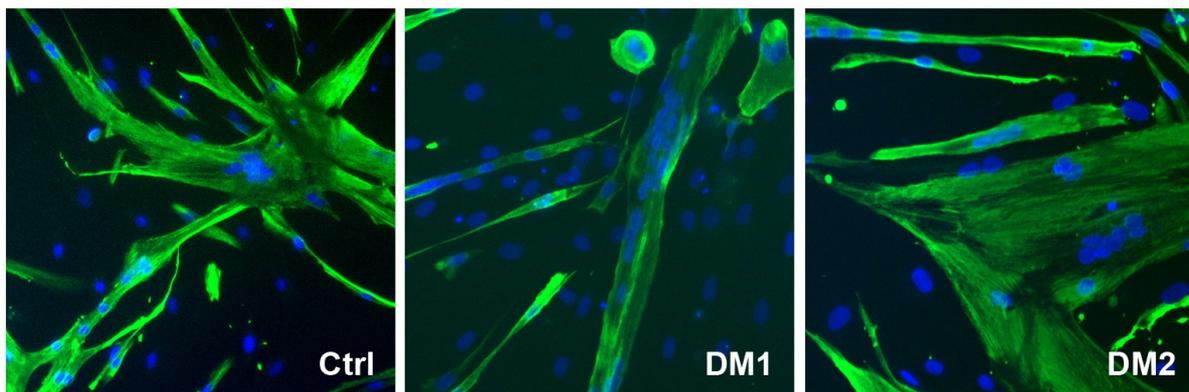
V.1.1 Caractérisation des cellules musculaires primaires issues de patients DM1 et DM2

Afin d'établir des lignées cellulaires de myoblastes, des cultures de cellules musculaires primaires ont été obtenues à partir de biopsies musculaires de patients DM1 et DM2 portant respectivement 2600 CTG et 4000 CCTG et de patient sain.

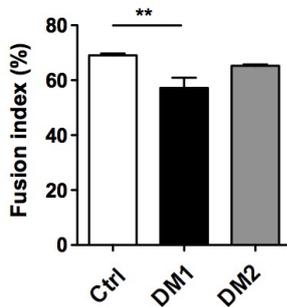
La caractérisation des cellules primaires montre que les cultures de myoblastes différenciés DM1 forment des myotubes plus petits que dans les conditions contrôles et présentent également une capacité de fusion réduite par rapport aux cultures de myoblaste non DM1 (Ctrl) (**Figure 31 A, B**). En revanche, l'index de fusion (défini comme le pourcentage de noyaux dans les myotubes par rapport au nombre total de noyaux) des cultures de myoblastes DM2 différenciés n'est pas significativement différent des cultures de myoblastes Ctrl différenciés. La taille des myotubes DM2 est également comparable à celles des myotubes Ctrl, comme observé précédemment dans des cultures de cellules primaires différenciées (Pelletier et al.

2009). Au niveau moléculaire, des agrégats d'ARN nucléaire de répétitions CUG ou CCUG ont été détectés par hybridation fluorescente *in situ* (FISH) dans les cellules musculaires DM1 et DM2 respectivement, en accord avec les études antérieures (Denis Furling et al. 2001). Des défauts d'épissage alternatif affectant l'exon 11 de *BINI*, l'exon 78 de *DMD* et l'exon 11 de *LDB3* ont également été détectés dans des cultures de cellules musculaires différenciées DM1, conformément à ce qui a été observé dans le tissu musculaire dans une large cohorte de patients DM1 (Nakamori et al. 2013). Cependant, ces défauts d'épissage ne sont pas observés dans les cultures de cellules musculaires différenciées DM2 et Ctrl (**Figure 31 C**). La caractérisation des cellules primaires montre que les cultures de myoblastes différenciés DM1 présentent des caractéristiques moléculaires de la pathologie DM1 en accord avec les études antérieures.

A)



B)



C)

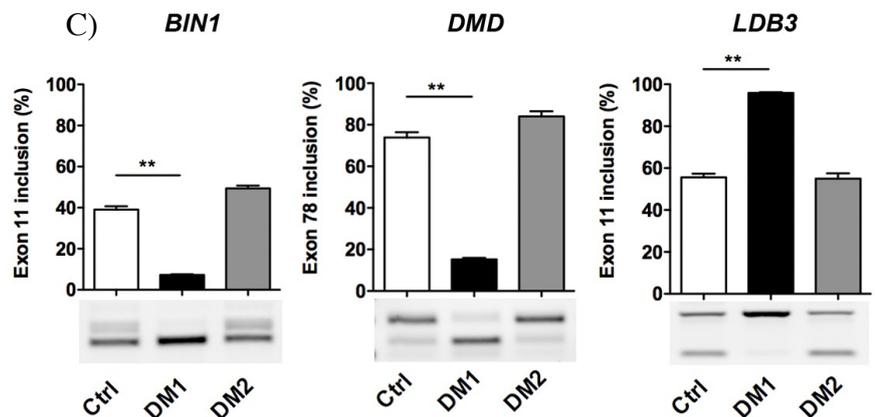


Figure 31 : Caractéristiques des cellules musculaires DM primaires.

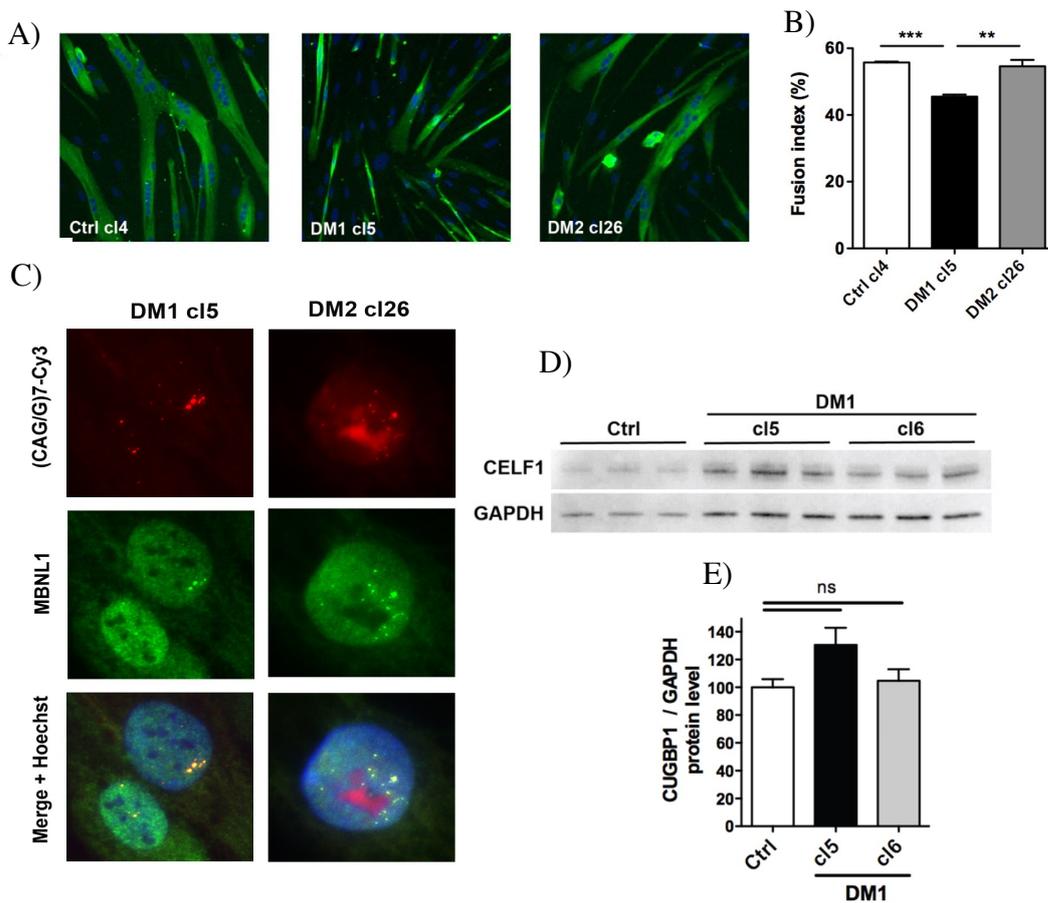
A) Les myoblastes primaires Contrôle (Ctrl), DM1 et DM2 ont été différenciés pendant 4 jours puis fixés pour une analyse par immunofluorescence à l'aide de l'anticorps anti-desmine (vert) et de coloration des noyaux au Hoechst (bleu). B) L'indice de fusion des cultures de cellules musculaires primaires différenciées a été déterminé par le pourcentage du nombre de noyaux dans les myotubes (> 2 noyaux) par rapport au nombre total de noyaux dans les cellules positives à la desmine. (n = 4 pour Ctrl, n = 3 pour DM1 et DM2, > 1000 noyaux comptés par expérience). C) L'analyse RT-PCR du profil d'épissage alternatif de *BINI* exon 11, *DMD* exon 78 et *LDB3* exon 11 a été réalisée dans des cultures différenciées de cellules musculaires

primaires Ctrl, DM1 et DM2 (n = 3 en double pour chaque condition). Les données sont présentées en moyenne \pm SEM. Comparaison avec One-way ANOVA avec post-test de Newman-Keuls ; **, P < 0,01.

V.1.2 Développement et caractérisation des lignées musculaires immortalisées de patients DM1 et DM2

Pour l'immortalisation, les myoblastes primaires issus de patients DM1, DM2 et Ctrl ont été transduits avec deux vecteurs lentiviraux exprimant la sous-unité catalytique de la télomérase humaine (hTERT) et le ligand naturel de p16, Cdk4. Les cellules co-transduites ont ensuite été sélectionnées comme décrit précédemment (Mamchaoui, Trollet, Bigot, Negroni, Chaouch, Wolff, Kandalla, Marie, Di Santo, J. St Guily, et al. 2011) et plusieurs clones myogéniques immortalisés ont été isolés de chaque population. Après avoir testé leur capacité à se différencier en myotubes, nous avons sélectionné des clones présentant l'efficacité de fusion la plus élevée. Un clone de chaque lignée cellulaire a été sélectionné et davantage caractérisé (DM1-cl5, DM2-cl26 et Ctrl-cl4). Dans des conditions de différenciation, les myoblastes immortalisés se comportent de la même manière que les cultures de myoblastes primaires dont ils sont issus. Ainsi, le marquage cytoplasmique de la desmine montre que les myoblastes DM1-cl5 forment des myotubes plus petits que les myoblastes Ctrl-cl4 (**Figure 32 A**). L'index de fusion des cultures de myoblastes DM1-cl5 différenciés est également réduit par rapport aux cultures de myoblastes Ctrl-cl4 (**Figure 32 B**). En revanche, les myotubes DM2-cl26 sont similaires aux myotubes Ctrl-cl4 et ne présentent pas de différence quant à la capacité de fusion des cellules musculaires différenciées. Nous avons ensuite vérifié la présence d'agrégats nucléaires d'ARN et la dérégulation de l'épissage alternatif, deux caractéristiques de la DM1, dans ces lignées de cellules musculaires. Comme attendu, des analyses d'hybridation fluorescente *in situ*, permettant la visualisation des ARN, combinées au marquage en immunofluorescence des protéines MBNL1 (FISH/IF) ont permis de révéler la présence d'agrégats nucléaires d'ARN-CUGexp et d'ARN CCUGexp dans des cellules DM1 et DM2 immortalisées respectivement, et qui colocalisent avec les protéines MBNL1 (**Figure 32 C**). Les protéines de liaison à l'ARN CELF1 sont également augmentées dans la DM1 (Timchenko et al. 2001). Nous avons vérifié cette augmentation dans les cellules immortalisées DM1 et nous avons ainsi montré que le niveau de CELF1 n'est pas significativement modifié dans les deux clones DM1 immortalisés comparativement aux clones Ctrl (**Figure 32 D et E**). Comme observé dans les cultures primaires différenciées, l'analyse par RT-PCR montre que les défauts

d'épissage des pré-ARNm de l'exon 11 de *BIN1*, de l'exon 78 de *DMD* et de l'exon 11 de *LDB3* sont significativement dérégulés dans les cellules musculaires immortalisées et différenciées DM1-cl5 et DM1-cl6 par rapport à Ctrl-cl4 ou Ctrl-cl48. De plus, pour ces mêmes transcrits, nous n'observons pas de dérégulation dans les clones DM2-cl26 ou DM2-cl33 comparativement aux clones contrôles (**Figure 32 F**). Enfin, l'analyse par Southern Blot indique que la taille des répétition CTG, d'environ 2600 CTG dans les myoblastes immortalisés DM1-cl5 et DM1-cl6 est similaire à la taille des CTG de la population primaire parentale de myoblastes DM1 utilisée pour établir ces lignées (**Figure 32 G**). Ainsi, ces résultats confirment que les myoblastes immortalisés se comportent de la même manière que les cultures de myoblastes primaires dont ils sont issus.



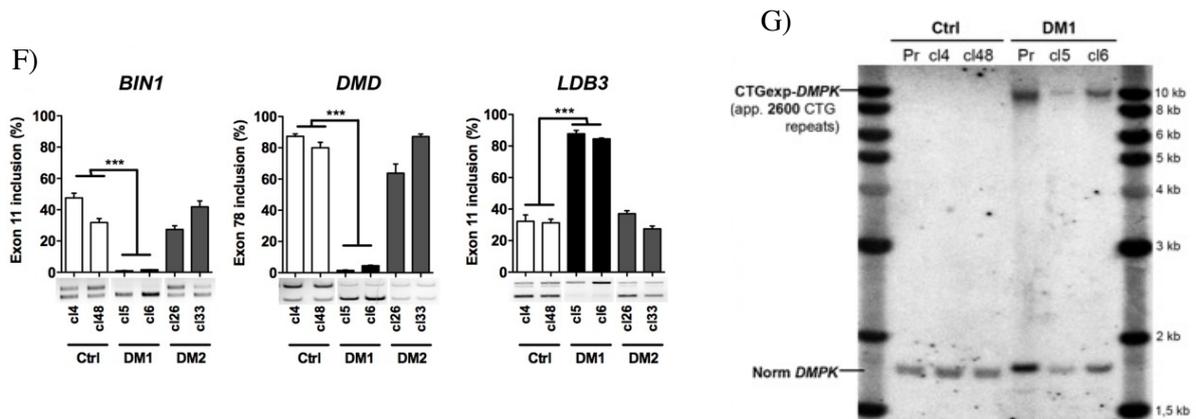


Figure 32 : Caractérisation des lignées cellulaires de myoblastes DM.

A) Images représentatives des myoblastes immortalisés par les lentivirus hTERT/Cdk4. Les cultures Ctrl (cl4), DM1 (cl5) et DM2 (cl26) sont différenciées pendant 4 jours puis fixées pour l'analyse par immunofluorescence à l'aide de l'anticorps anti-desmine (vert) et de coloration des noyaux au Hoechst (bleu). B) L'indice de fusion des cultures de myoblastes immortalisés différenciés a été déterminé par le pourcentage du nombre de noyaux dans les myotubes (> 2 noyaux) par rapport au nombre total de noyaux dans les cellules positives à la desmine. (n = 3 pour chaque condition, > 1000 noyaux comptés par expérience) C) Des agrégats nucléaires d'ARN-CUGexp ou -CCUGexp ont été détectés par FISH à l'aide d'une sonde Cy3-(CAG)₇ ou -CCAG)₅ (rouge) dans des myoblastes DM1 et DM2 immortalisés respectivement. D-E) Analyse par WB et quantification de l'expression de CELF1 dans des myoblastes Ctrl et DM1 immortalisés respectivement. F) Quantification du profil d'épissage alternatif de *BIN1* exon 11, *DMD* exon 78 et *LDB3* exon 11 par RT-PCR dans des cultures différenciées de lignées cellulaires de myoblastes immortalisés Ctrl, DM1 et DM2 (n = 3 pour chaque condition). G) Analyse par Southern Blot à l'aide d'une sonde *DMPK* pour déterminer la taille de l'expansion CTG dans les cellules musculaires primaires DM1 (Pr) et deux clones de myoblastes DM1 immortalisés (Cl5 et Cl6) dérivés de la même culture de cellules musculaires primaires. Les valeurs sont présentées en moyenne ± SEM. Statistiques : One-way ANOVA avec post-test de Newman-Keuls ; ns, non significatif ; *, P < 0,05 ; **, P < 0,01 ; ***, P < 0,001.

V.1.3 Développement et caractérisation de lignées immortalisées trans-différenciées

Une méthode alternative pour produire des lignées de cellules musculaires humaines, lorsque les biopsies musculaires ne sont pas disponibles, consiste à convertir des fibroblastes de peau immortalisés en myotubes multinucléés par expression forcée du facteur régulateur myogénique MyoD (MYOD1). Brièvement, des fibroblastes primaires isolés à partir d'une biopsie cutanée sont immortalisés avec des vecteurs lentiviraux permettant la réexpression de hTERT (Bodnar et al., 1998) et contenant une construction Tet-on MyoD inducible. Dans les conditions non permissives, les cellules immortalisées peuvent proliférer indéfiniment, mais après ajout de doxycycline dans le milieu, les cellules expriment MyoD qui active le programme

myogénique et la fusion des cellules en myotubes. Dans notre étude, des fibroblastes primaires humains isolés à partir de biopsies cutanées obtenues à partir d'un individu témoin (Ctrl) et d'un patient DM1 (les biopsies musculaires et cutanées ont été obtenues du même patient), sont utilisés pour établir des lignées cellulaires myoconverties ou trans-différenciées immortalisées, ensuite appelées myotubes trans-différenciés. Ainsi, l'expression forcée de MyoD après une addition de doxycycline dans le milieu de culture conduit à la formation de grands myotubes multinucléés DM1 comparables aux myotubes trans-différenciés Ctrl (**Figure 33 A**). Une expérience d'immunofluorescence/FISH révèle que les myotubes DM1 contiennent des agrégats nucléaires ARN-CUGexp qui colocalisent avec le facteur d'épissage MBNL1 (**Figure 33 B**). De plus, les myotubes trans-différenciés DM1 présentent des changements d'épissage de nombreux transcrits identifiés précédemment dans les muscles squelettiques des patients DM1 (Nakamori et al. 2013) notamment *ATP2A1*, *BIN1*, *INSR*, *LDB3*, *MBNL1* et *TNNT2* (**Figure 33 C-D**). Collectivement, ces résultats montrent que les lignées cellulaires DM1 immortalisées trans-différenciées présentent les caractéristiques moléculaires et cellulaires de la pathologie DM1.

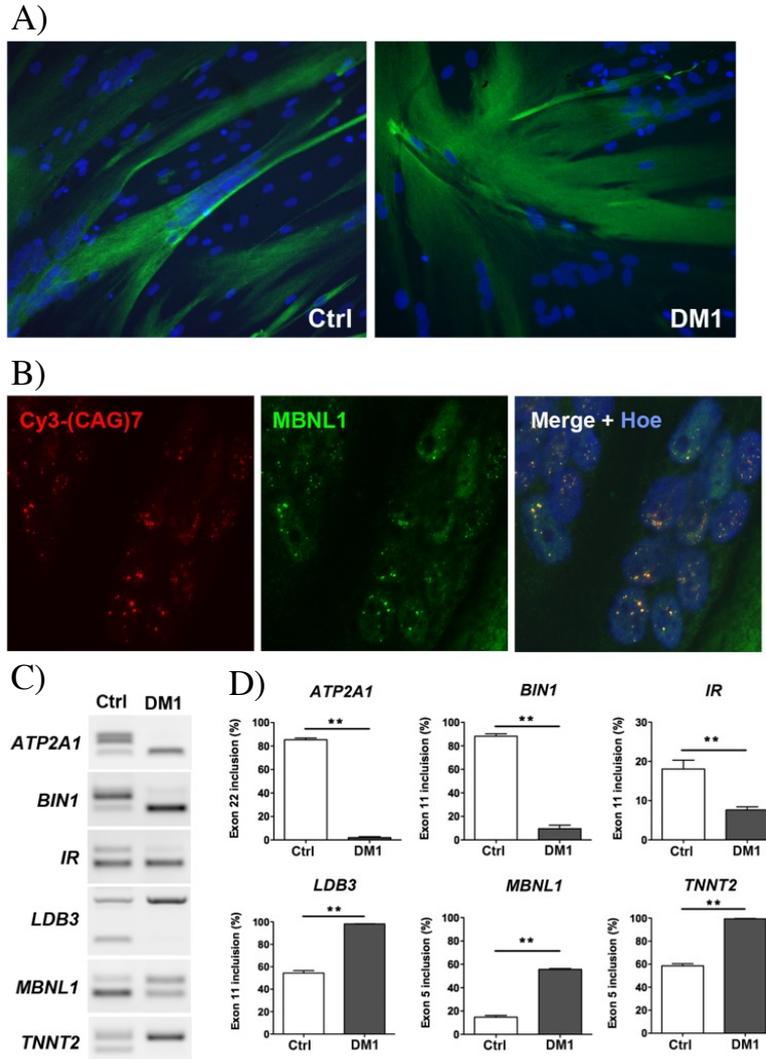


Figure 33 : Caractérisation des cultures de myotubes DM1 et Ctrl dérivés de lignées cellulaires de fibroblastes converties par l'expression de MyoD.

A) Marquage de la Desmine par immunofluorescence (vert) de cultures de myotubes dérivés de lignées cellulaires de fibroblastes Ctrl myoconverties par surexpression de MyoD (panneau de gauche) et DM1 (panneau de droite). B) FISH utilisant une sonde Cy3-CAG₇ (rouge) et immunomarquage MBNL1 (vert) montrant la colocalisation de MBNL1 avec les agrégats nucléaires CUGexp dans des fibroblastes immortalisés DM1 trans-différenciés. C-D) Analyse RT-PCR et quantification montrant les profils d'épissage alternatifs dans *ATP2A1*, *BIN1*, *IR*, *LDB3*, *MBNL1* et *TNNT2* dans des cultures de myotubes dérivés de lignées cellulaires de fibroblastes DM1 et Ctrl converties (n = 4 pour chaque condition). Les données sont présentées en moyenne ± SEM. Comparaison avec le test de Mann-Whitney ; **, P < 0,01.

V.1.4 Utilité de lignées de cellules musculaires DM1 pour évaluer les composés thérapeutiques

Pour déterminer si ces nouvelles lignées de cellules musculaires DM immortalisées représentent des outils pertinents pour le criblage ou l'évaluation d'approches thérapeutiques *in vitro*, nous avons testé dans notre modèle DM1, comme preuve de concept, différents composés thérapeutiques publiés et connus pour leur efficacité (François et al. 2011; Mulders et al. 2009).

V.1.4.1 Utilisation d'une approche Oligonucléotides antisens : 2'OMe-(CAG)₇

Comme première approche, nous avons utilisé des oligonucléotides antisens (ASO) connus pour neutraliser la toxicité de l'ARN-CUG_{exp} en bloquant la séquestration du facteur d'épissage MBNL1, réduisant le nombre d'agrégats nucléaires CUG_{exp} et permettant de corriger les défauts d'épissage DM1 dans le modèle murin HSA^{LR} (Mulders et al. 2009; Wheeler et al. 2009). Conformément aux résultats précédemment obtenus dans des myoblastes DM1 (Mulders et al. 2009; Pantic et al. 2016a), le traitement des myoblastes DM1-cl5 par l'ASO 2'OMe-PT-(CAG)₇ a significativement diminué le nombre de noyaux présentant des *foci* (**Figure 34 A**) et a entraîné la redistribution des protéines MBNL1 séquestrées dans le nucléoplasme (**Figure 34 B**). Des myotubes trans-différenciés DM1 ont également été traités avec l'ASO 2'OMe-PT-(CAG)₇ et une réduction similaire du nombre *foci* est observée (**Figure 34 C**) identiquement à ce qui a été montré dans les myoblastes trans-différenciés DM1 (Larsen et al. 2011). Par la suite, nous avons testé les effets du traitement par l'ASO 2'OMe-PT-(CAG)₇ sur la dérégulation de l'épissage alternatif dans des myotubes trans-différenciés DM1. Les défauts d'épissage de l'exon 5 de *MBNL1* et de l'exon 11 de *LDB3* ont été corrigés de manière significative après traitement par l'ASO 2'OMe-PT-(CAG)₇. Cependant, certains transcrits ne montrent pas d'amélioration, comme par exemple l'exon 11 de *BINI* (**Figure 34**).

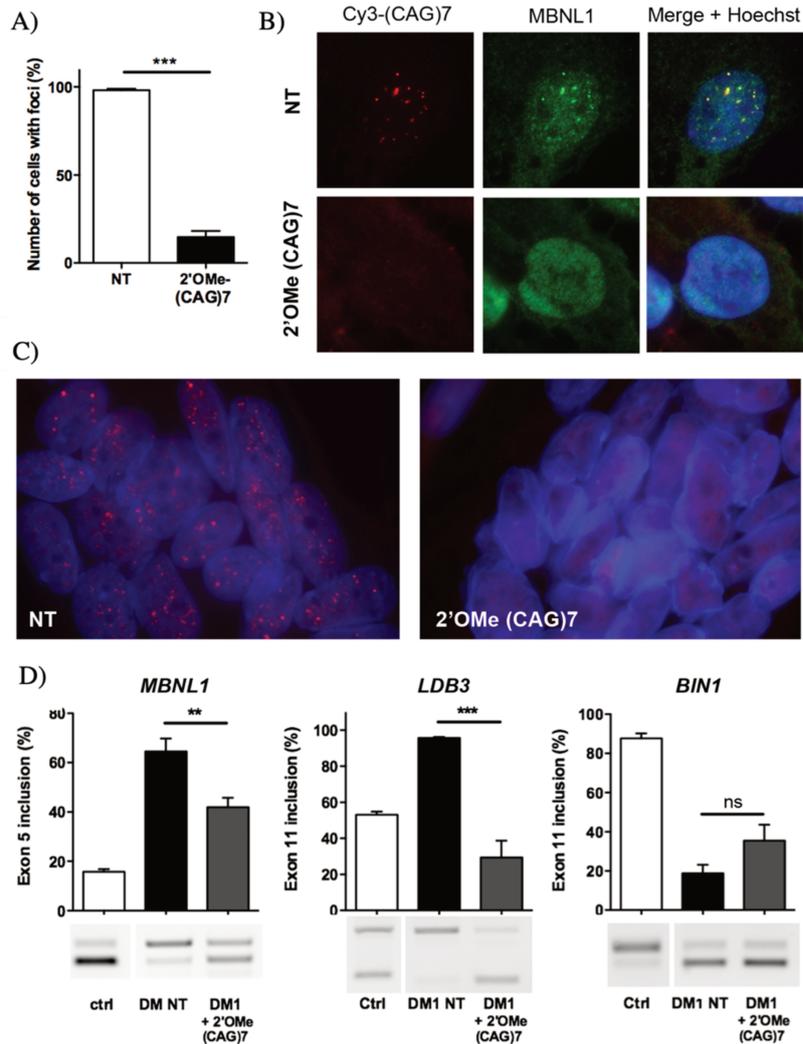


Figure 34 : L'oligonucléotide antisens (CAG)₇ corrige la toxicité de l'ARN-CUGexp dans les cellules musculaires DM1 immortalisées.

A) Pourcentage de noyaux de myoblastes DM1 immortalisés contenant des agrégats nucléaires CUGexp-ARN (*foci*) après traitement 2'OMe-(CAG)₇ (n = 4). Les données sont présentées en moyenne ± SEM. Comparaison avec le test de Mann-Whitney ; ***, P < 0,001. B) FISH-immunofluorescence à l'aide d'une sonde Cy3-(CAG)₇ et d'un anticorps anti-MBNL1 pour détecter les *foci* (rouge) et MBNL1 (vert) respectivement dans les myoblastes DM1-cl5 immortalisés traités avec 2'OMe-(CAG)₇ ASO par rapport aux cellules non traitées (NT). C) Expérience de FISH pour détecter les *foci* CUGexp-ARN (rouge) dans le noyau (bleu) de myotubes dérivés de lignées cellulaires de fibroblastes DM1 myoconverties, puis traitées avec des ASO 2'OMe-(CAG)₇. D) Quantification des profils d'épissage de l'exon 5 de *MBNL1*, de l'exon 11 de *LDB3* et de l'exon 11 de *BINI*, déterminés par RT-PCR dans des myotubes Ctrl et DM1 de lignées cellulaires de fibroblastes myoconverties traitées ou non avec des ASO 2'OMe-(CAG)₇ (n = 8). Les données sont présentées en moyenne ± SEM. Comparaison avec un test One-way ANOVA avec post-test de Newman-Keuls ; ns, non significatif ; **, P < 0,01 ; ***, P < 0,001.

V.1.4.2 Utilisation d'une approche antisens : U7-snrRNA modifié

Une deuxième approche antisens utilisant un U7-snrRNA humain modifié conjugué à une séquence antisens (CAG)₁₅ (hU7-(CAG)₁₅) a ensuite été évaluée dans la lignée cellulaire de myoblastes immortalisés DM1-cl5. Une étude précédente publiée par François et al. (2011) a démontré la capacité du hU7-(CAG)₁₅ à inhiber l'expression des ARN-CUGexp et à corriger les défauts d'épissage ainsi que les défauts de différenciation dans les cellules musculaires primaires de patients DM1. Des myoblastes DM1-cl5 ont été transduits avec un vecteur lentiviral exprimant la construction hU7-(CAG)₁₅, puis les cultures ont été différenciées en myotubes. Les myotubes formés par les cellules DM1-cl5 traitées sont morphologiquement similaires à ceux observés dans les cellules Ctrl-cl4 (**Figure 35 A**) et l'indice de fusion des cultures de myoblastes DM1-cl5 différenciés traités a été significativement amélioré par rapport aux cultures de myoblastes DM1-cl5 différenciés non traités (**Figure 35 B**). De plus, l'expression de l'antisens hU7-(CAG)₁₅ induit une réduction du nombre d'agrégats nucléaires ARN-CUGexp dans les cellules traitées (**Figure 35 C**) et corrige partiellement les défauts d'épissage associés à DM1 tels que l'exon 11 de *BIN1*, l'exon 78 de *DMD* et l'exon 11 de *LDB3* (**Figure 35 D**).

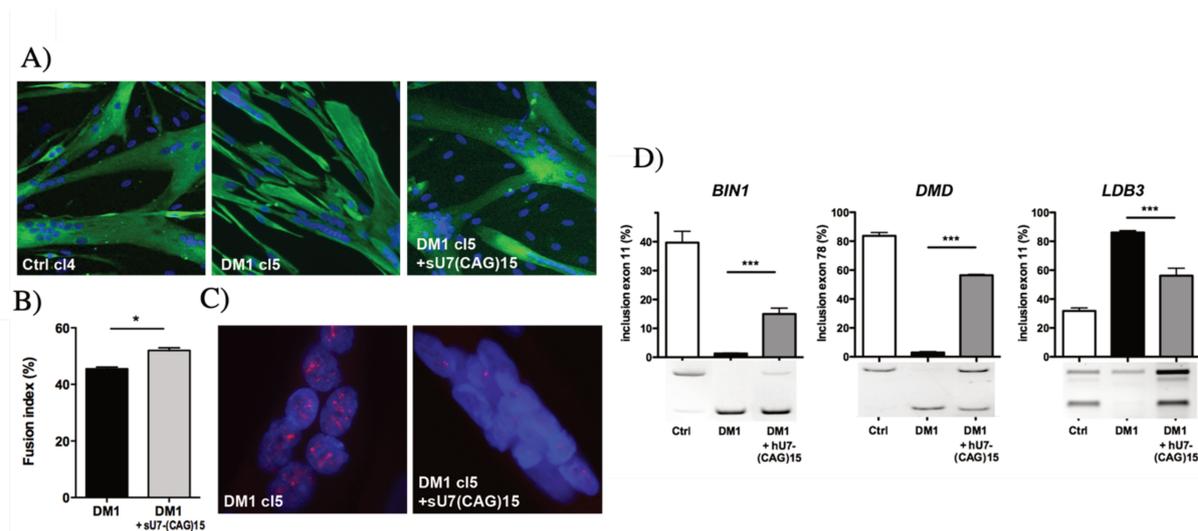


Figure 35 : L'outil hU7-(CAG)₁₅ corrige la toxicité de l'ARN-CUGexp dans les lignées cellulaires de myoblastes DM1. A) La différenciation de la lignée cellulaire de myoblastes DM1-cl5 exprimant les antisens hU7-(CAG)₁₅ a été évaluée par l'immunomarquage de la Desmine (vert) et Hoechst (bleu) et comparée aux cellules différenciées DM1-cl5 et Ctrl. B) L'Indice de fusion des cultures différenciées de myoblastes DM1 immortalisés transduits ou non avec un vecteur lentivirus hU7-(CAG)₁₅ par rapport à Ctrl-cl4 (n = 4 pour chaque condition, > 1000 noyaux comptés par expérience). Les données sont présentées en moyenne ± SEM. Comparaison avec le test de Mann-Whitney ; *, P < 0,05. C) Agrégats nucléaires CUGexp-ARN dans la lignée cellulaire myoblaste différenciée DM1-cl5 exprimant hU7-(CAG)₁₅. D) Analyse RT-PCR des profils d'épissage de l'exon 11 de *BIN1*, de l'exon 78 de *DMD* et de

l'exon 11 de *LDB3* dans des cultures différenciées de myoblastes immortalisés Ctrl-C14 et DM1-cl5 transduits ou non avec un vecteur lentivirus hU7-(CAG)₁₅ (n = 6 pour chaque condition). Les données sont présentées en moyenne \pm SEM. Comparaison avec un test One-way ANOVA avec post-test de Newman-Keuls ; ***, P < 0,001.

Pour évaluer si l'outil antisens hU7-(CAG)₁₅ avait un effet de correction global sur les défauts d'épissage observés dans les cellules DM1, nous avons effectué un séquençage ARN à haut-débit (RNA-seq) à partir des ARN totaux de myoblastes différenciés Ctrl-cl4, DM1-cl5 et de DM1-cl5 traités avec l'antisens hU7-(CAG)₁₅. Les analyses bio-informatiques à l'aide du logiciel DEXseq suite au séquençage ont montré que 349 événements d'épissage alternatifs étaient modifiés de manière différentielle (changement de facteur $\geq 1,5$, valeur p ajustée pour les tests multiples $\leq 0,1$) dans les cellules musculaires DM1-cl5 par rapport aux cellules Ctrl-cl4. Plusieurs dérégulations d'épissages déjà observées dans les muscles squelettiques de patients DM1, tels que *LDB3* exon 11, *CAPZB* exon 8, *GFPT1* exon 9, *KIF13A* exon 32, *ANK2* exon 21, *DMD* exons 71 et 78, *BINI* exon11 et *UBE2D3* exon 10 ont également été détectées dans la lignée cellulaire DM1-cl5 confirmant la pertinence de notre lignée cellulaire. Comme le montre la **Figure 36A**, 53% des événements d'épissage anormaux affectent des exons cassettes. D'autres types d'événements d'épissage, y compris la rétention alternative du premier ou du dernier exon et des introns, ont également été modifiés à 15%, 20% et 8% respectivement. Fait intéressant, le traitement avec la construction antisens hU7-(CAG)₁₅ permet une correction (partielle ou complète) de 90% des événements d'épissages dérégulés dans les myoblastes DM1-cl5 différenciés. Le niveau médian de correction dans les cellules DM1 traitées était de 41% pour les événements exclus et de 37% pour les événements inclus (**Figure 36B**). Individuellement, certains changements d'épissage alternatifs sont entièrement normalisés (58% pour les événements exclus et 51% pour les événements inclus ; lignes rouges), partiellement corrigés (28% pour les événements exclus ou inclus ; lignes bleues) et non corrigés ou avec moins de 10% de correction (14% pour les événements exclus et 21% pour les événements inclus ; lignes vertes) (**Figure 36C**). Enfin, plus de la moitié (56%) des événements d'épissage mal régulés dans la DM1 n'étaient plus significativement modifiés dans les cellules musculaires DM1 traitées par rapport aux cellules musculaires Ctrl-cl4 confirmant la neutralisation partielle de la toxicité de l'ARN-CUGexp par l'outil hU7-(CAG)₁₅.

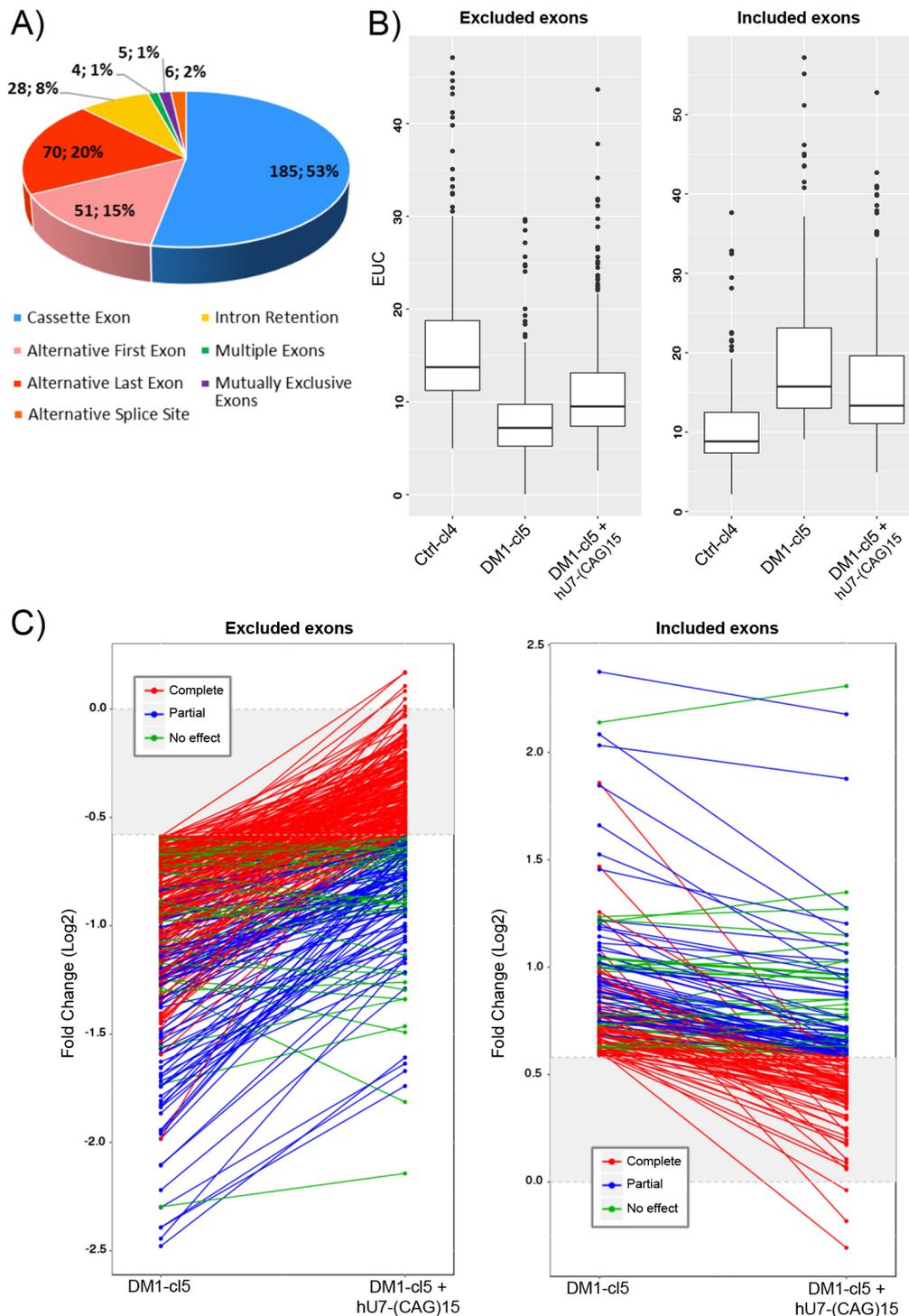


Figure 36 : Effet de l'oligonucléotide antisens hU7-(CAG)₁₅ sur les changements globaux de l'épissage de la DM1. L'ARN total extrait des myoblastes différenciés Ctrl-cl4, DM1-cl5 et DM1-cl5 traité par hU7-(CAG)₁₅ a été analysé par séquençage d'ARN (RNA-seq). A) Répartition de 349 événements d'épissage dérégulés dans les cellules DM1-cl5 par rapport aux cellules Ctrl-cl4 (nombre d'événements ; pourcentage par rapport au nombre total d'événements). B) Box plot représentant l'inclusion de l'épissage ou EUC (exon usage coefficient, déterminé avec le logiciel DEX-seq) des 349 événements d'épissage (exon_bin) regroupés en exons exclus (n = 245, panneau de gauche) et en exons inclus (n = 104, panneau de droite) dans les cellules Ctrl-cl4, DM1-cl5 et DM1-cl5 traitées avec hU7-(CAG)₁₅. Dans le

diagramme en boîte, la moustache inférieure représente la plus petite observation supérieure ou égale à la charnière inférieure - 1,5 fois l'écart interquartile (IQR) ; la bordure inférieure est le quantile de 25%, la ligne centrale est la médiane ; la bordure supérieure est le quantile de 75% ; la moustache supérieure représente la plus grande observation inférieure ou égale à la charnière supérieure - 1,5 fois l'IQR. C) Analyse des événements individuels d'exclusion (panneau de gauche) ou d'inclusion (panneau de droite) de l'exon_bin dans les cellules DM1-cl5 par rapport aux cellules Ctrl-cl4. Plus de 50% des événements sont entièrement normalisés (rouge), 28% sont partiellement restaurés (bleu) et environ 20% ne sont pas significativement modulés (vert) par le traitement avec hU7-(CAG)₁₅.

Conclusion :

Cette partie de mon travail de thèse a permis de montrer que les cellules musculaires DM1 immortalisées présentent des caractéristiques moléculaires identiques aux cellules primaires dont elles sont issues. De plus, l'immortalisation des cellules primaires permet de s'affranchir des problèmes de sénescence précoce et d'arrêt de la prolifération qui limitent l'utilisation des cellules primaires, spécialement dans le cas de pathologies. Ainsi, ces cellules peuvent proliférer indéfiniment et former des myotubes en culture. L'expression de la mutation dans son contexte naturel induit la formation de *foci* et des défauts d'épissage forts. L'inhibition de la toxicité observée dans les cellules musculaires immortalisées grâce à l'utilisation d'approches thérapeutiques ciblant l'ARN-CUGexp et permettant la libération des protéines MBNL1 dans le noyau font de ces modèles cellulaires un outil robuste et précieux pour l'évaluation de composés thérapeutiques.

V.2 Développement et évaluation d'une approche de thérapie génique basée sur une stratégie de leurre

La séquestration des protéines MBNL par les ARN toxiques CUG induit les phénotypes majeurs de la DM1. A l'heure actuelle, il n'existe pas de thérapie pour cette maladie. Différents travaux montrent que cibler l'ARN muté permet de restaurer une quantité suffisante de protéines MBNL fonctionnelles et corrige des phénotypes de la DM1. Le second objectif de cette thèse a été de développer un outil thérapeutique basé sur une stratégie de leurre issu de la modification de la protéine de liaison à l'ARN MBNL1. Ainsi, nous avons conçu une protéine tronquée ayant conservé ces propriétés de liaison à l'ARN et dépourvue de son activité d'épissage, permettant ainsi de délocaliser les protéines MBNL séquestrées sur les grandes répétitions CUG. Cette stratégie a été testée *in vitro* dans les cellules musculaires immortalisées précédemment caractérisées puis *in vivo* par injection d'AAV dans le modèle murin HSA^{LR}.

V.2.1 Développement d'une protéine affine pour les CUGexp et jouant un rôle de leurre : MBNL1Δ

Le développement de la stratégie de leurre repose sur la forte affinité des protéines MBNL1 pour les répétitions CUG. Ainsi, nous avons généré une protéine liant l'ARN (RBP) modifiée conservant le domaine de liaison à l'ARN qui est caractérisé par la présence des deux domaines en tandem en doigts de zinc (ZnF) situés dans la partie N-terminale de la protéine. Cette protéine MBNL1 tronquée, appelée MBNL1Δ, conserve donc sa capacité de liaison aux motifs YGCY. Elle est en revanche dépourvue de la partie C-terminale, identifiée comme la partie impliquée notamment dans l'activité d'épissage, la localisation nucléaire et l'oligomérisation (Tran et al. 2011) (**Figure 37 A**). Pour confirmer que MBNL1Δ présente une activité réduite, nous avons réalisé un test d'activité d'épissage dans des cellules HeLa par co-transfection de plasmide contenant soit MBNL1Δ, soit MBNL1 et en présence des plasmides codant pour des minigènes *cTNT* ou *IR* (qui sont des cibles régulées par MBNL1). Ce test montre que comparativement à MBNL1, l'outil MBNL1Δ, tronqué en C-terminal, régule significativement moins l'épissage alternatif observé au niveau des minigènes mais garde tout de même une activité résiduelle, (**Figure 38 A**). Afin de mieux visualiser notre protéine d'intérêt dans la suite de l'étude, nous avons fusionné MBNL1Δ à une protéine fluorescente verte (GFP) et avons ensuite vérifié que la construction GFP-MBNL1Δ avait les mêmes propriétés de liaison aux CUGexp que les protéines MBNL1. Une expérience de co-transfection dans des cellules Hela exprimant une

construction de 960 répétitions CTG et une construction GFP-MBNL1 Δ a confirmé que notre outil colocalise avec les *foci* de la même manière que la construction GFP-MBNL1 (**Figure 37 B**). Étant donné que l'affinité pour les répétitions CUG est la même entre MBNL1 Δ et MBNL1, nous avons testé si la protéine MBNL1 Δ pouvait entrer en compétition avec les protéines MBNL1. Pour cela une expérience de compétition *in vitro* avec un ARN marqué au ³²P a été réalisée. Cette expérience a démontré que des quantités croissantes de protéines MBNL1 Δ ou MBNL1 déplacent MBNL1 ou MBNL1 Δ des CUGexp respectivement, et de manière dose-dépendante, indiquant que les deux protéines peuvent entrer en compétition pour la liaison aux CUGexp (**Figure 37 C et Figure 38 B**). A partir de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que MBNL1 Δ pourrait agir comme un leurre et jouer un rôle de compétiteur pour les ARN-CUGexp, favorisant la libération des protéines MBNL1 endogènes fonctionnelles séquestrées dans les *foci* des cellules DM1.

V.2.2 MBNL1 Δ corrige la toxicité des ARN-CUGexp dans les cellules musculaires dérivées de patients DM1

Afin de vérifier que le leurre MBNL1 Δ permet la restauration de l'activité endogène des protéines MBNL1 dans les cellules musculaires DM1, les épissages alternatifs dérégulés dans la DM1 et dépendants de MBNL1 ont été utilisés comme biomarqueurs de l'amélioration fonctionnelle de MBNL1 (Nakamori et al. 2013; Wagner et al. 2016). Pour cela, les cellules musculaires immortalisées dérivées d'un patient DM1 et présentant des défauts d'épissage caractéristiques de la maladie (Arandel et al. 2017), ont été transduites par un vecteur lentiviral contenant une construction Tet-On GFP-MBNL1 Δ , permettant une expression du transgène dans les cellules uniquement suite à l'ajout de doxycycline (dox) dans le milieu (**Figure 37 D**). En absence de doxycycline, les myoblastes immortalisés DM1 transduits puis différenciés en myotubes présentent des défauts d'épissage de plusieurs transcrits notamment l'exon 78 de *DMD*, l'exon 5 de *MBNL1*, l'exon 7 de *NFIX*, l'exon 5 de *MBNL2* et l'exon 22 de *ATP2A1*, par rapport aux cellules musculaires contrôle (WT) différenciées. Ces défauts d'épissage sont significativement corrigés par l'expression de MBNL1 Δ après induction du transgène par la doxycycline, suggérant une récupération de protéines MBNL1 fonctionnelles dans les cellules musculaires DM1 traitées (**Figure 37 E et Figure 39**). L'analyse transcriptomique après séquençage global de l'ARN a mis en évidence de nombreuses dérégulations d'épissage dans les cellules DM1 comparées aux cellules WT. L'analyse a également confirmé que la grande majorité de ces événements dérégulés (81%) étaient normalisés (correction > 80%) ou

partiellement corrigés (entre 20 et 80%) par MBNL1 Δ , avec un niveau moyen de correction de l'épissage de 72% (**Figure 37 F haut**). Cependant, la correction par MBNL1 Δ de chaque événement d'épissage alternatif, qu'il soit exclu (61%) ou inclus (39%), n'est pas significativement corrélée avec la sévérité de la dérégulation de l'épissage observée dans les cellules DM1 ($R^2 = 0,003$, $P = 0,18$ et $R^2 = 0,0036$, $P = 0,079$, respectivement). Au niveau de l'expression génique, 72% des transcrits qui étaient dérégulés dans les myoblastes DM1 différenciés ont été normalisés ou partiellement corrigés par MBNL1 Δ , avec un niveau moyen de correction de 56% (**Figure 37 F bas**). L'analyse Gene Ontology (GO) de l'expression des gènes et de l'épissage alternatif a montré que les gènes qui subissent une correction ainsi que les gènes non corrigés étaient distribués uniformément, sans enrichissement majeur à travers les principaux processus biologiques qui sont dérégulés dans les cellules musculaires DM1 (**Figure 40**). Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que le transcriptome des cellules musculaires DM1 différenciées est globalement amélioré par l'expression de MBNL1 Δ .

La correction globale du transcriptome nécessite le retour à la normale de l'activité endogène des protéines MBNL1. Pour vérifier que ces corrections sont dues à la libération des protéines MBNL1 endogènes par l'action de notre outil leurre MBNL1 Δ , l'expression des ARNm de *MBNL1* et de *MBNL2* a été inhibée par l'utilisation d'ARN interférents dans des cellules musculaires WT ou DM1 exprimant ou non MBNL1 Δ (**Figure 37 D haut**). La transfection d'ARN interférents (siRNA) dirigés contre les ARNm de *MBNL1* et de *MBNL2* induit une réduction respective de 50% et de 70% des niveaux des transcrits *MBNL1* et *MBNL2*. L'effet est également confirmé par une diminution efficace des niveaux de protéines MBNL1 et MBNL2 (**Figure 41**). Comme attendu, la double extinction de MBNL1 et MBNL2 dans les cellules WT induit des défauts d'épissage des exon 78 de *DMD*, exon 5 de *MBNL1*, exon 7 de *NFIX*, exon 5 de *TNNT2*, exon 11 de *LDB3* et exon 25 de *SOS1* similairement à ceux observés dans les cellules DM1 (**Figure 37 G et 42**). Ces défauts d'épissage, consécutifs à la déplétion de MBNL1 et MBNL2 dans les cellules WT, ne sont pas corrigés par l'expression du leurre MBNL1 Δ , suggérant que l'activité résiduelle d'épissage ne suffit pas à compenser la perte de fonction de MBNL1 et MBNL2. De plus, la surexpression de MBNL1 Δ ne modifie pas les profils d'épissage alternatif des cellules musculaires WT (**Figure 37 G et 42**). En revanche, les corrections des défauts d'épissage des pré-ARN de *DMD*, *MBNL1*, *NFIX*, *TNNT2*, *LDB3* et *SOS1* dans les cellules DM1 exprimant MBNL1 Δ sont abolies suite à la déplétion des protéines MBNL1 et MBNL2. Ceci démontre que la libération des protéines MBNL endogènes séquestrées dans les *foci* est nécessaire à la correction des défauts d'épissage et soutient ainsi

que le mécanisme de leurre induit par MBNL1Δ permet la restauration d'une quantité suffisante de MBNL1 fonctionnelle dans les cellules DM.

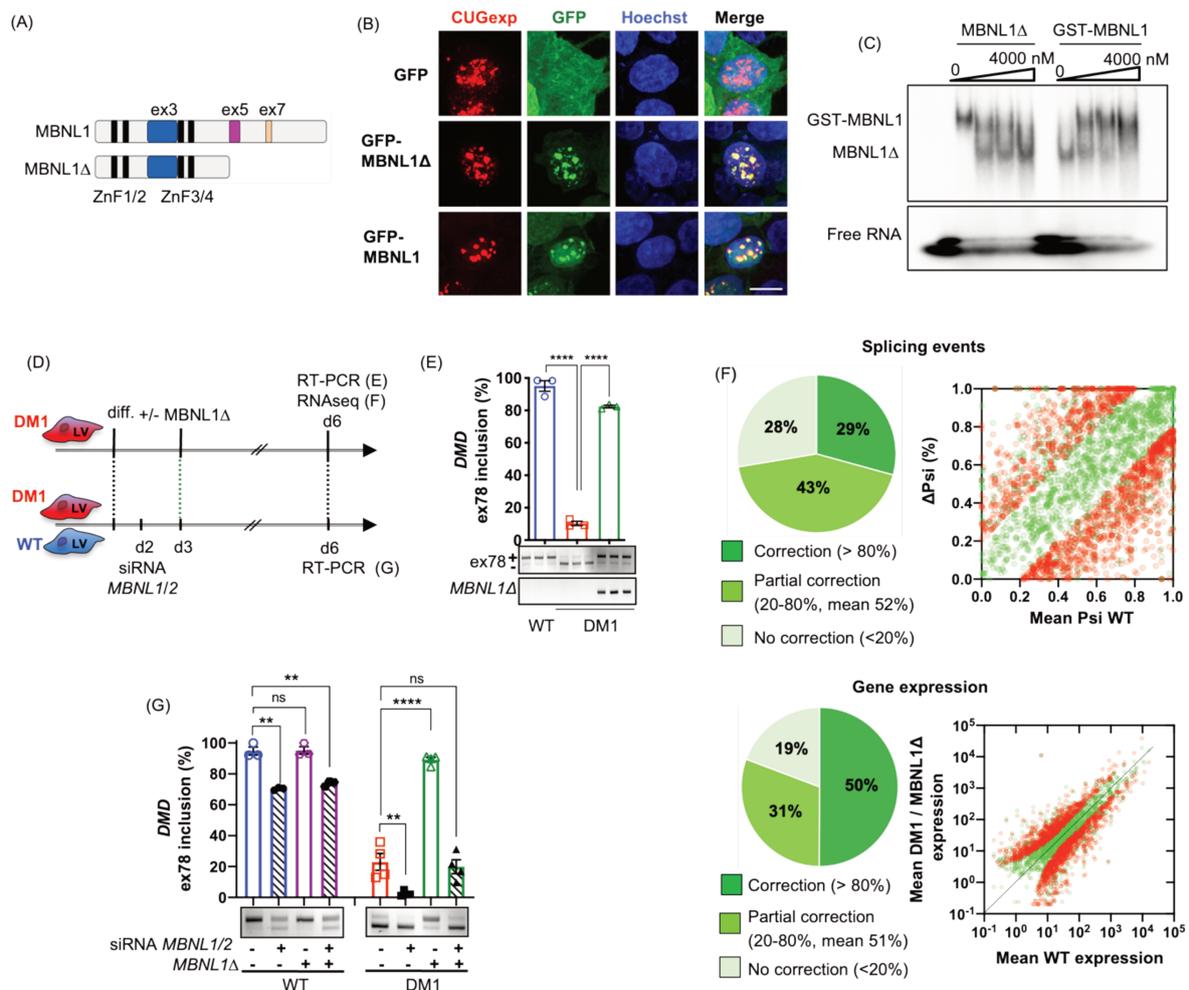


Figure 37 : MBNL1Δ corrige les défauts d'épissage alternatif et le transcriptome des cellules musculaires dérivées d'un patient DM1. A) Représentation schématique des protéines MBNL1 et MBNL1Δ. Le ZnF et les exons (ex) alternatifs 3, 5 et 7 sont indiqués par des cases noires, bleues, roses et oranges, respectivement. B) Images représentatives de *foci* d'ARN-CUGexp et MBNL1 ou MBNL1Δ visualisés par FISH/IF dans des cellules HeLa co-transfectées avec des plasmides exprimant 960 répétitions CTG et GFP-MBNL1 ou GFP-MBNL1Δ. Les *foci* d'ARN-CUGexp sont détectés avec une sonde Cy3-CAG (rouge), les protéines GFP-MBNL à l'aide d'un anticorps anti-GFP (vert) et les noyaux par coloration au Hoechst (bleu). Barre d'échelle, 10 μm. C) Compétition entre les protéines GST-MBNL1 et MBNL1Δ pour la liaison à l'ARN-CUGexp marqué au ³²P, déterminée par le test de déplacement de mobilité par électrophorèse. D) Plan expérimental. Des myoblastes DM1 immortalisés ont été transduits avec des vecteurs lentiviraux exprimant de manière conditionnelle GFP-MBNL1Δ(LV) et différenciés pendant 3 jours avant l'ajout de doxycycline, permettant l'expression de GFP-MBNL1Δ et une analyse plus poussée (E-F) au jour 6. Dans un dispositif expérimental comparable, des siRNA contre MBNL1 et MBNL2 ont été transfectés aux jours 2 et 3 de la différenciation (diff.) dans les cellules musculaires WT et DM1 (G). E) Correction du défaut d'épissage alternatif de l'exon 78 de *DMD* évaluée par RT-PCR dans les cellules musculaires DM1 différenciées exprimant GFP-MBNL1Δ (n = 3). Les données sont

analysées par One-way ANOVA suivie du test de Tukey (**** $P < 0,0001$). F) Les analyses transcriptomiques montrent la correction globale des défauts d'épissage (en haut) et la dérégulation de l'expression des gènes (en bas) dans les cellules musculaires DM1 exprimant GFP-MBNL1 Δ (n = 3) par rapport aux cellules musculaires WT (n = 6) et DM1 non traitées (n = 3). Les graphiques correspondants montrent la distribution des événements DM1 avant (rouge) et après (vert) le traitement par MBNL1 Δ . G) Correction des défauts d'épissage alternatif de l'exon 78 de *DMD* dans les cellules musculaires différenciées WT et DM1 exprimant ou non GFP-MBNL1 Δ et transfectées avec ou sans siRNA contre les ARNm *MBNL1* et *MBNL2* (n = 4). Les données ont été analysées par One-way ANOVA suivie du test de Tukey (*** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$; ns, non significatif).

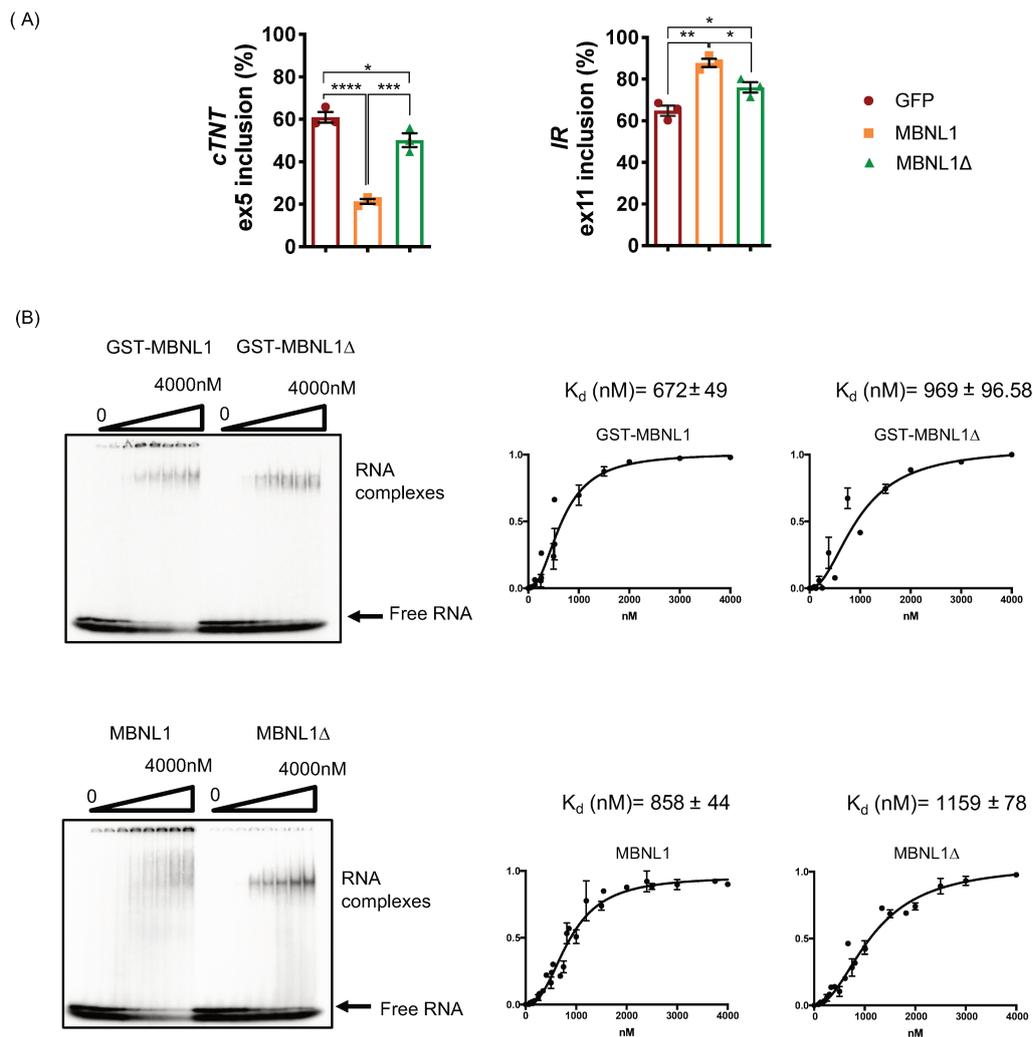


Figure 38 : MBNL1 Δ a une activité d'épissage réduite mais une affinité de liaison aux répétitions CUG similaire à celle de MBNL1. A) Analyse RT-PCR de l'épissage des minigènes *cTNT* exon 5 et *IR* exon 11 dans des cellules Hela co-transfectées avec des plasmides exprimant GFP, GFP-MBNL1 ou GFP-MBNL1 Δ (n = 3). Données analysées par One-way ANOVA suivie du test de Tukey (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). B) Électrophorèse à déplacement de mobilité représentative et courbes de liaison CUGexp utilisées pour évaluer la constante de dissociation apparente (K_d +/- s.d.) des protéines GST-MBNL1-His et GST-MBNL1 Δ doublement marquées (n = 5) et des protéines MBNL1 et MBNL1 Δ (n = 7).

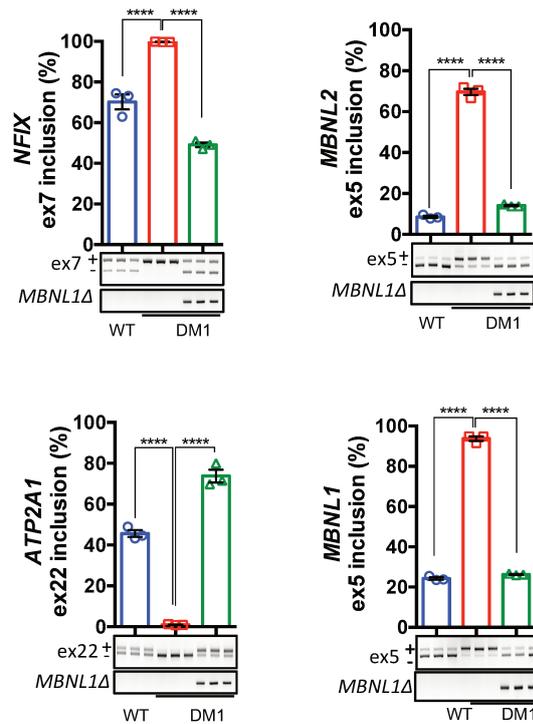


Figure 39 : MBNL1Δ corrige les événements d'épissage dérégulés dans les cellules musculaires DM1 différenciées. Correction de l'épissage alternatif de l'exon 7 de *NFIX*, de l'exon 5 de *MBNL2*, de l'exon 22 d'*ATP2A1*, de l'exon 5 de *MBNL2* et de l'exon 5 de *MBNL1* évaluée par RT-PCR dans les cellules musculaires DM1 différenciées exprimant GFP-MBNL1Δ par rapport aux cellules musculaires DM1 et WT différenciées non traitées (n = 3). Données analysées par One-way ANOVA suivie du test de Tukey. (**** $p < 0.0001$).

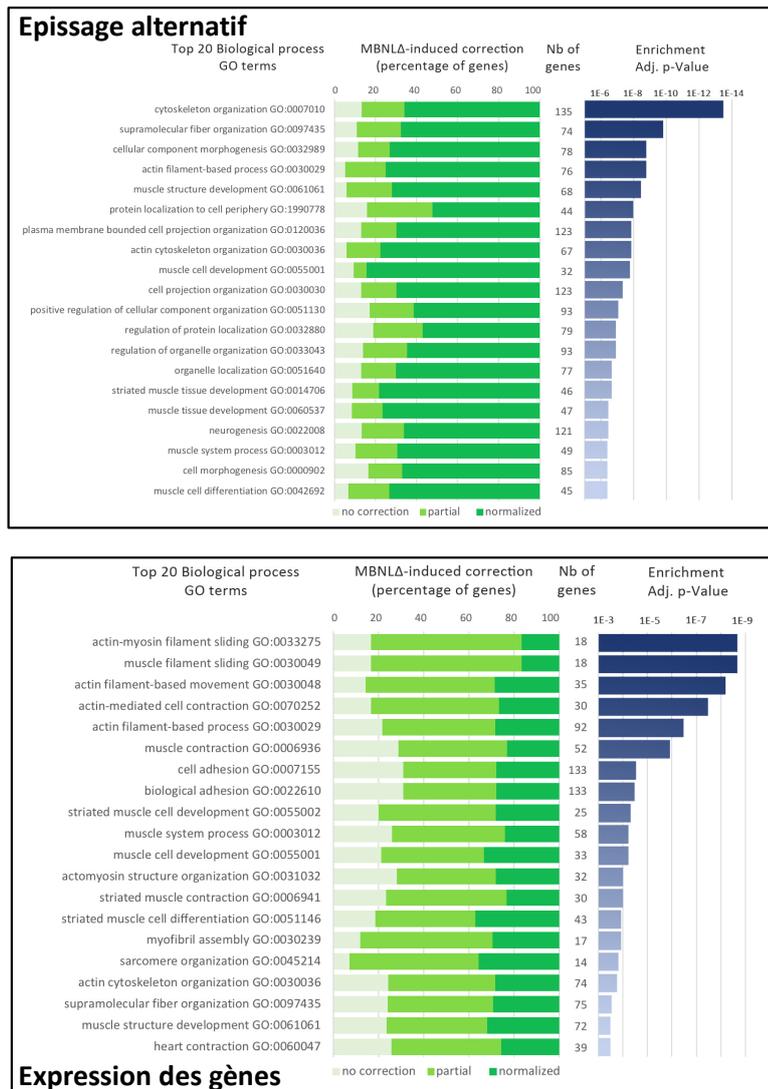


Figure 40 : Effets du traitement par MBNL1Δ sur les principaux processus biologiques dérégulés dans les cellules DM1. Liste des 20 principaux processus biologiques identifiés par RNAseq suite à l'analyse GO de l'épissage alternatif et de l'expression des gènes dans les cellules DM1 comparées aux cellules WT. Les nombres de gènes, la valeur P de chaque terme enrichi sont représentés en plus du pourcentage de gènes corrigés, partiellement corrigés ou non corrigés dans les cellules DM1 traitées par MBNL1Δ.

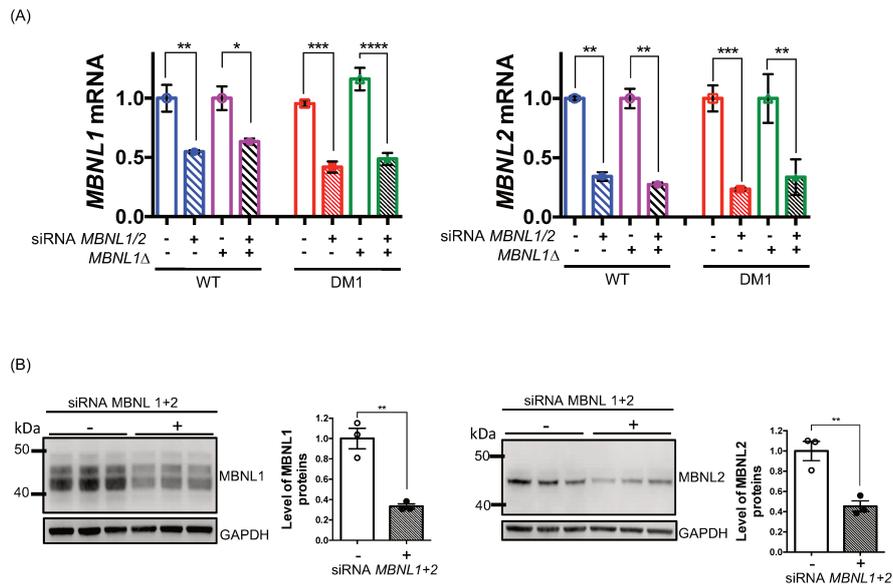


Figure 41 : MBNL1 Δ ne modifie pas l'expression endogène de MBNL. A) Des cellules musculaires différenciées WT ou DM1 ont été transfectées avec un mélange de siRNA dirigés contre les ARNm *MBNL1* et *MBNL2* au jour 2 et la GFP-MBNL1 Δ a été induite ou non par la doxycycline au jour 3. Les échantillons ont été analysés au jour 6. Niveaux d'ARNm *MBNL1* et *MBNL2* déterminés par RT-PCR quantitative dans les cellules musculaires WT, DM1 et DM1 traitées par MBNL1 Δ (n = 4). Données analysées par One-way ANOVA suivie du test de Tukey. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$). B) Niveau de protéines MBNL1 et MBNL2 déterminé par Western blot dans des cellules musculaires WT différenciées (n = 3). Données analysées par un test t de Student non apparié. (** $p < 0.01$).

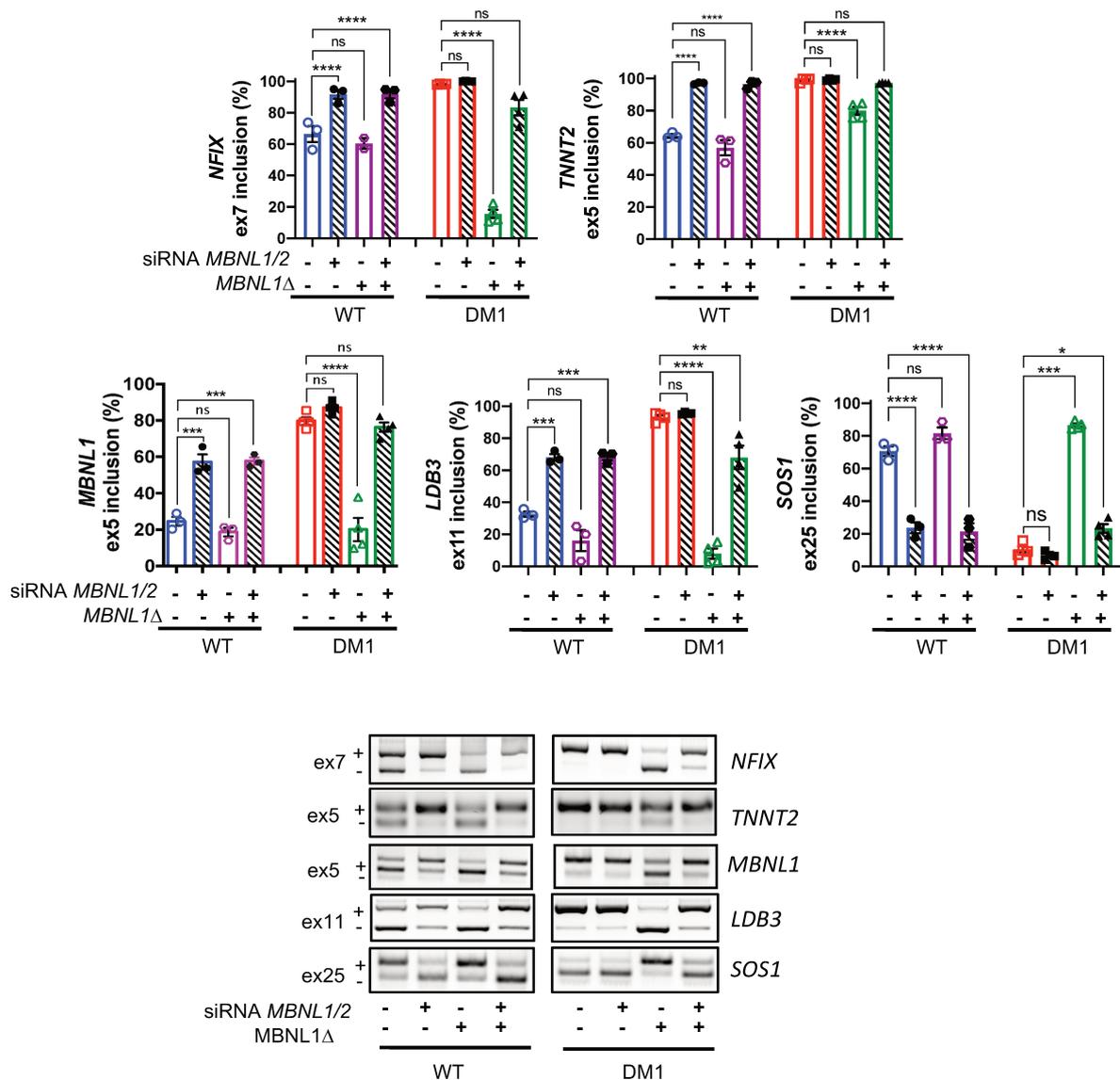


Figure 42 : La correction des défauts d'épissage de la DM1 par MBNL1Δ nécessite une activité fonctionnelle de MBNL1 endogène. Analyse des changements d'épissages alternatif de l'exon 7 de *NFIX*, de l'exon 5 de *TNNT2*, de l'exon 5 de *MBNL1*, de l'exon 11 de *LDB3* et de l'exon 25 de *SOS1* dans des cellules musculaires WT ou DM1 différenciées pendant 6 jours, transfectées avec ou sans siRNA dirigés contre les ARNm de *MBNL1* et *MBNL2* au jour 2 de différenciation et exprimant ou non GFP-MBNL1Δ au jour 3 (n = 3-4). Données analysées par One-way ANOVA suivie du test de Tukey (* $p < 0,1$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

V.2.3 Le leurre MBNL1 Δ interfère avec la dynamique des *foci*

Afin d'évaluer l'effet de l'expression de MBNL1 Δ sur l'interaction délétère entre les protéines MBNL1 et les répétitions CUGexp dans les cellules DM1, le comportement des *foci* et des protéines MBNL1 séquestrées a été examiné, par FISH et immunofluorescence, toutes les 2 heures, pendant 8h après l'induction du leurre GFP-MBNL1 Δ (**Figure 43 A**). Dans les cellules musculaires DM1 différenciées non traitées, MBNL1 colocalise avec les *foci* nucléaires CUGexp (**Figure 43 B et 44**). Après induction de GFP-MBNL1 Δ suite à l'ajout de doxycycline dans les cellules DM1, l'analyse par Western blot montre que l'expression de MBNL1 Δ augmente graduellement de 2 à 8h (**Figure 43 C**). Cette augmentation est associée à une colocalisation des protéines GFP-MBNL1 Δ avec les *foci* (**Figure 43 B et 43**). Parallèlement, le nombre moyen de *foci* par noyau diminue significativement, passant de 17 *foci* dans les cellules DM1 non traitées à 4 *foci* dans les cellules DM1 exprimant MBNL1 Δ (**Figure 43 D**). Une analyse par Northern blot confirme la réduction d'environ 50% des niveaux d'ARNm de *DMPK* muté dans les cellules DM1 traitées par MBNL1 Δ (**Figure 43 E, F**). Les défauts d'épissage observés dans les cellules DM1 sont dus à la séquestration de MBNL1 dans les *foci* (Fardaei et al. 2002). Nous avons quantifié l'intensité moyenne des protéines MBNL1 par *foci* et nous observons une réduction significative d'intensité dans les cellules DM1 exprimant MBNL1 Δ par rapport aux cellules DM1 non traitées (**Figure 43 G**). Une diminution globale de 80% de MBNL1 séquestrée par noyau corrèle avec la réduction du nombre de *foci* dans les cellules DM1 traitées par GFP-MBNL1 Δ (**Figure 43 H**). Conjointement, la libération de MBNL1 des *foci* d'ARN est associée à sa relocalisation dans le nucléoplasme des cellules DM1 traitées par rapport aux cellules DM1 non traitées (**Figure 43B et 44**). Ainsi, une correction progressive de différents défauts d'épissage dépendants de MBNL1 est observée dans les cellules musculaires DM1 traitées, confirmant la récupération d'une quantité suffisante de protéines MBNL1 fonctionnelles après traitement (**Figure 43 I, J et Figure 45**). Ces résultats soutiennent l'existence d'un mécanisme de leurre par lequel les protéines MBNL1 Δ entrent en compétition pour la liaison aux CUGexp, favorisant la libération de MBNL1 séquestrée et permettant ainsi de restaurer les profils d'épissage des transcrits cibles de MBNL1.

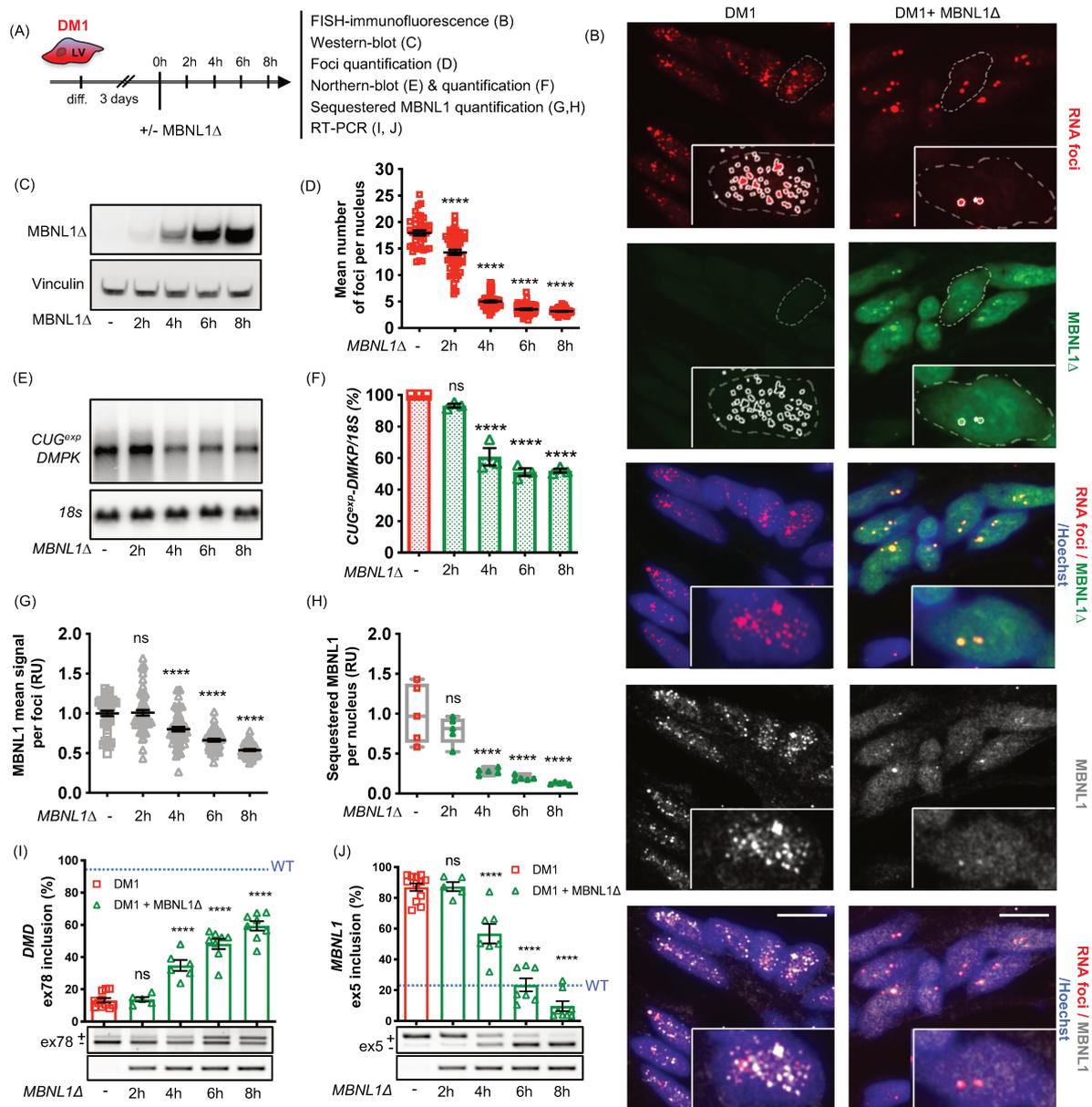


Figure 43 : La liaison de MBNL1Δ à CUGexp déplace MBNL1 endogène des *foci* d'ARN et réduit les niveaux de CUGexp-ARN dans les cellules musculaires dérivées de patients DM1. A) Plan expérimental. B) *Foci* d'ARN-CUGexp, MBNL1Δ et MBNL1 visualisés par des techniques de FISH et immunofluorescence dans des cellules musculaires DM1 différenciées exprimant ou non GFP-MBNL1Δ pendant 8h. Des images représentatives aux points t0 et 8 h ont été extraites à partir de la figure 44 montrant tous les points (0, 2, 4, 6, 8h). Les *foci* ARN-CUGexp ont été détectés avec une sonde Cy3-CAG (rouge), GFP-MBNL1Δ en utilisant un anticorps anti-GFP (vert), MBNL1 endogène avec un anticorps polyclonal dirigé contre la partie C-terminale de la protéine (gris) et les noyaux avec une coloration au Hoechst (bleu). Le périmètre des noyaux est représenté par une ligne pointillée dans les panneaux supérieurs et la région d'intérêt (ROI) identifiée pour l'analyse des *foci* est indiquée par des lignes blanches pleines. Barre d'échelle, 10 μm. C) Expression de GFP-MBNL1Δ dans les cellules musculaires DM1 après induction par la dox. D) Quantification du nombre moyen de *foci* par noyau dans les cellules musculaires DM1 après expression de MBNL1Δ. Les données ont été analysées par One-way ANOVA suivie du test de Tukey (****P < 0,0001). E-F) Niveaux de transcrits *DMPK*

mutés déterminés par Northern Blot dans les cellules musculaires DM1 différenciées après l'expression de MBNL1 Δ (n = 3). Les données ont été analysées par One-way ANOVA suivie du test de Tukey (****P < 0,0001). G-H) Intensité moyenne du marquage de MBNL1 par *foci* (G) et niveau moyen de MBNL1 séquestrée par noyau (H) (volume moyen du *foci* \times intensité moyenne de MBNL1 \times nombre de *foci* par noyau) quantifiés dans les cellules musculaires DM1 exprimant ou non MBNL1 Δ (n > 50 champs de 5 expériences et plus de 45 noyaux par n). Les données ont été analysées par One-way ANOVA suivie du test de Tukey (****P < 0,0001). I-J) Correction de l'épissage alternatif de l'exon 78 de *DMD* (I) et de l'exon 5 de *MBNL1* (J) évaluée par RT-PCR dans les cellules musculaires DM1 différenciées après l'expression de MBNL1 Δ (n \geq 5). Les données ont été analysées par One-way ANOVA suivie du test de Tukey (****P < 0,0001).

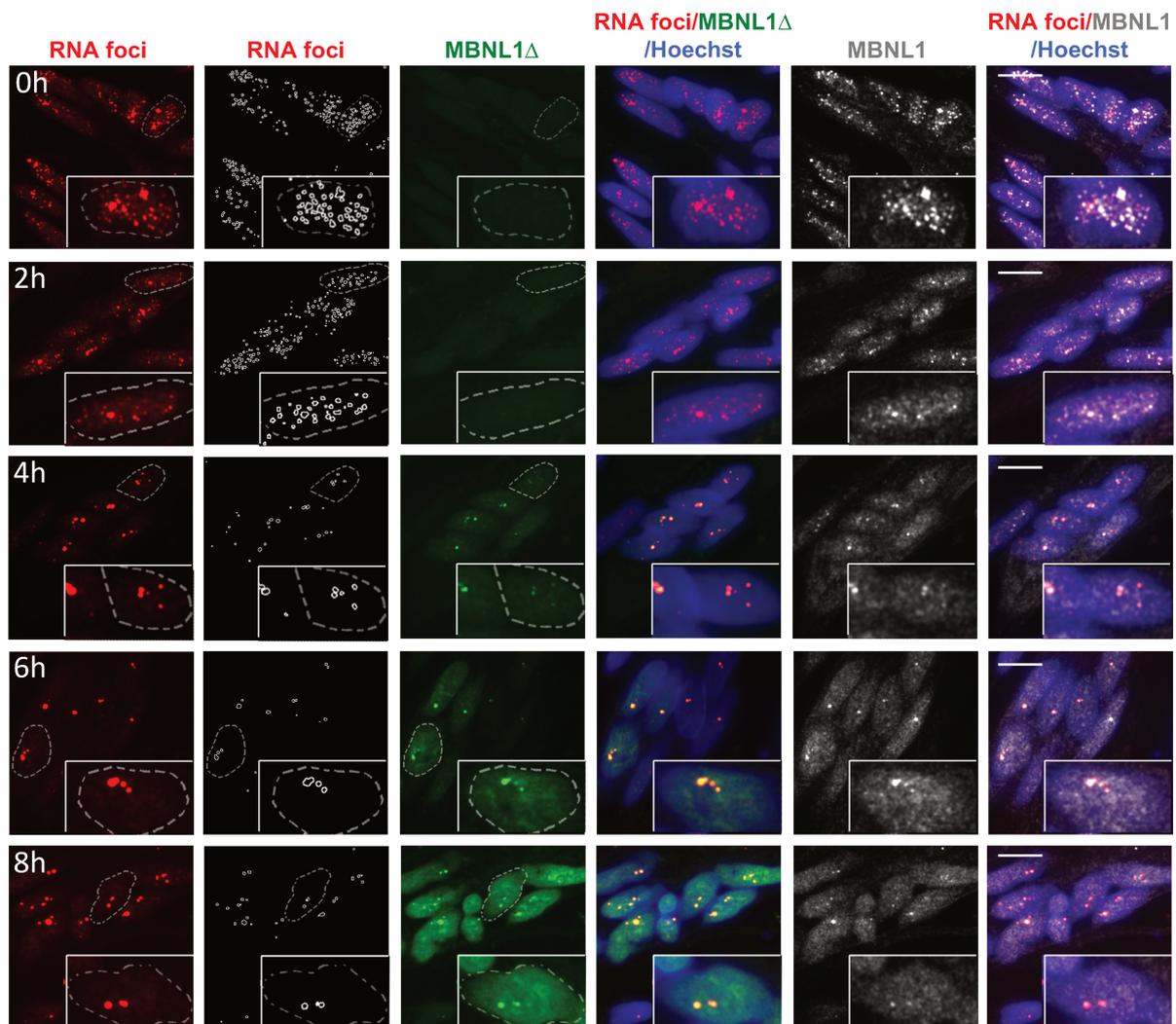


Figure 44 : Le leurre MBNL1 Δ interfère avec la dynamique des *foci*. Images représentatives d'un marquage combiné FISH/Immunofluorescence de cellules musculaires DM1 différenciées sur un parcours de 2 à 8 heures après l'induction de l'expression de GFP-MBNL1 Δ par rapport aux cellules musculaires DM1 non traitées. *Foci* d'ARN-CUGexp détectés avec une sonde Cy3-CAG (rouge), GFP-MBNL1 Δ (vert) MBNL1 endogène avec un anticorps dirigé contre la partie C-terminale de la protéine (gris) et noyaux avec coloration de Hoechst (bleu). *Foci* d'ARN dans la première colonne à partir de la gauche, identifiés par des contours blancs sur fond sombre

par le logiciel d'analyse d'image automatisé. Le périmètre du noyau est représenté par la ligne pointillée dans l'image agrandie. Barre d'échelle : 10 μ m

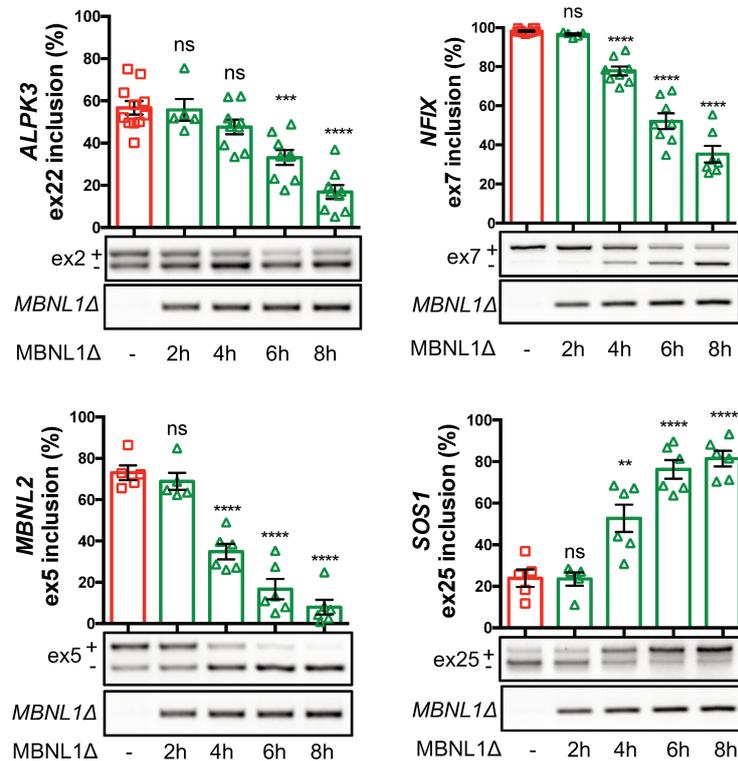


Figure 45 : Correction progressive des défauts d'épissage dépendants de MBNL1 dans les cellules DM1 après traitement par MBNL1 Δ . Analyse RT-PCR de la correction de l'épissage de l'exon 2 d'*ALPK3*, de l'exon 7 de *NFIX*, de l'exon 5 de *MBNL2* et de l'exon 25 de *SOS1* au cours du temps par le traitement MBNL1 Δ (n = 5-9) en comparaison aux cellules musculaires DM1 non traitées (n = 11). Données analysées par One-way ANOVA suivie du test de Tukey (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns : non significatif).

V.2.4 Le leurre MBNL1 Δ forme des agrégats CUGexp-RNA moins stables que MBNL1

Afin de mieux comprendre le mécanisme par lequel l'expression de MBNL1 Δ induit une réduction du nombre de *foci* CUGexp dans les cellules musculaires DM1, nous nous sommes intéressés au comportement de MBNL1 Δ dans les *foci* eux-mêmes. Des expériences de FRAP (ou *Fluorescence Recovery After Photobleaching*) réalisées dans des cellules musculaires différenciées DM1 exprimant soit les protéines marquées GFP-MBNL1 Δ soit GFP-MBNL1 montrent que MBNL1 Δ présente un demi-temps de récupération accru dans les *foci* CUGexp photoblanchis et une fraction plus élevée de molécules mobiles par rapport à MBNL1 (**Figure 46 A à E**). Par conséquent, la présence de la partie C-terminale de MBNL1 semble impliquée dans l'augmentation de la fraction de molécules immobiles, appuyant l'hypothèse que les structures formées par les ARN-CUGexp et MBNL1 Δ se comportent différemment des *foci* formés par les ARN-CUGexp et les protéines MBNL1. Afin d'évaluer les effets du leurre MBNL1 Δ sur la formation et la stabilité des *foci*, nous avons testé si les protéines MBNL1 Δ et MBNL1 modifient l'assemblage des répétitions d'ARN-CUGexp en grands amas sphériques (ou en gouttelettes par séparation de phases liquide-liquide (LLPS)). Ainsi, nous avons suivi, *in vitro*, le comportement des gouttelettes formées par des ARN contenant 46 répétitions (*ARN-CUG46*) marquées par fluorescence, en présence ou en l'absence de protéines recombinantes purifiées GST, RUVBL2, MBNL1 Δ ou MBNL1 (**Figure 46 F et Figure 47**). Comme montré dans des travaux précédemment publiés (Jain et Vale 2017), les *ARN-CUG46* forment des gouttelettes rondes et dynamiques, avec une grande mobilité dans la solution. L'ajout des protéines recombinantes purifiées MBNL1 aux *ARN-CUG46* modifie la forme de ces gouttelettes et forme des structures filamenteuses et allongées (**Figure 46 G**). De plus, le nombre des gouttelettes est fortement augmenté par rapport à la condition *ARN-CUG46* seule ou en présence des autres protéines recombinantes telles que GST ou RUVBL2, montrant que la formation de ces gouttelettes est due à la présence des protéines recombinantes MBNL1 (**Figure 46 G et Figure 47**). Nous observons également que les structures *CUG46*/MBNL1 sont statiques et ont une mobilité réduite. A contrario, la présence de MBNL1 Δ conduit à la formation de gouttelettes de forme moins allongée et plus ronde, avec des structures filamenteuses moins ramifiées que celles formées avec MBNL1 ainsi qu'une mobilité plus élevée (**Figure 46 G et H**). Alors que 69% des structures ARN-CUGexp/MBNL1 étaient déjà immobiles à 0,5h et jusqu'à 92% après 8h, la fraction immobile des structures ARN-CUGexp/MBNL1 Δ augmente progressivement de 12% à 0, h à 63% après 8h, et se stabilise jusqu'à 12h, ce qui indique que la composition des gouttelettes influence leurs propriétés

biophysiques (**Figure 46 H**). Par ailleurs, MBNL1 Δ forme environ deux fois moins d'objets à 0,5, 4 et 8h comparativement au nombre d'objets formés par MBNL1. De plus, la taille des gouttelettes formées par MBNL1 Δ est sensiblement réduite par rapport à celles formées par MBNL1. De plus, la majorité des gouttelettes formées par MBNL1 Δ sont de petite taille (avec une réduction importante de gouttelettes de grosse taille) comparativement aux gouttelettes formées par MBNL1, présentant une répartition d'environ 50% de gouttelettes de grande taille et 50% de gouttelettes de moyenne à petite taille (**Figure 46 I et J**). Les protéines MBNL1 et MBNL1 Δ ont la capacité de se lier aux répétitions CUG de par la présence des motifs ZnF. Leurre MBNL1 Δ semble moins capable de former des amas sphériques avec l'ARN-CUGexp que MBNL1. Ces résultats suggèrent que la présence de la partie C-terminale de la protéine MBNL1 favorise l'agrégation et la stabilisation de l'ARN-CUGexp et les protéines MBNL1 Δ forment des structures d'ARN plus mobile et instables. Cette stabilité et cette dynamique différentielle peuvent conduire à la réduction des niveaux de transcrits *CUGexp-DMPK* mesurés dans les cellules DM1 après traitement par MBNL1 Δ .

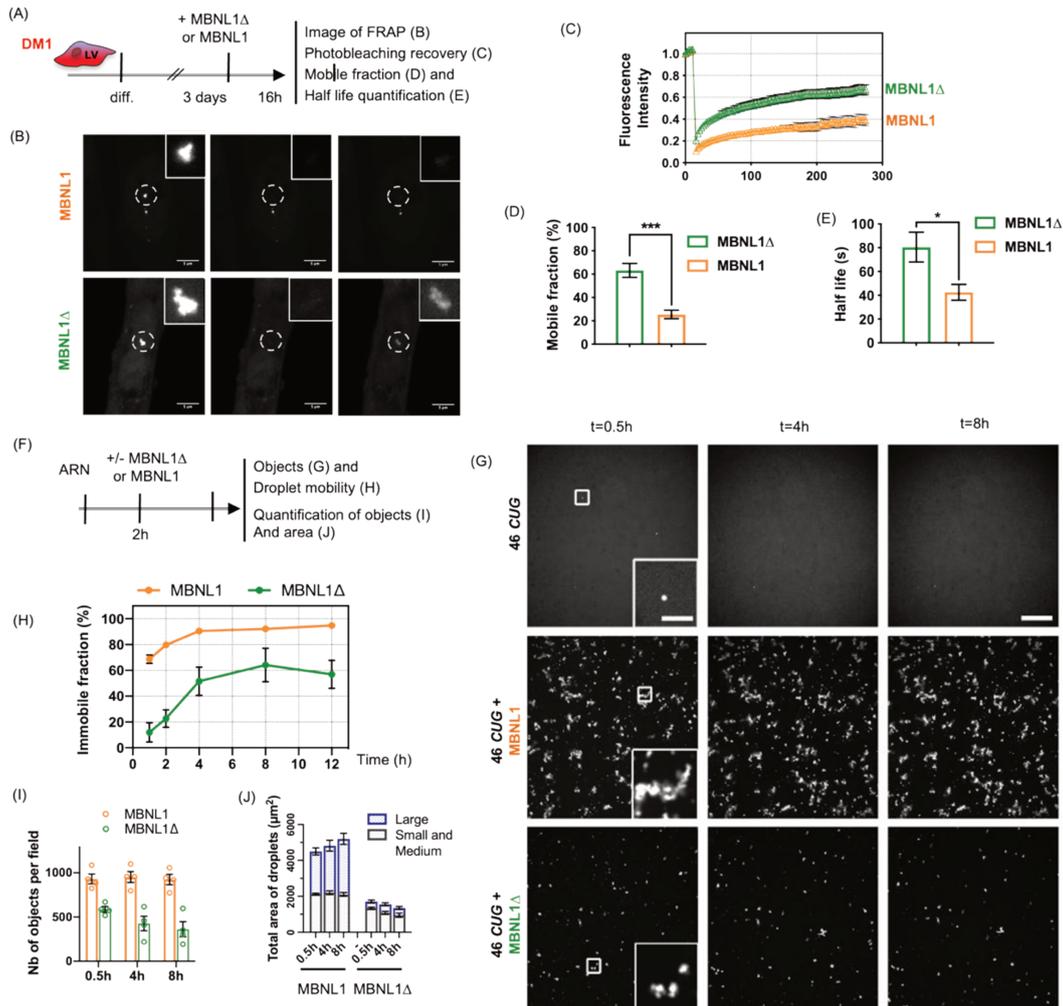


Figure 46 : MBNL1 Δ forme des complexes ARN-CUGexp moins stables que MBNL1. A) Expériences de récupération de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) sur des lignées cellulaires DM1 exprimant GFP-MBNL1 ou GFP-MBNL1 Δ . B) Les images représentatives de l'expérience FRAP montrent l'empilement en z des points de temps de pré-blanchiment, blanchiment et plateau post-blanchiment dans les cellules exprimant GFP-MBNL1 Δ ou GFP-MBNL1. C) Les courbes de récupération des *foci* photo-blanchis sont représentées sous forme d'intensité fluorescente normalisée en fonction du temps. Chaque point de donnée correspond à la moyenne d'au moins 25 *foci*, les barres d'erreur indiquent la SEM. D-E) Quantification des fractions mobiles et temps de demi-vie de récupération obtenus par analyse de régression non linéaire. Moyenne \pm SEM pour au moins $n = 25$ *foci*. La significativité a été testée avec un Student t-test non apparié (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$). F) Schéma expérimental de l'expérience de formation de gouttelettes d'ARN *in vitro* en présence des protéines recombinantes MBNL1 ou MBNL1 Δ . G) Images représentatives de la formation de gouttelettes d'ARN fluorescentes en présence des protéines recombinantes MBNL1 ou MBNL1 Δ à différents moments. MBNL1 ou MBNL1 Δ (2,5 mM) ont été ajoutés à 500 nM de Cy3-CUG46 dans un tampon de formation de gouttelettes contenant 100 nM de NaCl. Grossissement, $\times 40$; barre d'échelle, 50 μm ; barre d'échelle dans l'insert, 10 μm . H) Pourcentage de fraction immobile (%) des gouttelettes d'ARN à différents temps après l'ajout des protéines recombinantes MBNL1 ou MBNL1 Δ . I) Quantification du nombre de gouttelettes d'ARN fluorescentes en présence des protéines recombinantes MBNL1 ou MBNL1 Δ . J) Quantification

de la surface occupée par les gouttelettes d'ARN en présence des protéines recombinantes MBNL1 ou MBNL1 Δ .

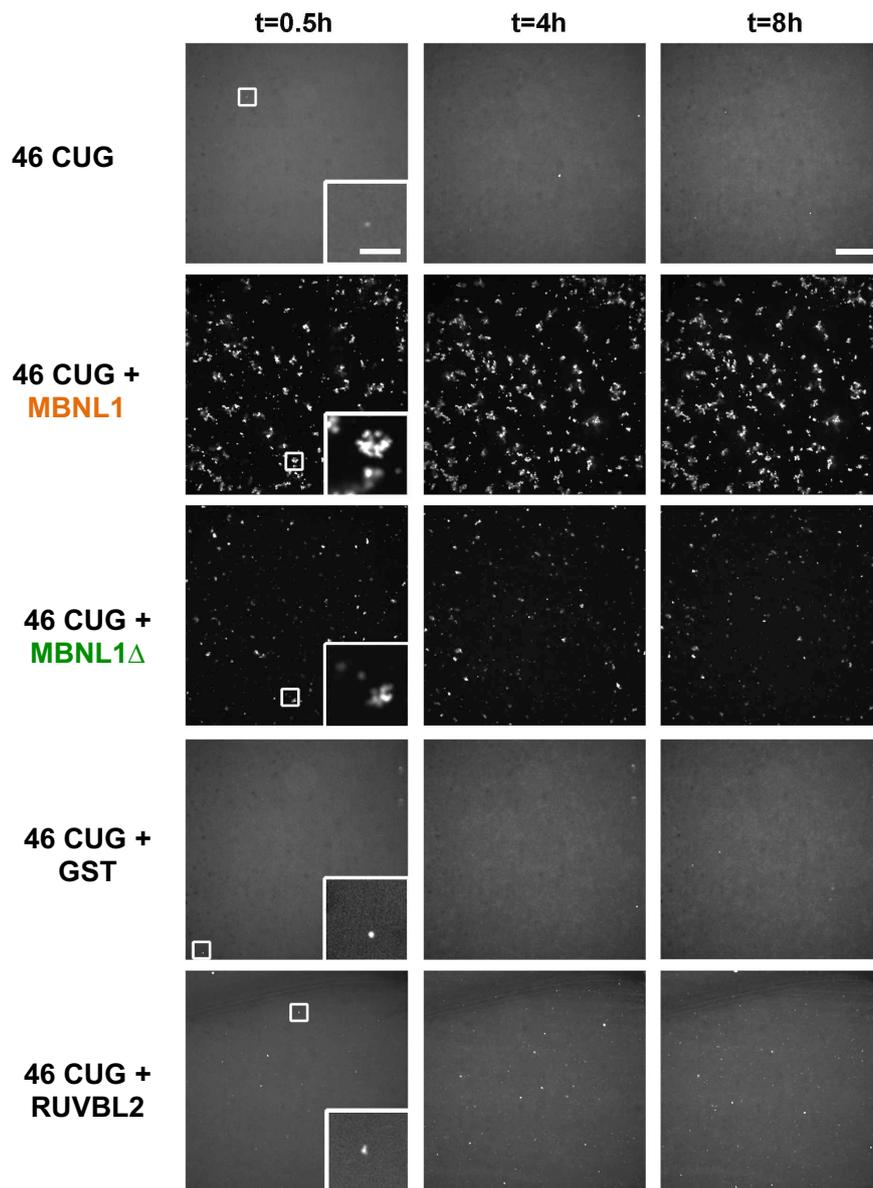


Figure 47 : Comportement des complexes CUGexp-ARN en présence de protéines recombinantes. Images représentatives de la formation de gouttelettes d'ARN fluorescentes en l'absence ou en présence des protéines recombinantes MBNL1, MBNL1 Δ , GST ou RUVBL2 à différents moments. Les protéines recombinantes de MBNL1, MBNL1 Δ , GST ou RUVBL2 ont été ajoutées à l'ARN marqué Cy3-CUG 46 dans un tampon de formation de gouttelettes. Grossissement 40x ; Barre d'échelle 50 μ m ; Barre d'échelle dans l'insert 10 μ m.

V.2.5 Effet de l'expression de MBNL1 Δ dans le muscle squelettique de souris sauvage (WT)

Pour transposer notre stratégie de leurre *in vivo*, la construction GFP-MBNL1 Δ a été encapsidée dans un vecteur AAV9 recombinant assurant une transduction et une expression du transgène efficace dans le muscle squelettique (Zincarelli et al. 2008). Dans un premier temps, les muscles gastrocnémiens (GA) de souris sauvage (WT) ont été injectés en intramusculaire (IM) avec les vecteurs AAV-GFP-MBNL1 Δ ou AAV-GFP à un titre de 1×10^{11} vg, tandis que les muscles controlatéraux ont été injectés avec une solution saline (**Figure 48 A**). Cinq semaines post-injection, les muscles injectés avec AAV-GFP-MBNL1 Δ ou AAV-GFP ne présentent aucun changement histologique comparativement à la condition saline (**Figure 48 B**). Cependant, l'injection de vecteur AAV-GFP-MBNL1 à 1×10^{11} vg qui permet la correction des défauts d'épissage dans le modèle murin HSA^{LR} (Kanadia et al. 2006) (**Figure 49 A**), conduit à des dommages musculaires chez les souris WT avec la présence de 35% de fibres présentant des noyaux centralisés (**Figure 47 B et C**). Or, la présence de fibres centronucléées est un marqueur d'un processus de dégénérescence et régénération suite à un dommage musculaire. Deux et trois semaines après l'injection de l'AAV-GFP-MBNL1, l'analyse Hématoxyline Eosine (HE) montre une régénération massive et l'analyse par qPCR semble confirmer ce processus avec la réexpression dans le muscle des marqueurs précoces de la myogenèse tels que les transcrits *MyoG* et *Myh8* (**Figure 48 B et C**). A contrario, cette régénération musculaire n'est pas observée dans les muscles des souris WT suite à l'injection de l'AAV-GFP-MBNL1 Δ . De plus, l'analyse par Western blot ne montre pas de différence de niveau de MBNL1 endogène suite à l'expression exogène de GFP-MBNL1 Δ (ou de la GFP) par rapport aux muscles injectés avec la solution saline (**Figure 47 D et Figure 49 A**). Nous avons ensuite vérifié que la surexpression exogène de MBNL1 Δ ne modifie pas le profil d'épissage d'un panel de gènes dérégulés dans la DM1 (Nakamori et al. 2013; Tanner et al. 2021). L'analyse par RT-PCR de 23 événements anormalement épissés dans la DM1 et régulés par MBNL1 ne montre aucune modification dans les muscles WT exprimant soit l'AAV-GFP-MBNL1 Δ (**Figure 48 E**) soit l'AAV-GFP (**Figure 50 B et C**). L'indice composite d'épissage dérivé des 23 événements d'épissage testés confirme d'ailleurs les résultats individuels (**Figure 48 F**). Pour approfondir notre analyse et examiner d'autres effets liés à l'expression exogène de GFP-MBNL1 Δ , un séquençage à haut-débit de l'ARN a été réalisé sur des échantillons de muscle GA de souris WT injectées avec l'AAV-GFP-MBNL1 Δ , l'AAV-GFP ou une solution saline. L'analyse des événements d'épissage alternatif différentiellement dérégulés (P ajusté < 0,05, $|\Delta\Psi| > 0,2$) a montré que seuls 12 gènes

sont modifiés par l'expression de MBNL1 Δ (Annexe 2). Parmi ces gènes, deux étaient également modulés dans les muscles traités par l'AAV-GFP (parmi seulement 11 événements d'épissage retrouvés modifiés) (Annexe 2). Par ailleurs, deux sont également dérégulés dans les muscles des souris *MBNL1*^{-/-} ; *MBNL2*^{-/+} dans lesquelles 970 événements ont été identifiés (Tanner et al. 2021). L'analyse de l'expression globale des gènes a montré que les changements (P ajusté $< 0,05$, $|\log_2 \text{fold change (FC)}| > 1$) induits par AAV-GFP-MBNL1 Δ étaient restreints par rapport à ceux induits par l'AAV-GFP (**Figure 48 G**). De plus, le nombre de transcrits identifiés par la méthode Crosslinking/Immunoprécipitation/Sequencing (CLIP) comme étant des cibles directes de MBNL1 (Wang et al. 2012a) et les transcrits riches en CUG contenant des tailles de répétitions CUG supérieures à 7 qui sont dérégulés dans les muscles injectés par AAV-GFP-MBNL1 Δ (40 et 18, respectivement), n'ont pas augmenté par rapport aux muscles injectés par AAV-GFP (57 et 27, respectivement). L'analyse GO des gènes différentiellement modifiés a montré que les 20 principaux processus biologiques modifiés dans les muscles WT exprimant l'AAV-GFP-MBNL1 Δ ou l'AAV-GFP sont liés à la réponse immunitaire (**Figure 51**). Aucune voie liée à une dysfonction musculaire n'a été mise en évidence chez les souris WT exprimant MBNL1 Δ , conformément à l'analyse histologique qui ne montre aucun dommage musculaire (**Figure 48 B**). Globalement, ces résultats montrent que l'expression de MBNL1 Δ n'induit pas d'effets délétères dans les muscles squelettiques des souris WT.

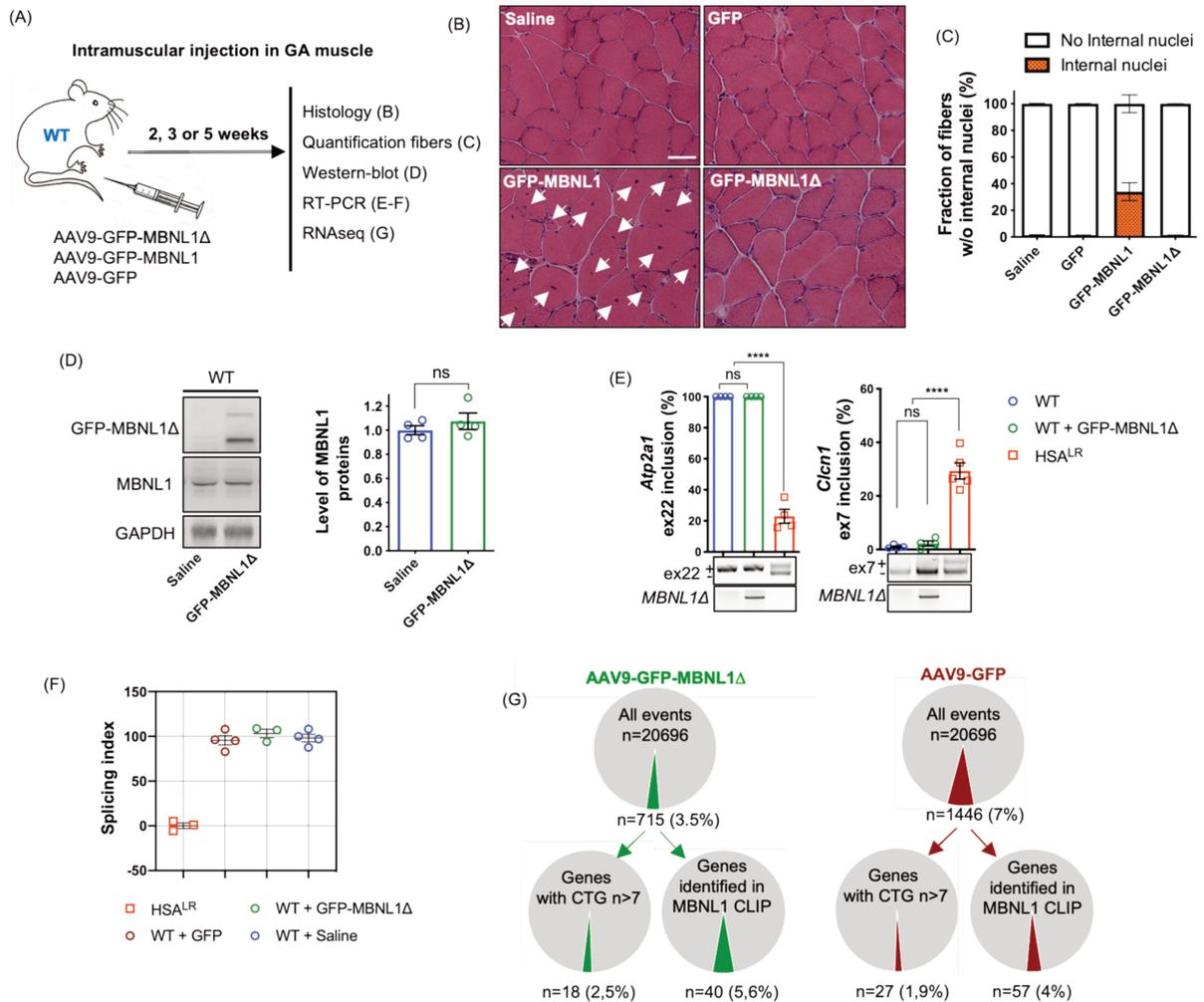


Figure 48 : L'expression de MBNL1Δ à l'aide de vecteurs AAV n'a pas d'effet délétère chez les souris WT. A) Plan d'expérience. Les muscles GA de souris FVB (WT) ont été injectés avec les vecteurs AAV9-GFP-MBNL1Δ, AAV9-GFP-MBNL1 ou AAV9-GFP (1×10^{11} vg, $n = 4$) pendant 5 semaines. Les muscles controlatéraux ont reçu une solution saline. B) Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E) réalisée sur des sections de gastrocnémien. Les noyaux centronucléés des fibres sont indiqués par des flèches blanches. C) Fraction de fibres avec ou sans (w/o) noyaux centralisés après une seule injection intramusculaire ($n = 1\ 500$ fibres par muscle. Barre d'échelle, $30\ \mu\text{m}$). D) Niveau de protéines MBNL1 dans les muscles de souris WT injectés avec AAV9-GFP-MBNL1Δ ou une solution saline, déterminé par Western blot ($n = 4$). Les données ont été analysées par un Student t-test non apparié. E) Profils d'épissage de l'exon 7a de *Clcn1* et de l'exon 22 d'*Atp2a1* évalués par RT-PCR chez des souris WT, 5 semaines après l'injection intramusculaire d'AAV9-GFP-MBNL1Δ par rapport aux muscles controlatéraux injectés avec une solution saline ou des muscles de souris HSA^{LR} ($n = 3$). Les données ont été analysées par One-way ANOVA suivie du test de Tukey (**** $P < 0,0001$). F) Indice composite d'épissage dérivé de 23 événements d'épissages dépendants de MBNL1 et dérégulés dans la DM1, puis analysés dans les muscles de souris WT injectés avec AAV9-GFP-MBNL1Δ, AAV9-GFP ou une solution saline. G) Expression différentielle (P ajusté $< 0,05$, $|\log_2\text{FC}| > 1$) dans le muscle de souris WT injecté avec AAV9-GFP-MBNL1Δ ou AAV9-GFP (partie supérieure) et expression différentielle des gènes contenant soit des séquences répétées CTGn ($n \geq 7$) ou identifiés par CLIP comme cibles directes de MBNL1 (partie inférieure).

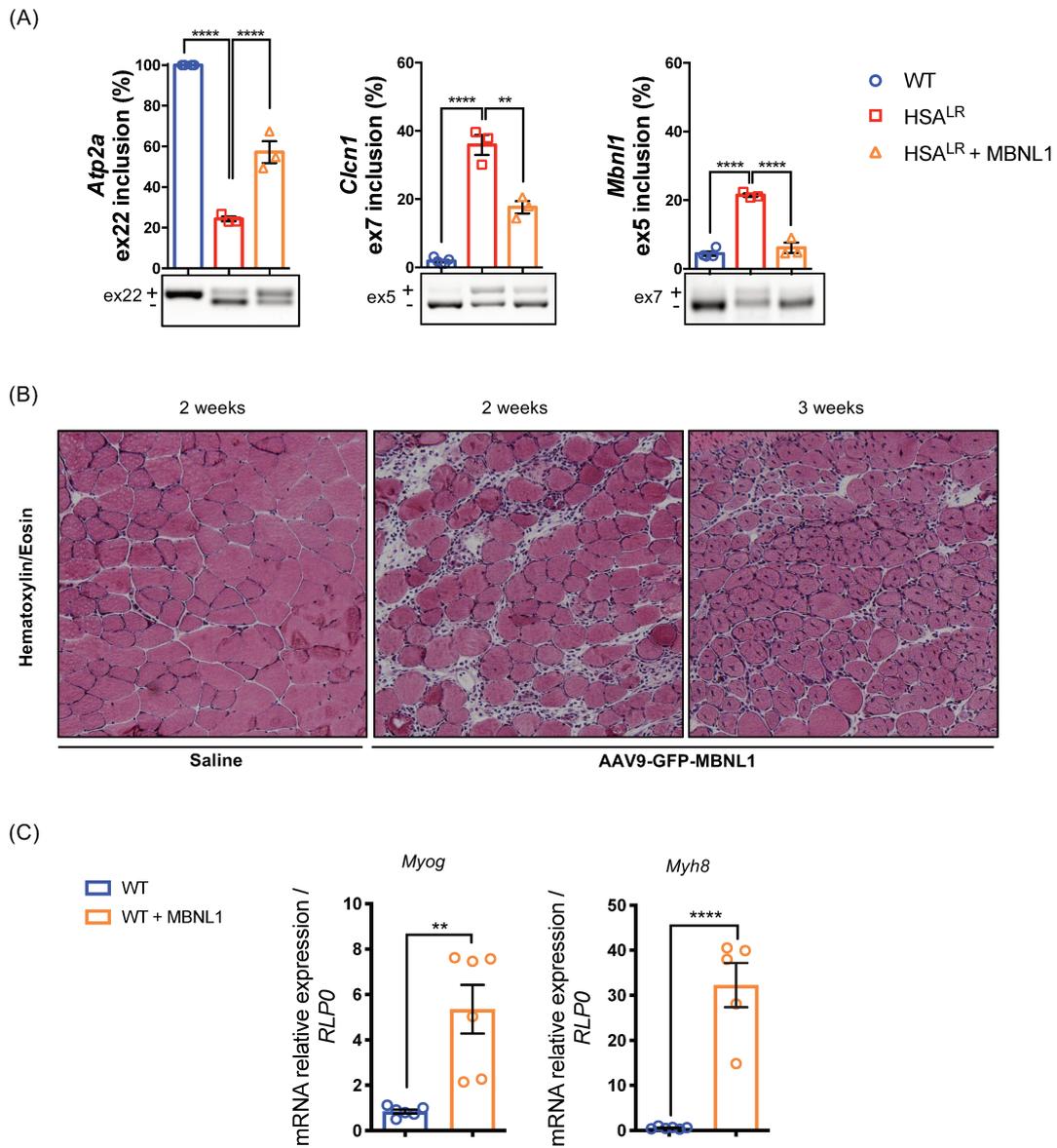


Figure 49 : La surexpression de MBNL1 corrige les défauts d'épissage dans la souris HSA^{LR} mais induit une toxicité dans la souris WT. A) Correction de l'épissage alternatif de l'exon 22 d'*Atp2a1*, de l'exon 7a de *Clcn1* et de l'exon 5 de *Mbnl1* évaluée par RT-PCR dans le Gastrocnémien de souris HSA^{LR} après injection intramusculaire d'AAV9-GFP-MBNL1 (1×10^{11} vg, n = 3) et comparée au muscle controlatéral injecté avec une solution saline ou au muscle de souris WT (n = 4). Données analysées par One-way ANOVA suivie du test de Tukey (**** $p < 0,0001$). B) Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (HE) réalisée sur des sections de muscle GA de souris WT injecté avec des vecteurs AAV9-GFP-MBNL1 (1×10^{11} vg) ou une solution saline pendant 2 ou 3 semaines. C) Expression de *Myog* et *Myh8* mesurée par RT-qPCR dans les muscles FVB injectés avec AAV9-GFP-MBNL1 ou une solution saline à 2 semaines.

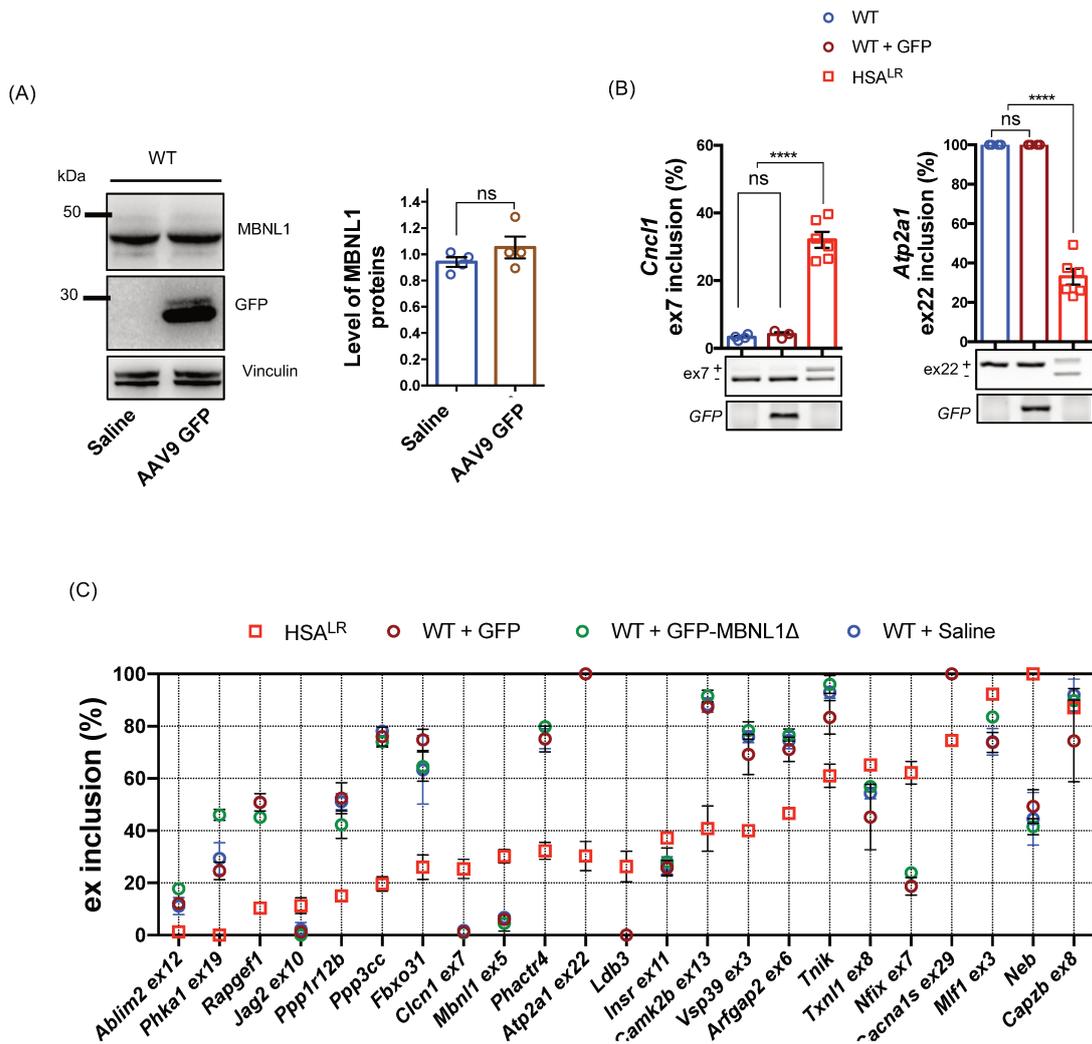
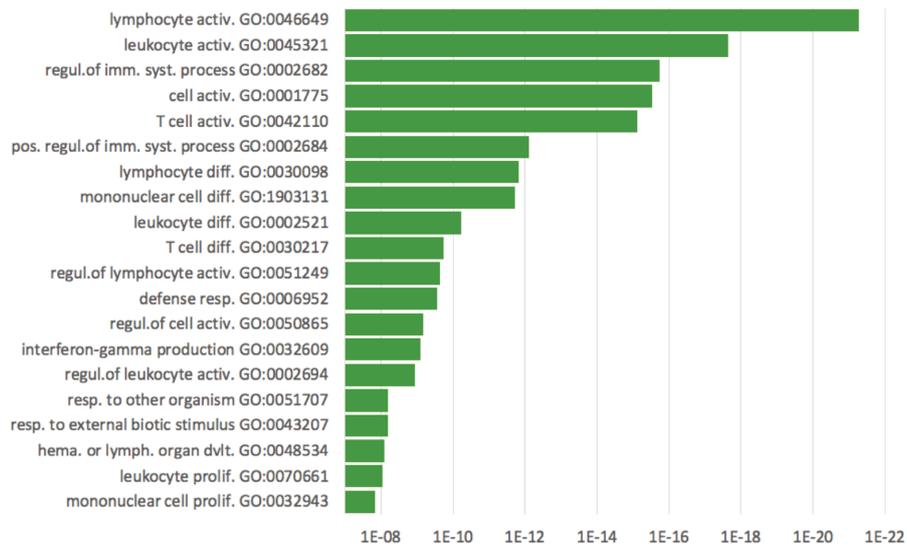


Figure 50 : La surexpression de la GFP et GFP-MBNL1Δ n'impacte ni le niveau de MBNL1, ni l'épissage alternatif. A) Western blot représentatif et quantification du niveau de protéine MBNL1 dans les muscles Gastrocnémiens WT cinq semaines après l'injection intramusculaire d'AAV9-GFP (1×10^{11} vg ; $n = 4$) ou de solution saline. Données analysées par un test t de Student non apparié (ns : non significatif). B) Profils d'épissage de l'exon 7a de *Cnc1* et de l'exon 22 d'*Atp2a1* évalués par RT-PCR dans les muscles de souris WT cinq semaines après l'injection intramusculaire d'AAV9-GFP (1×10^{11} vg) comparés à des muscles controlatéraux injectés par une solution saline ou des muscles de souris HSA^{LR} ($n = 3-6$). Données analysées par One-way ANOVA suivie du test de Tukey (**** $p < 0,0001$). C) Modulation de 23 événements dérégulés dans la DM1 dépendants de MBNL1 dans les muscles GA de souris WT injectées avec AAV9-GFP-MBNL1Δ ou AAV9-GFP par rapport à des muscles controlatéraux injectés avec une solution saline ou des muscles de souris HSA^{LR} ($n = 3$).

Processus biologiques dans les muscle de souris WT injectées par l'AAV-GFP-MBNL1Δ



Processus biologiques dans les muscle de souris WT injectées par l'AAV-GFP

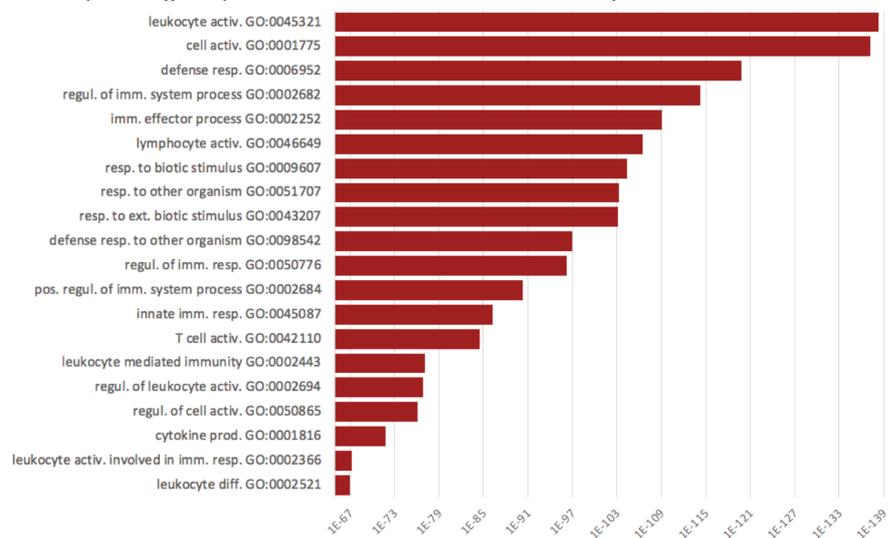


Figure 51 : Liste des 20 processus biologiques les plus importants dans les muscles de souris WT injectés avec l'AAV-GFP-MBNL1Δ (haut) ou l'AAV-GFP (bas)

V.2.6 Le leurre MBNL1 Δ corrige le phénotype musculaire de la maladie chez les souris DM1

Pour déterminer l'efficacité thérapeutique du leurre MBNL1 Δ *in vivo*, nous avons utilisé le modèle murin HSA^{LR} qui exprime 220 répétitions CTG dans le 3' UTR du transgène d'actine squelettique humaine (*ACTA1*). Comme décrit précédemment, cette souris récapitule plusieurs caractéristiques de la DM1 dans les muscles squelettiques, telles que la présence de *foci*, des défauts d'épissage liés à la perte de fonction de MBNL1 et une myotonie quantifiable (Mankodi et al. 2000). Les muscles gastrocnémiens (GA) de souris HSA^{LR} adultes ont été injectés avec des vecteurs AAV9-GFP-MBNL1 Δ à une dose de 1×10^{11} vg, alors que le GA controlatéral a reçu une solution saline (**Figure 52 A**). Sept semaines post-injection, une expérience d'immunofluorescence permettant de détecter les protéines GFP-MBNL1 Δ combinée à une FISH a été réalisée sur des coupes musculaires et montre que la GFP-MBNL1 Δ colocalise avec les *foci* CUGexp dans les noyaux des muscles traités (**Figure 52 B**). Puis, nous avons quantifié individuellement l'effet du traitement sur les 23 événements d'épissages dépendants de MBNL1 identifiés comme dérégulés dans les muscles de souris HSA^{LR} et de souris KO-MBNL1 (Nakamori et al. 2013; Tanner et al. 2021) (**Figure 52 C**). Afin de visualiser le niveau de correction global, l'indice composite d'épissage qui dérive des 23 événements testés montre que le traitement par MBNL1 Δ permet une correction globale de 66% des événements d'épissage alternatif (**Figure 52 D**). Étant donnée la correction du profil d'épissage de l'exon 7a de *Cln1*, dont la dérégulation est responsable de la myotonie observée chez les souris HSA^{LR} (Wheeler et al. 2007), nous avons vérifié l'effet thérapeutique sur la myotonie par une expérience de mesure de relaxation musculaire *in situ*. Sept semaines après l'injection, l'augmentation du temps de relaxation mesuré dans les muscles de souris HSA^{LR} est normalisé dans les muscles de souris traitées avec MBNL1 Δ (**Figure 52 E et F**). Afin d'étendre cette stratégie à une autre RBP présentant une forte affinité pour les répétitions CUGexp (Fardaei et al. 2002), nous avons conçu un second leurre, issu du paralogue MBNL2, en se basant sur la même stratégie qui a permis de générer MBNL1 Δ . Ainsi, MBNL2 Δ contenant le domaine de liaison à l'ARN mais dépourvu également de la partie C-terminale de MBNL2, a été vectorisé dans un vecteur AAV9 et injecté localement dans le muscle GA de souris HSA^{LR}. De manière similaire à MBNL1 Δ , l'effet de MBNL2 Δ a été évalué sur le même panel d'événements d'épissage dérégulés et dépendants de MBNL1 (**Figure 53**). L'indice composite d'épissage ainsi généré montre une correction globale de 67% après traitement par MBNL2 Δ (**Figure 52 G**). Ainsi, les résultats, obtenus sur le modèle murin de la DM1, suggèrent que les RBP

modifiées qui possèdent une grande affinité pour les CUGexp sont des molécules intéressantes pouvant jouer le rôle de leurre pour le déplacement de MBNL1 des *foci*, et permettent de corriger les défauts d'épissage dépendants de MBNL1.

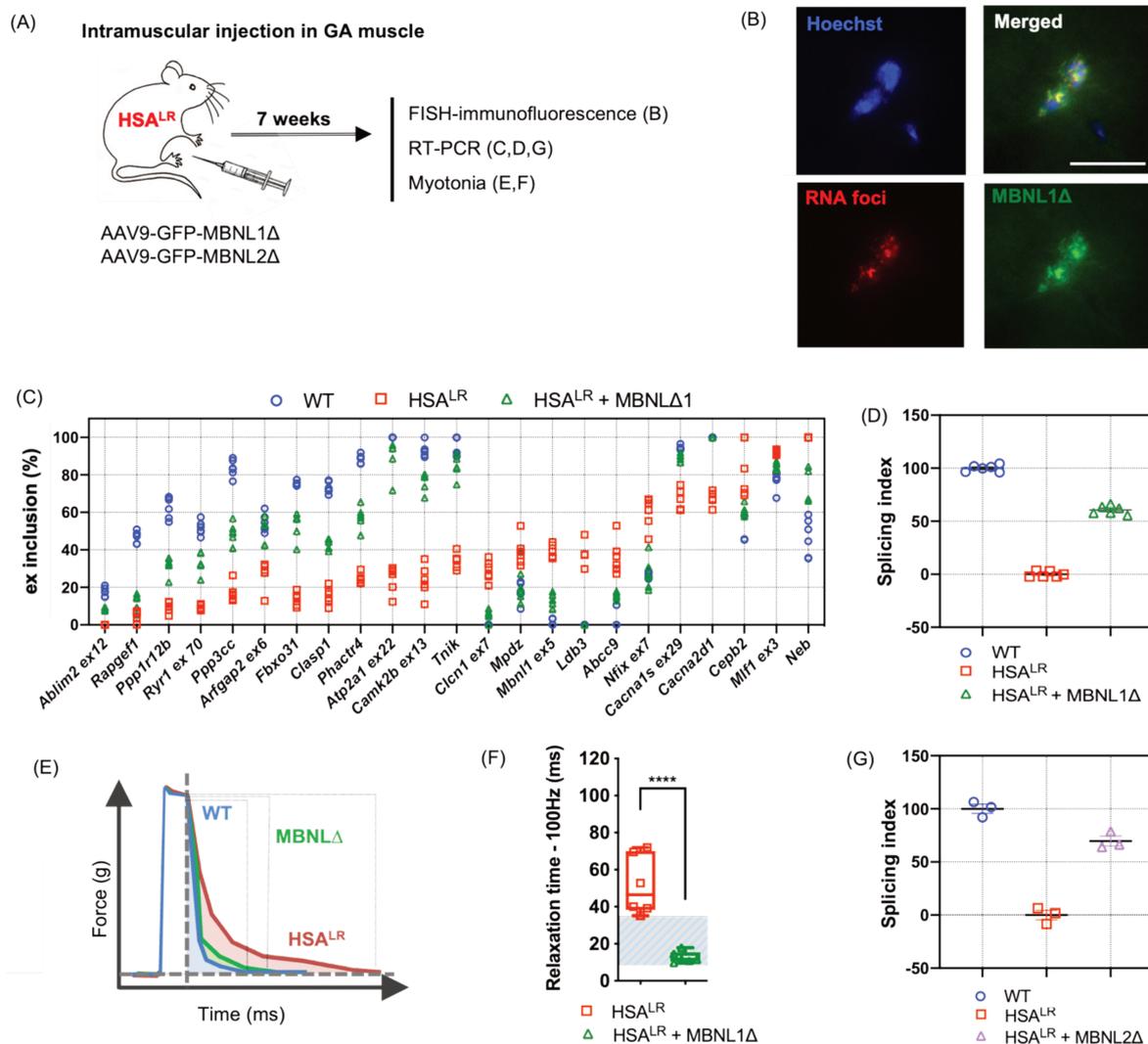


Figure 52 : L'injection intramusculaire d'AAV-MBNL1Δ corrige les défauts d'épissage et la myotonie chez les souris HSA^{L/R}. A) Plan expérimental. Les muscles GA de souris HSA^{L/R} ont été injectés avec les vecteurs AAV9-GFP-MBNL1Δ ou MBNL2Δ (1×10^{11} vg). Les muscles controlatéraux ont reçu une solution saline. Les souris ont été sacrifiées après 7 semaines de traitement. B) Colocalisation de GFP-MBNL1Δ avec des *foci* d'ARN-CUGexp dans les noyaux des fibres musculaires de souris HSA^{L/R} traitées par AAV9-GFP-MBNL1Δ, visualisée par une FISH combinée à une immunofluorescence. Les *foci* d'ARN-CUGexp ont été détectés avec une sonde Cy3-CAG (rouge), la GFP-MBNL1Δ à l'aide d'un anticorps anti-GFP (vert) et les noyaux avec une coloration au Hoechst (bleu). Barre d'échelle, 10 μ m. C) Correction de 23 événements d'épissage dépendants de MBNL1 et dérégulés dans les muscles GA de souris HSA^{L/R}, après injection avec l'AAV9-GFP-MBNL1Δ. D) Indice composite d'épissage déterminé dans les muscles GA de souris HSA^{L/R} exprimant MBNL1Δ (n = 6). E) Représentation illustrative des propriétés contractiles et du développement de la force après stimulation électrique *in situ* dans les muscles de souris WT, HSA^{L/R} ou HSA^{L/R} traitées par

MBNL1 Δ . La myotonie a été déterminée en mesurant l'aire sous la courbe force/temps pendant la relaxation du muscle. La ligne grise pointillée horizontale représente le niveau de force basal. La ligne grise pointillée verticale montre le début de la relaxation musculaire après la stimulation électrique et les lignes noires en pointillés montrent le temps nécessaire à chaque muscle pour revenir à la valeur de force basale. F) Mesure du temps de relaxation dans les muscles HSA^{LR} traités par MBNL1 Δ par rapport aux muscles controlatéraux injectés avec une solution saline (n = 6). Les données ont été analysées par le test t de Student (****P < 0,0001). Le temps de relaxation des souris WT est représenté par la zone bleue (n = 17, deux expériences indépendantes). G) Indice composite d'épissage déterminé dans les muscles GA HSA^{LR} exprimant MBNL2 Δ (n = 3).

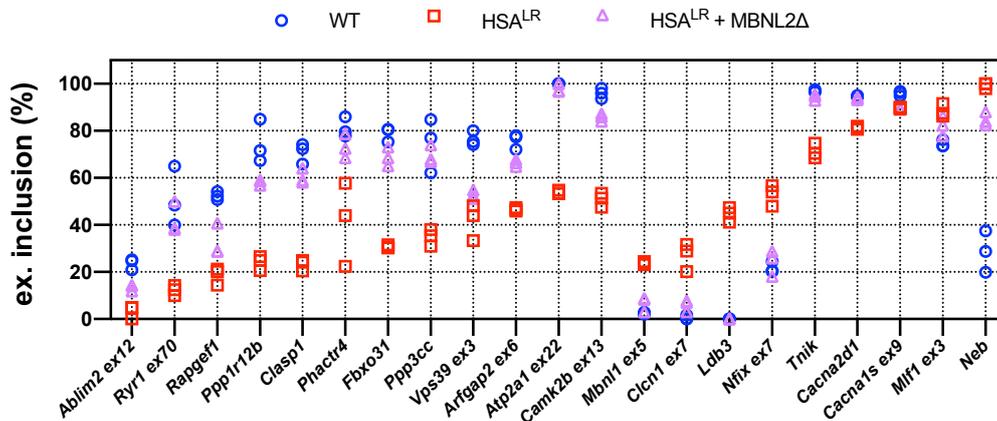


Figure 53 : MBNL2 Δ corrige les défauts d'épissage de la DM1 chez les souris HSA^{LR}. Correction des événements dérégulés dans la DM dépendants de MBNL1 dans les muscles GA de souris HSA^{LR} injectés avec AAV9-GFP-MBNL2 Δ (n = 3).

V.2.7 L'administration locale du leurre MBNL1 Δ maintient un effet durable chez les souris DM1.

Pour évaluer l'effet thérapeutique du leurre MBNL1 Δ à long terme, les souris HSA^{LR} ayant reçu une seule injection locale d'AAV-GFP-MBNL1 Δ ont été examinées un an après injection (**Figure 54 A**). Conformément à ce qui est observé 7 semaines après injection, la correction des défauts d'épissage des pré-ARNm de *Clcn1* exon 7a, *Atp2a1* exon 22 et *Mbnl1* exon 5 est maintenue dans les muscles injectés (**Figure 54 B**). Associée à la correction du défaut d'épissage de l'exon 7a de *Clcn1*, la normalisation de la myotonie mesurée dans les souris HSA^{LR} est maintenue sur la période d'un an de traitement (**Figure 54 C**). Une analyse histologique de muscles de souris vieillissantes montre des modifications myopathiques liées à l'âge avec une augmentation du nombre de noyaux internalisés dans les fibres musculaires (Wheeler et al. 2012). Un an après l'injection, une réduction de 30% du nombre de fibres avec des noyaux internalisés est observée dans les muscles traités par MBNL1 Δ par rapport aux muscles controlatéraux de ces souris HSA^{LR} âgées de 15 mois (**Figure 54 D et E**). Cette

diminution semble indiquer que le traitement avec MBNL1 Δ prévient la mise en place de la pathologie musculaire progressive. Ainsi, une seule administration d'AAV-MBNL1 Δ est suffisante pour assurer une correction durable et efficace des défauts moléculaires et physiologiques de la DM1 dans les muscles squelettiques.

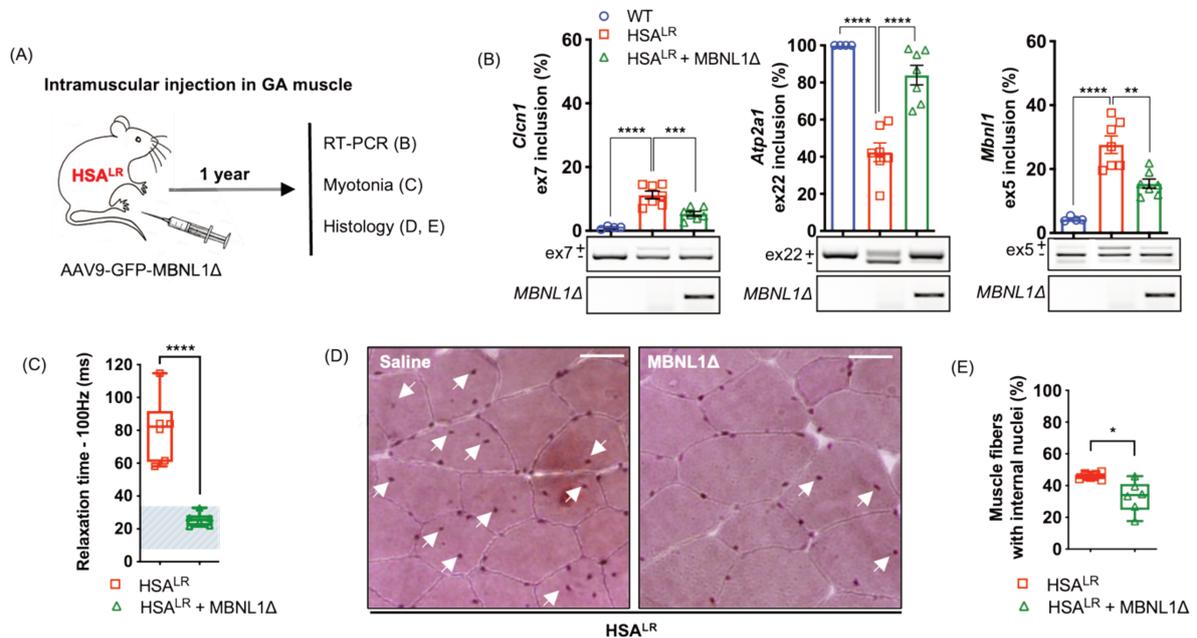


Figure 54 : Correction à long terme des défauts associés à la DM1 chez les souris HSA^{LR} traitées par MBNL1 Δ . A) Plan d'expérience. Les muscles GA de souris HSA^{LR} âgées de 3 mois ont été injectés avec des vecteurs AAV9-GFP-MBNL1 Δ (1×10^{11} vg) pendant un an. Les muscles controlatéraux ont reçu une solution saline. B) Correction des défauts d'épissage alternatif de *Clcn1* exon 7a, *Atp2a1* exon 22 et *Mbnl1* exon 5 évaluée par RT-PCR dans les muscles traités par MBNL1 Δ des souris HSA^{LR} et comparée aux muscles controlatéraux injectés avec une solution saline (n = 7) et aux muscles de souris WT (n = 3). Les données ont été analysées par One-way ANOVA suivie du test de Tukey (**P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001). C) Analyse de la myotonie dans les muscles HSA^{LR} traités par MBNL1 Δ et dans les muscles controlatéraux injectés avec une solution saline (n = 6). Les données ont été analysées par le test t de Student (****P < 0,0001). Le temps de relaxation des souris WT est représenté par la zone bleue (n = 17 souris, deux expériences indépendantes). D) Coloration Hématoxyline Éosine (HE) représentative des muscles GA HSA^{LR} injectés avec l'AAV9-GFP-MBNL1 Δ ou avec une solution saline. Les noyaux internalisés des fibres sont indiqués par des flèches blanches. Barre d'échelle, 30 μ m. E) Quantification du nombre de fibres avec des noyaux internalisés dans les muscles GA de souris HSA^{LR} injectés avec AAV-GFP-MBNL1 Δ par rapport aux muscles controlatéraux injectés avec une solution saline (n = 6, moyenne de 1 400 fibres par muscle). Les données ont été analysées par un test t de Student apparié (*P < 0,05).

V.2.8 L'administration systémique d'AAV-MBNL1 Δ corrige les phénotypes musculaires chez les souris DM1

Afin de confirmer la faisabilité d'une application de cette approche de thérapie génique par leurre, des vecteurs d'AAV9-MBNL1 Δ ont été administrés par voie systémique chez des souris adultes HSA^{LR} et l'efficacité du traitement a été évaluée dans plusieurs muscles squelettiques et organes (**Figure 55 A**). Afin d'avoir un outil le plus proche d'une potentielle administration chez l'homme, nous avons modifié notre construction GFP-MBNL1 Δ en fusionnant MBNL1 Δ à un petit tag V5 au lieu de la GFP ou en générant une construction MBNL1 Δ sans tag (no tag). Ces deux constructions ont préalablement été validées par injection intramusculaire chez des souris HSA^{LR} et chacune des constructions montre une correction des défauts d'épissage comparable à la construction GFP-MBNL1 Δ (**Figure 56 A**). Par la suite, l'AAV9-V5-MBNL1 Δ a été administré aux souris HSA^{LR} par voie systémique (injection par le sinus rétro-orbital). Sept semaines après injection, l'analyse par RT-PCR des profils d'épissage alternatif montre que les dérégulations d'épissage des pré-ARNm de *Cln1* exon 7a, *Atp2a1* exon 22 et *Mbnl1* exon 5 sont corrigées dans les muscles gastrocnémiens et quadriceps des mêmes souris (**Figure 55 B et Figure 56 B**). Conformément à la correction de l'épissage de *Cln1*, le temps de relaxation musculaire dans les muscles gastrocnémiens des souris HSA^{LR} traitées est également normalisé (**Figure 55 C**). L'indice composite d'épissage effectué dans les muscles gastrocnémiens (**Figure 55 D**), montre une correction globale de 50% des défauts d'épissage dans le GA des souris HSA^{LR} suite au traitement systémique avec notre construction (**Figure 55 E**). Comme déjà observé dans les muscles de souris WT, le niveau total de la protéine MBNL1 endogène dans les muscles gastrocnémiens des souris HSA^{LR} traitées reste inchangé. Cela indique encore une fois que la surexpression de MBNL1 Δ n'influence pas le niveau de MBNL1 (**Figure 55 F**). L'expression de MBNL1 Δ et le niveau de MBNL1 endogène étant équivalents (**Figure 56 C**), cela suggère que le niveau d'expression de notre construction est suffisant pour interférer avec la liaison des protéines MBNL1 aux ARN-CUGexp toxiques exprimés dans la souris HSA^{LR}. Par conséquent, les protéines MBNL1 endogènes ainsi libérées des *foci* conduisent à la normalisation de l'activité d'épissage de MBNL1 (**Figure 55 D et E**). De même qu'observé dans les cellules de patients DM1 traitées par MBNL1 Δ , des expériences de qPCR ont montré que le traitement induit une réduction de 40% et 30% des niveaux de transcrits mutés CUGexp, observés dans le GA et le QUA des souris HSA^{LR} traitées (**Figure 55 F**). Le modèle de souris HSA^{LR} a la particularité de présenter une expression des transcrits CUGexp uniquement dans les muscles squelettiques (Mankodi et al. 2000). Suite à

l'administration systémique, nous avons évalué l'effet de notre construction dans d'autres tissus non musculaires n'exprimant pas de transcrits CUGexp et pouvant être transduits par les vecteurs AAV (Zincarelli et al. 2008). Ainsi nous avons étudié par RT-PCR les profils d'épissage de l'exon 5 de *MBNL1* ou *MBNL2* dans le foie, les reins ou le cœur et l'exon 6b de *SCN5A*, connu pour être dérégulé dans le cœur des patients DM1 (Freyermuth et al. 2016; Wahbi et al. 2013). Les résultats montrent qu'aucune modification des transcrits testés n'est observée dans des tissus n'exprimant pas les CUGexp dans les souris HSA^{LR} traitées (**Figure 57 A et B**). La réaction immunogénique est un problème majeur pour les thérapies géniques visant à exprimer de nouveaux transgènes. Nous avons donc examiné la réponse immunitaire dirigée contre le transgène MBNL1Δ. Un test ELISA pour détecter la présence d'anticorps anti-MBNL1Δ a été réalisé sur des sérums des souris HSA^{LR} collectés avant et après traitement par MBNL1Δ. Sept semaines après le traitement, aucune immunoglobuline circulante contre MBNL1Δ n'a été détectée dans les sérums de souris après injection d'AAV-MBNL1Δ (**Figure 54 H**). Ainsi, l'expression de MBNL1Δ ne semble pas provoquer une réponse immunitaire qui pourrait compromettre l'effet durable du traitement par le leurre MBNL1Δ.

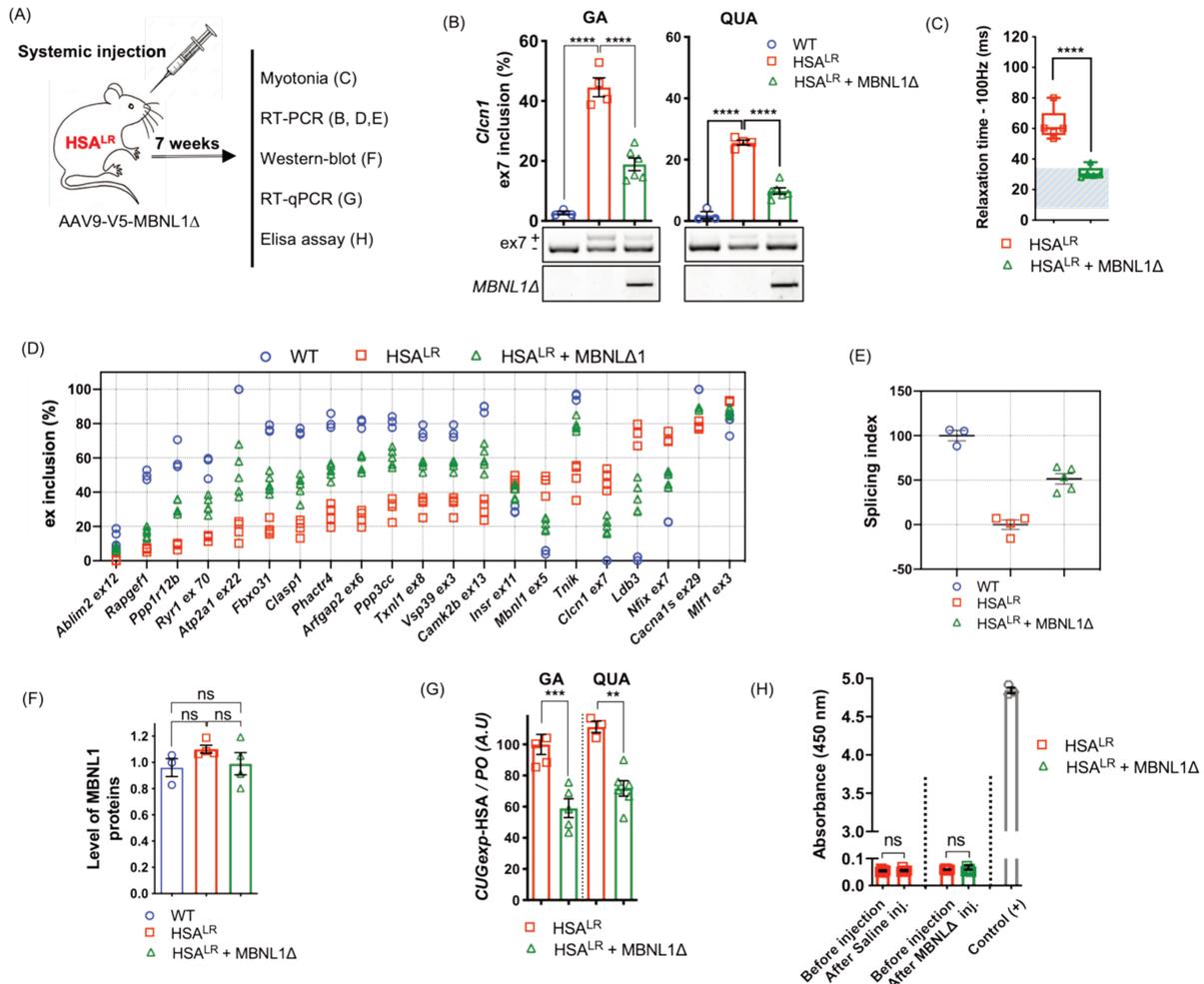


Figure 55 : Le traitement systémique avec AAV-MBNL1Δ améliore la myotonie, les défauts d'épissage et diminue les niveaux d'ARN-CUGexp chez les souris HSA^{LR}. A) Plan expérimental. Des souris HSA^{LR} âgées de trois mois ont reçu une injection systémique d'AAV-V5-MBNL1Δ (9 × 10¹² vg) ou une solution saline et ont été sacrifiées après 7 semaines. Les souris FVB (WT) âgées de trois mois ont reçu une injection de solution saline. B) Correction de la dérégulation de l'épissage alternatif de l'exon 7a de *Clcn1* dans les muscles GA et quadriceps (QUA) des souris HSA^{LR} après traitement systémique par MBNL1Δ (n = 6) par rapport aux souris HSA^{LR} (n = 4) et WT (n = 3) injectées avec une solution saline. Les données ont été analysées par One-way ANOVA suivie du test de Tukey (*****p* < 0,0001). C) Analyse de la myotonie par mesure du temps de relaxation musculaire dans les muscles GA des souris HSA^{LR} traitées par MBNL1Δ ou injectées avec une solution saline (n = 6). Le temps de relaxation des souris WT est représenté par la zone bleue (n = 17 souris, deux expériences indépendantes). Les données ont été analysées par le test t de Student (*****p* < 0,0001). D) Correction de 23 événements dérégulés et dépendants de MBNL1, dans les muscles GA de souris HSA^{LR} traitées par MBNL1Δ par rapport aux souris HSA^{LR} injectées par une solution saline. E) Indice composite d'épissage de MBNL1 déterminé dans les muscles GA de souris HSA^{LR} traitées par MBNL1Δ. F) Niveaux de protéines MBNL1 évalués par Western blot dans les muscles GA de souris HSA^{LR} traitées par MBNL1Δ (n = 4) et de souris HSA^{LR} ou WT injectées avec une solution saline (n = 3). Les données ont été analysées par One-way ANOVA suivie du test de Tukey. G) Niveaux de transcrits CUGexp-HSA déterminés par RT-qPCR dans les muscles GA et QUA de souris HSA^{LR} traitées par MBNL1Δ (n = 4-6). Les données ont été analysées par le test t de Student (***p* < 0,01, ****p* < 0,001). H) Détection des immunoglobulines circulantes

contre MBNL1 Δ par test ELISA sur des sérums collectés avant et 7 semaines après l'administration systémique soit d'AAV9-V5-MBNL1 Δ , soit d'une solution saline chez des souris HSA^{LR} (n = 6).

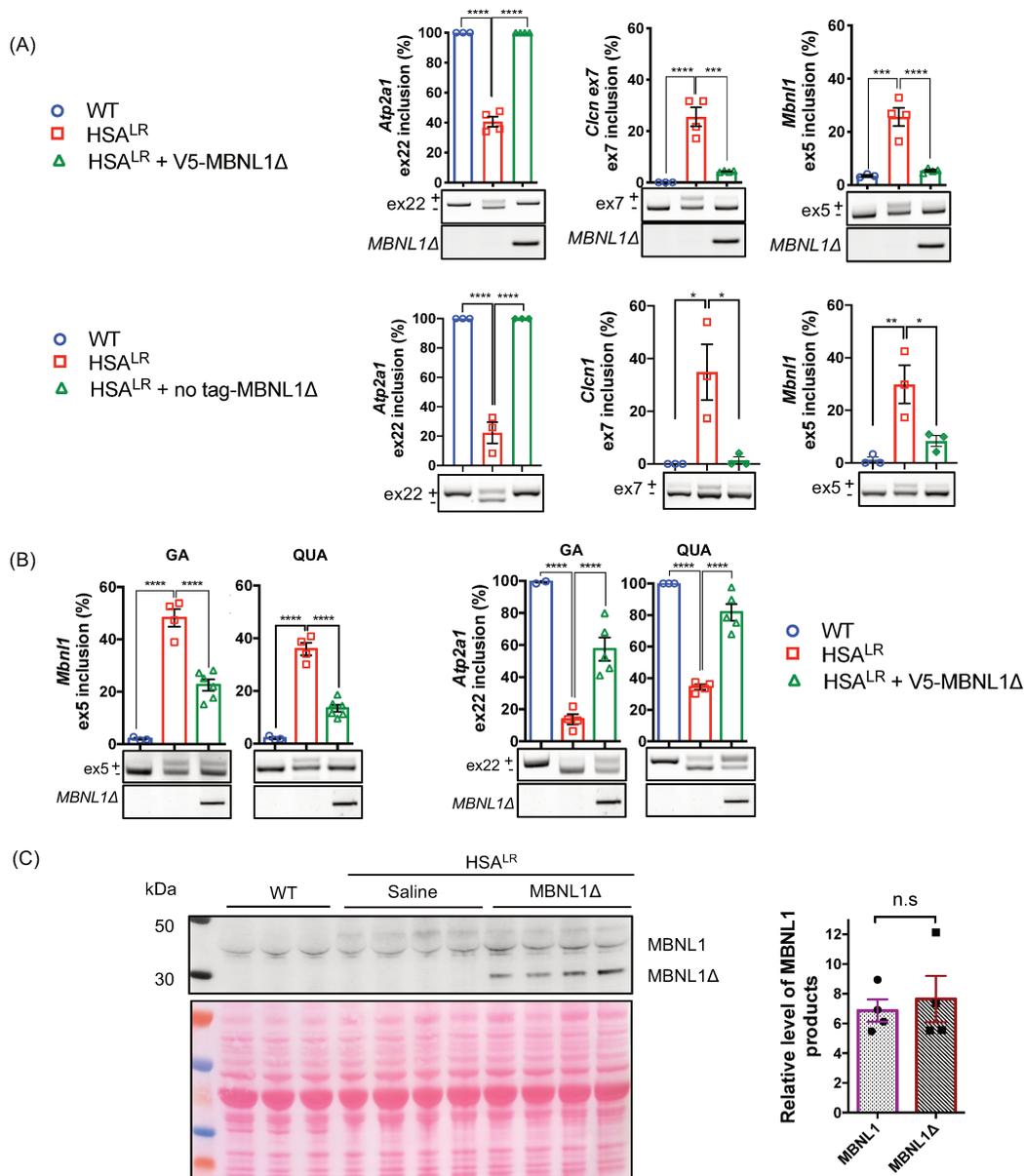


Figure 56 : Correction des défauts d'épissage par l'AAV9-V5-MBNL1 Δ ou l'AAV9-no tag-MBNL1 Δ chez la souris HSA^{LR}. A) Correction de l'épissage alternatif de l'exon 22 d'*Atp2a1*, de l'exon 7a de *Clcn1* et de l'exon 5 de *Mbnl1* évaluée par RT-PCR dans le Gastrocnémien de souris HSA^{LR} après injection intramusculaire d'AAV9-V5-MBNL1 Δ (n = 3-4, panneau supérieur) ou d'AAV9-MBNL1 Δ (n = 3, panneau inférieur) et comparée au muscle controlatéral injecté avec une solution saline ou au muscle de souris WT (n = 4). Données analysées par One-way ANOVA suivie du test de Tukey (**** p <0,0001). B) Correction des défauts d'épissage alternatif de l'exon 22 d'*Atp2a1* et de l'exon 5 de *Mbnl1* dans les muscles Gastrocnémiens (GA) et Quadriceps (QUA) des souris HSA^{LR} après traitement systémique par MBNL1 Δ (n = 5) par rapport aux souris HSA^{LR} (n = 4) et WT (n = 3) injectées avec une solution saline ou au muscle de souris HSA^{LR} après injection intramusculaire d'AAV9-V5-MBNL1 Δ (n = 3-4).

saline. Données analysées par One-way ANOVA suivie du test de Tukey (**** $p < 0,0001$). C) Niveaux de protéines MBNL1 évalués par Western blot dans les muscles GA de souris HSA^{LR} traitées par MBNL1 Δ (n = 4) et de souris HSA^{LR} ou WT injectées avec une solution saline (n = 3). Données analysées par One-way ANOVA suivie du test de Tukey (ns : non significatif).

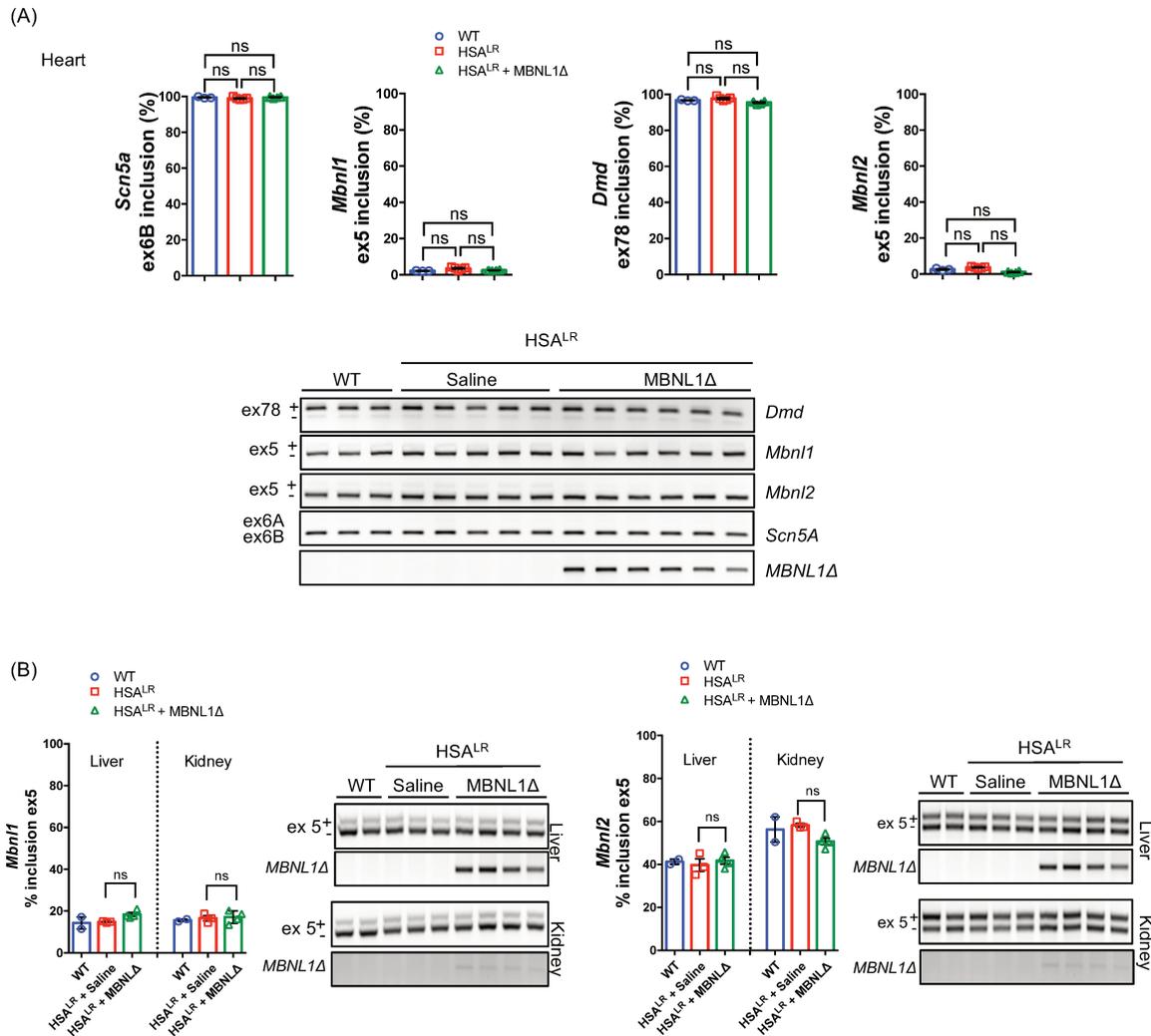


Figure 57 : Le traitement systémique avec AAV-MBNL1 Δ n'a aucun effet sur l'épissage dans des tissus n'exprimant pas de CUGexp chez les souris HSA^{LR}. A) Profils d'épissage de l'exon 6b de *Scn5a*, de l'exon 5 de *Mbnl1*, l'exon 78 de *Dmd* et l'exon 5 de *Mbnl2* dans le cœur de souris HSA^{LR} après l'injection systémique d'AAV-V5-MBNL1 Δ ou d'une solution saline (n = 5), comparés à des souris WT injectées avec une solution saline (n = 3). B) Profils d'épissage de l'exon 5 de *Mbnl1* et de l'exon 5 de *Mbnl2* dans les reins (K) et le foie (L) évalués par RT-PCR après injection systémique d'AAV-V5-MBNL1 Δ ou d'une solution saline chez des souris HSA^{LR} (n = 3-4), et comparés aux souris WT injectées avec une solution saline (n = 2-3). Données analysées par One-way ANOVA suivie du test de Tukey (ns : non significatif).

Conclusion

A l'heure actuelle, aucun traitement n'est disponible pour la DM1. Les stratégies les plus prometteuses visent à libérer et à restaurer une quantité suffisante de protéines fonctionnelles MBNL1 dans le noyau, permettant une correction des défauts d'épissage et la myotonie. Dans ces travaux, nous avons démontré que des riboprotéines (RBP) modifiées affines pour les répétitions CUG toxiques peuvent jouer le rôle de leurre et ainsi délocaliser les protéines MBNL1 séquestrées dans les *foci*. Nous avons ainsi montré que la libération et la relocalisation de MBNL1 dans le noyau permet la correction du transcriptome dans des cellules musculaires immortalisées DM1 et dans un modèle murin de la maladie. De façon surprenante, l'expression de notre outil conduit à une réduction des quantités d'ARN toxique suggérant une déstabilisation de la dynamique des *foci* ce qui semble être confirmé par les études FRAP et de dynamique des structures ARN/protéine *in vitro*. Par la suite nous avons confirmé le potentiel de notre outil pour une application thérapeutique, en démontrant un maintien des effets correcteurs des défauts d'épissage et la myotonie jusqu'à un an après une seule injection. Enfin, l'administration systémique de MBNL1 Δ corrige de façon efficace la myotonie, sans être délétère pour le muscle ou les organes n'exprimant pas les CUG toxiques, et réduit les quantités d'ARN toxique. Ainsi, ces résultats montrent qu'une RBP modifiée telle que MBNL1 Δ est un outil efficace et prometteur comme approche thérapeutique potentielle pour les patients atteints de DM1.

Discussion et perspectives

Mon travail de thèse s'est articulé sur 2 axes :

1) La caractérisation de modèles cellulaires issus de patient atteint de DM1

Afin de contourner les difficultés limitant l'utilisation des cellules primaires en culture et la faible accessibilité aux biopsies de patients, nous avons généré et caractérisé des modèles cellulaires immortalisés à partir de cellules primaires de patients DM et d'individus contrôles. Afin de confirmer la pertinence de ces modèles, nous avons montré que ces cellules immortalisées se comportaient comme les cellules primaires dont elles sont dérivées et présentaient notamment des défauts d'épissage caractéristiques de la DM1, réversibles par l'utilisation d'approches thérapeutiques ciblant l'ARN-CUGexp.

2) Le développement d'une nouvelle approche thérapeutique pour la DM

Nous avons démontré la capacité d'une approche de thérapie génique basée sur une stratégie de leurre, à corriger les anomalies du métabolisme des ARN dans les cellules musculaires immortalisées DM1 caractérisées au cours de ma thèse et dans un modèle murin de la maladie. Nous avons montré que des riboprotéines (RBP) modifiées et affines pour les répétitions CUG toxiques peuvent jouer le rôle de leurre et ainsi délocaliser les protéines MBNL1 séquestrées dans les *foci*, permettant alors de corriger les défauts d'épissage ainsi que la myotonie.

Caractérisation d'un modèle cellulaire immortalisé

Le développement de modèles cellulaires pertinents et robustes pour la dystrophie myotonique dans lesquels la mutation s'exprime dans son contexte naturel est essentiel pour comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la pathologie mais également pour évaluer de nouveaux composés thérapeutiques. Les cellules reprogrammées issus de patients DM1 sont dorénavant disponibles, fournissant des modèles puissants car elles ont la capacité de se différencier en de nombreux types cellulaires (Gao et al. 2016; Laustriat et al. 2015; Marteyn et al. 2011; Yanovsky-Dagan et al. 2015, 2019). Cependant ces cellules peuvent présenter un niveau de maturation variable et ainsi ne pas reproduire l'intégralité du phénotype cellulaire des cultures primaires ou des tissus d'origine. Elles représentent néanmoins une opportunité unique d'étudier des types cellulaires pathologiques spécifiques pour lesquels il n'existe peu ou pas encore de modèles animaux.

Concernant les modèles musculaires, les cultures primaires dérivées de biopsies musculaires de patients atteints de DM1 reproduisent des caractéristiques moléculaires de la maladie, telles que la présence de *foci* et la dérégulation du profil d'épissage de nombreux transcrits. Ces cellules primaires ont été utilisées dans de nombreux travaux pour étudier les mécanismes moléculaires ou évaluer des composés thérapeutiques (Botta et al. 2013; Dansithong et al. 2005; François et al. 2011; D. Furling, L. Coiffier, et al. 2001; Holt et al. 2007; Loro et al. 2010; Todorow et al. 2021). Cependant, ces cellules ont aussi quelques limitations. En plus d'un accès réduit aux biopsies musculaires de patients atteints de DM1, ces cultures de cellules primaires présentent une capacité proliférative réduite, comparée à des cellules primaires issus d'individus sains du même âge, en raison de l'entrée en sénescence répllicative précoce (Bigot et al. 2009). Pour contourner ces limitations, nous avons généré des lignées cellulaires musculaires immortalisées à partir de myoblastes primaires humains DM1, DM2 et contrôle. Afin d'empêcher l'entrée en sénescence répllicative des cellules musculaires squelettiques humaines primaires, induite par le raccourcissement des télomères et par l'activation de la voie p16, il a été démontré que réexprimer la sous-unité catalytique de la télomérase humaine (hTERT) et de Cdk4 est suffisant pour prolonger la capacité proliférative et immortaliser les myoblastes primaires humains. Ainsi, la réexpression de la télomérase humaine hTERT permettra le maintien de la longueur des télomères et la surexpression de Cdk4, ligand naturel de p16, inhibera l'activité de p16. La surexpression conjointe de ces deux facteurs permet l'immortalisation des cellules isolées de donneurs sains ou de patients atteints de dystrophie musculaire (Mamchaoui et al. 2011). Dans notre étude, nous avons transduit, à l'aide de vecteurs lentiviraux exprimant ces deux facteurs des cellules primaires humaines DM1, DM2 et contrôle. Ensuite, pour chaque lignée cellulaire, nous avons sélectionné deux clones qui récapitulent des caractéristiques phénotypiques et moléculaires similaires à celles trouvées dans les cultures primaires. Puis, pour confirmer l'intérêt de nos modèles pour l'évaluation d'approches thérapeutiques, nous avons testé deux approches antisens déjà publiées et connues pour leur efficacité (François et al. 2011; Mulders et al. 2009) sur un des deux clones DM1. Ces deux clones proviennent de la même culture primaire, ont une taille de répétitions identique et montrent des défauts d'épissage similaires pour les transcrits testés.

Cependant, il est important de prendre en considération que ces lignées sont des clones issus de l'immortalisation par l'utilisation de vecteurs intégratifs, puis sélectionnés sur leur capacité à proliférer et à former des myotubes. L'intégration aléatoire dans le génome peut influencer l'expression de certains gènes, soit par l'activation ou par répression des gènes

voisins. On ne peut pas exclure que certains résultats observés dans les clones, comme l'analyse du transcriptome, soient différents de la culture primaire dont ils sont issus et qui est beaucoup plus hétérogène. Enfin, afin de confirmer la pertinence des deux clones sélectionnés, nous aurions pu vérifier si les paramètres observés dans le clone DM1-cl5 sont identiques au clone DM1-cl6, soit en absence ou en présence de traitement. Par ailleurs, du fait de l'immortalisation, ces cellules ne peuvent être utilisées pour l'analyse du cycle cellulaire et les mécanismes de sénescence précoce observés dans la DM1.

Un autre point à noter est que les cellules primaires ont été obtenues à partir du muscle semi-tendineux d'un homme de 25 ans sain pour le contrôle, d'un muscle gastrocnémien d'une patiente de 11 ans atteinte d'une forme infantile de DM1 (2600 CTG dans les cellules musculaires) et d'un muscle quadriceps d'une patiente de 53 ans atteinte de DM2 (4000 CCTG dans le muscle). Ainsi, compte-tenu de l'origine musculaire différente des biopsies et la différence d'âge entre les patients, on peut se demander si la lignée contrôle est effectivement un bon contrôle pour nos études. Malgré ces différences, les cellules immortalisées montrent des capacités de fusion similaires aux cellules primaires. Toutefois, afin d'harmoniser nos études, il serait intéressant de travailler avec des lignées issues du même groupement musculaire et d'un patient avec un âge comparable. De manière alternative, un bon contrôle pourrait être des lignées de cellules isogéniques issues de l'édition du génome à partir de myoblastes immortalisés DM1 que nous avons caractérisés et dans lesquels les répétitions CUGexp pourraient être enlevées par une approche CRISPR/Cas9 (van Agtmaal et al. 2017).

Les cellules immortalisées DM1 présentent des défauts d'épissage mais pas les DM2

Au niveau moléculaire, la présence d'agrégats nucléaires CUGexp ou CCUGexp dans les myoblastes DM1 et DM2 immortalisés, confirme que les deux mutations sont exprimées dans chaque lignée de cellules musculaires. Dans le cas de la DM1, l'expression et l'accumulation nucléaire de transcrits *DMPK* mutés modifient l'activité de facteurs d'épissage tels que MBNL1 ou CELF. Dans cette étude, seules les dérégulations des événements d'épissage alternatif dépendants de MBNL1 ont été évalués puisque l'augmentation de CELF1 n'a pas été observée dans notre modèle de cellules immortalisées DM1. Ainsi, plusieurs événements d'épissage anormaux validés dans le muscle squelettique de patients DM1, sont détectés dans les deux lignées (cl5 et cl6) de myoblastes différenciés DM1. Cependant, dans les clones de myoblastes différenciés DM2, ces événements n'ont pas été montrés comme dérégulés,

soulevant plusieurs questions. Notamment, est-ce que la taille, la nature des répétitions et la composition des *foci* peut avoir un impact ? En effet, les cellules DM1 qui possèdent une mutation de 2600 CTG (considérée comme de grande taille) sont associées à un phénotype sévère. Par contre, dans les cellules DM2, la taille de 4000 CCTG est considérée comme une taille moyenne et potentiellement associée à un phénotype moins sévère (les mutations les plus importantes peuvent atteindre 11 000 répétitions (Liquori 2001)). Pour vérifier si cette différence de taille de répétitions entre les clones DM1 et DM2 peut impacter la dérégulation de l'épissage, il serait intéressant d'avoir accès à des myoblastes DM2 portant une taille de répétitions beaucoup plus grande et de s'intéresser à la dérégulation des épissages dépendants de MBNL1. Si comme dans la DM1, la quantité de MBNL1 est dépendante de la taille des répétitions, en est-il de même pour la DM2 ? Un autre facteur pouvant expliquer ces différences peut être le niveau d'expression des transcrits pathogènes CUG et CCUG, leur composition et/ou leur structure elle-même (CUG contre CCUG) qui peuvent également influencer le comportement des complexes ribonucléoprotéiques et des protéines séquestrées ou associées. En effet, les protéines MBNL ont la particularité de se lier avec les répétitions CUG_{exp} et CCUG_{exp} de par leur affinité pour les motifs YGCY. Cependant, le niveau et la quantité de protéines MBNL1 libre et fonctionnelle dans le noyau peut différer entre les cellules DM1 et DM2, en particulier si l'on considère que la mobilité des protéines MBNL est influencée par la composition et la taille des répétitions. Par ailleurs, une étude montre qu'une autre protéine de liaison à l'ARN, rbFOX1, entre en compétition avec MBNL1 sur les répétitions CCUG et non les répétitions CUG renforçant l'hypothèse que les différences d'épissage sont corrélées au niveau de séquestration des protéines MBNL1 (Sellier et al. 2018). Ainsi nous pourrions vérifier dans nos cellules DM2, l'impact de rbFOX1 sur la colocalisation entre les répétitions CCUG et MBNL1. Dans notre étude nous avons réussi à quantifier la fluorescence de MBNL1 après immunomarquage dans les *foci*. Nous pourrions reproduire la même expérience et quantifier les niveaux de séquestration de MBNL1 en plus de la présence de rbFOX1 dans les cellules DM1 et DM2. Nous pourrions également répéter nos expériences de FRAP et confirmer que les protéines MBNL1 sont plus mobiles dans les répétitions CCUG que dans les répétitions CUG comme observé par Sellier et al. avec une surexpression de 1000 CCTG. Nous pourrions ainsi répondre en partie aux différences d'épissage observées entre les clones DM1 et DM2.

Étude de la fonction de MBNL1 autre que l'épissage alternatif dans les cellules DM1

La DM1 est considérée comme une maladie de l'épissage en raison du nombre important d'événements d'épissage qui sont dérégulés chez les patients et qui ont été reliés à certains symptômes caractéristiques de la maladie. Le facteur central à l'origine de ce mécanisme est la séquestration des protéines de la famille MBNL dans les *foci* nucléaires au niveau des grandes répétitions provoquant ainsi leur perte de fonction et en conséquence les défauts d'épissage. Cependant, les protéines MBNL sont également impliquées dans des fonctions autres que l'activité d'épissage. Leur perte de fonction due à leur séquestration perturbe la régulation du choix du polyA, la localisation, la stabilité de certains ARN ainsi que la biogenèse de miRNA (Batra et al. 2014; Masuda et al. 2012; Rau et al. 2011; Taliaferro et al. 2016; Wang et al. 2012a). Dans l'étude de caractérisation de notre modèle cellulaire, nous avons confirmé les défauts d'épissage, mais aucun de ces autres aspects n'a été abordé. Il serait intéressant de compléter cette caractérisation en explorant ces autres aspects comme la dérégulation des APA due à la perte de fonction de MBNL1, comme observé dans des fibroblastes embryonnaires de souris (Batra et al. 2014).

Les cellules immortalisées sont de bons modèles cellulaires pour tester des thérapies

Pour confirmer que nos lignées de cellules musculaires immortalisées DM1 sont des outils fiables pour le criblage de composés thérapeutiques, nous avons testé des approches antisens qui ont démontré leur efficacité à inverser la toxicité de l'expression des CUGexp (François et al. 2011; González-Barriga et al. 2013; Mulders et al. 2009; Wheeler et al. 2009). Nous avons constaté que les différents traitements CAG antisens testés dans nos cellules immortalisées, soit par l'utilisation d'un hU7-(CAG)₁₅ ou soit par l'utilisation d'un ASO-(CAG)₇ ciblent les CUGexp et diminuent le nombre d'agrégats, conformément à ce qui a déjà été observé dans d'autres études (Pantic et al. 2016b). Le nombre d'agrégats nucléaires séquestrant MBNL1 étant fortement réduit, nous spéculons que la correction des défauts d'épissage observée dans les cellules immortalisées DM1 est due à une augmentation de la quantité de protéines MBNL1 libres et fonctionnelles permettant de remplir leur fonction d'épissage. L'analyse du transcriptome montre que 90% des 349 événements d'épissage dérégulés dans les myoblastes différenciés DM1-cl5 répondent au traitement antisens et plus de la moitié d'entre eux ont été normalisés dans les cellules DM1 traitées par le hU7-(CAG)₁₅. Ces stratégies validées dans les cellules DM1 n'ont cependant pas été testées dans les cellules DM2. Malgré le fait que ces cellules n'ont pas de défauts d'épissage, elles présentent des *foci* qui séquestrent les protéines

MBNL1. Il serait donc intéressant de savoir si ces stratégies fonctionnent dans ces cellules en s'intéressant au comportement des *foci* (tels que leur nombre, taille ou localisation) et le devenir des ARN-CCUGexp malgré les différences de taille et la localisation des répétitions.

Génération d'un outil de thérapie génique et mécanisme de leurre

Les outils précédemment utilisés pour valider la pertinence des modèles cellulaires immortalisés confirment la possibilité de corriger les défauts d'épissage par blocage stérique. Dans la seconde partie de mon travail de thèse, nous avons développé une approche thérapeutique visant à neutraliser l'expression toxique des répétitions CUG responsables de la DM1 par l'utilisation de protéines de liaison à l'ARN (RBP) modifiées ayant une forte affinité pour les répétitions CUG et pouvant concurrencer la liaison délétère de MBNL1 aux répétitions CUGexp pour libérer ces protéines des *foci*. Pour cela, nous avons conçu une stratégie de leurre basée sur la modification de la RBP MBNL1, en ne préservant que sa partie N-terminale (exons 1 à 4) composée des deux domaines ZnF en tandem, nécessaires à la liaison aux CUGexp. L'outil ainsi développé, le MBNL1 Δ , ne possède pas la région C-terminale (exons 5 à 10), caractérisée comme la partie responsable de l'activité d'épissage et de l'oligomérisation (Tran et al. 2011). Cette construction a été vectorisée dans un lentivirus et nous avons transduit des cellules musculaires immortalisées. Malgré la délétion de la partie C-terminale, une activité résiduelle d'épissage est encore observée. Cependant, elle reste très limitée et n'est pas suffisante pour compenser les défauts d'épissage induits par la double extinction de MBNL1 et MBNL2 dans les cellules musculaires humaines. De plus, dans les cellules DM1 immortalisées, nous avons montré que MBNL1 Δ entre en compétition avec MBNL1 pour la liaison aux ARN toxiques et favorise la diminution des *foci*. L'expression de MBNL1 Δ modifie la dynamique des protéines MBNL1 endogènes favorisant leur mobilité. Par la suite, l'augmentation des quantités de MBNL1 libre et fonctionnelle induit la correction des événements dépendants de MBNL et dérégulés dans la DM1. L'ensemble de ces résultats confirme ainsi que l'action de MBNL1 Δ est bien liée à la libération des protéines MBNL endogènes soutenant ainsi le mécanisme d'action de leurre par MBNL1 Δ .

MBNL1 Δ influe sur la stabilité et le devenir des *foci*

L'expression de cette protéine MBNL1 tronquée dans sa partie C-terminale conduit à une diminution importante du nombre de *foci* par noyau et de la quantité d'ARN muté dans les différents modèles DM1 testés (*in vitro* et *in vivo*). Cette diminution souligne que la région C-

terminale joue un rôle important dans la formation et la structuration des *foci* d'ARN. Conformément à ce qui a été publié, sans traitement, MBNL1 se lie aux les transcrits CUGexp en *foci*, les rendant toxiques (Fardaei et al. 2002; Sznajder et al. 2016). A contrario, MBNL1Δ qui colocalise également avec les transcrits CUGexp, déplace les protéines MBNL et semble déstructurer les *foci*, les rendant potentiellement moins stables, ce qui peut expliquer la réduction du nombre de *foci* d'ARN suivie d'une diminution des niveaux de transcrit CUGexp. Une étude propose que les ARN-CUG mutés sont bloqués à une étape très précoce du transport nucléoplasmique de par la présence des protéines MBNL1 (Smith et al. 2007). Nos *foci* restants dans le noyau colocalisent avec MBNL1Δ et présentent encore des niveaux de séquestration (réduite) de MBNL1, ce qui pourrait expliquer la présence de ces derniers *foci*. Par contre nous n'avons pas observé de *foci* ARN présentant seulement un marquage MBNLΔ. On pourrait donc en déduire que l'absence de MBNL1 suite à la délocalisation complète due à la présence de MBNL1Δ pourrait expliquer le déblocage du transport vers le cytoplasme. La présence des quelques *foci* restants pourrait également s'expliquer par la présence de MBNL1Δ qui à lui seul peut bloquer son export agissant comme une « éponge » et compactant les ARN CUGexp. Pour autant, même si ces *foci* sont encore présents, ils semblent moins toxiques pour la cellule.

Des résultats comparables sur la stabilité des ARN-CUGexp ont déjà été décrits par l'utilisation de stratégies antisens CAG visant à déplacer MBNL1 des répétitions et induisant une diminution de la quantité de *foci* (François et al. 2011; Klein et al. 2019; Wheeler et al. 2009). Une autre étude propose que l'utilisation d'oligonucléotides antisens CAG permettrait de libérer les protéines séquestrées par les ARN-CUGexp. Cela favoriserait l'export de ces ARN-CUGexp dans le cytoplasme où ils seraient pris en charge par la machinerie cellulaire (Wheeler et al. 2009). Dans notre étude, le traitement par MBNL1Δ délocalise en grande majorité les protéines MBNL1 favorisant potentiellement l'export du transcrit muté. Il serait important à ce stade de comprendre le devenir de ces ARN mutés. Nos observations faites sur le comportement des *foci* au cours du temps (entre 0h et 8h d'induction de doxycycline) ne semble pas montrer la présence d'ARN-CUG (structuré ou non en *foci*) dans le cytoplasme. Toutefois, les limites techniques d'acquisition ne permettent pas de conclure clairement à l'absence des transcrits mutés dans le cytoplasme. Il serait intéressant d'investiguer la présence ou non d'ARN-CUGexp dans le cytoplasme par d'autres techniques comme le Northern blot, après fragmentation noyau/cytoplasme des cellules DM1 traitées par MBNL1Δ ou le *single molecule FISH* (smFISH) qui permet de visualiser des transcrits uniques. Dans le cas où il n'y aurait pas la présence d'ARN-CUGexp dans le cytoplasme, nous pourrions focaliser notre attention sur un système de dégradation nucléaire de *DMPK* muté, mécanisme encore inconnu à ce jour.

Toutefois, les différences de taille des CUG entre les deux modèles (2600 dans notre étude contre 270 dans l'étude de Wheeler et al 2009) pourrait expliquer la présence d'ARN mutés dans le cytoplasme et le fait que l'export puisse se mettre en place plus facilement pour des ARN contenant de petites tailles de répétitions.

Nos résultats montrent également que les *foci* restants présentent encore une séquestration de MBNL1 (en quantité réduite). Cependant, les défauts d'épissage sont tout de même corrigés dans les cellules traitées appuyant l'hypothèse que la toxicité observée dans les cellules DM1 est liée à la composition des *foci* et qu'une petite quantité de MBNL1 libérée est suffisante pour provoquer une correction des défauts d'épissage. De plus, nos expériences de formation de condensats montrent qu'en présence de protéines recombinantes MBNL1, des ARN contenant 46 répétitions *CUG* forment plus de structures et de plus grosses tailles qu'en présence de protéines MBNL1 Δ . Afin d'appuyer l'hypothèse que MBNL1 Δ puisse influencer le comportement des *foci*, nous pourrions refaire ces expériences de condensats *in vitro* en incubant des protéines recombinantes de fusion GFP-MBNL1 Δ après la formation des condensats ARN-CUGexp/GFP-MBNL1 et observer le devenir ou la formation des *foci* en direct.

Les résultats obtenus, *in vitro* et dans les modèles DM1, sur le comportement des *foci* et le devenir des transcrits en présence de MBNL1 Δ montrent que l'absence de la partie C-terminale de MBNL1 a un impact sur la stabilité des *foci* et la séquestration des protéines MBNL suggérant ainsi que la formation d'un complexe MBNL/MBNL pourrait structurer les *foci*. En 2011, Tran et al. en collaboration avec notre équipe ont montré que l'exon 7 de *MBNL1* était impliqué dans la dimérisation de MBNL1 (Tran et al. 2011). Dans le but de mieux comprendre la structure/fonction de MBNL1 et des protéines de la famille MBNL en général, il pourrait donc être intéressant de vérifier si les effets que nous avons observés sur la structure des *foci* et la mobilité de MBNL1 dans les cellules DM1 ou dans les études *in vitro* pourraient être reproduits en modifiant l'épissage de l'exon 7 de MBNL1. Ainsi, par une approche oligonucléotide antisens, nous pourrions forcer l'exclusion spécifique de l'exon 7 dans des cellules DM1 et observer le devenir des *foci* par FISH. Parallèlement, nous pourrions étudier la formation des condensats ARN-MBNL1 en incorporant cette fois les ARN-*CUG* avec une isoforme de MBNL1 sans l'exon 7 en comparaison avec une isoforme MBNL1 présentant l'exon 7.

MBNL1 Δ corrige les défauts d'épissage et les maintient sur le long terme

Nous avons encapsidé les constructions de leurres MBNL1 Δ et MBNL2 Δ dans un vecteur AAV9 et utilisé le modèle de souris HSA^{LR} qui exprime 220-250 répétitions CUG_{exp}. L'utilisation de vecteurs AAV9 par administration locale pour les deux constructions ou systémique, seulement avec MBNL1 Δ , permet une efficacité de transduction de nos outils suffisante pour induire la correction des défauts d'épissage et de la myotonie. L'utilisation de ce type de vecteurs assure également une expression continue et sur le long terme. Un des inconvénients associés à l'utilisation de vecteurs AAV dans le cadre d'approches thérapeutiques est la perte de génomes viraux lorsque les fibres musculaires dégèrent, comme c'est le cas, par exemple dans la maladie de Duchenne réduisant ainsi l'impact sur le long terme de ce type d'approche. Dans le cas de la DM1, il n'existe pas de phénomène de régénération/dégénération sévère et les résultats que nous avons obtenus sur des souris HSA^{LR} un an post-injection, confirment le potentiel de ce type de stratégie par AAV. Ce traitement à long terme nous a permis de vérifier que le traitement par MBNL1 Δ ralentit la mise en place progressive de la pathologie. Par exemple, nous avons observé dans la souris HSA^{LR} âgée de plus de 1 an, un nombre important de noyaux mal positionnés au sein des fibres musculaires (environ 40%). Ce nombre est largement réduit suite au traitement avec MBNL1 Δ . La présence des noyaux mal positionnés dans le modèle HSA^{LR} âgé est encore très peu étudiée. Il serait intéressant d'investiguer si le traitement à long terme avec le MBNL1 Δ permet de mettre en évidence et de corriger de nouveaux défauts physiologiques.

L'utilisation d'un vecteur AAV permettant de transduire les fibres musculaires efficacement et amenant notre outil MBNL1 Δ à la libération des protéines MBNL, a aussi plusieurs avantages comparé aux autres approches ayant pour cible les CUG. Cibler l'interaction délétère entre les protéines MBNL1 et les CUG_{exp} est une approche actuellement développée et testée avec l'utilisation de petites molécules ou des stratégies oligonucléotides antisens. Cependant elles nécessitent des administrations répétées et sont parfois limitées par la capacité de pénétration tissulaire. De plus, elles ne sont pas toujours spécifiques de l'allèle portant la mutation et peuvent induire des effets négatifs. Dans le cas d'utilisation d'AAV, nous montrons qu'une seule injection locale permet une efficacité thérapeutique pérenne sur un an de traitement et prévient la mise en place progressive de la pathologie.

La surexpression de MBNL1Δ ne semble pas toxique

La surexpression de MBNL1 a déjà été étudiée dans un contexte DM1 pour compenser la perte de fonction due à la séquestration (Kanadia et al. 2006) ou dans des animaux sauvages pour étudier son rôle (Chamberlain et Ranum 2012). Dans les modèles testés dans notre étude, MBNL1Δ entre en compétition avec MBNL1 pour les CUGexp puisque nous montrons que MBNL1Δ colocalise dans les *foci in vitro* et *in vivo*. MBNL1Δ et MBNL1 partageant le même domaine de liaison à l'ARN, la localisation et séquestration de MBNL1 et MBNL1Δ doit être proportionnelle à la taille des répétitions (Miller 2000). Mais que se passe-t-il dans un muscle où il n'y a pas ou peu de cibles CUGexp pour titrer les protéines MBNL1Δ surexprimées ? Le séquençage de l'ARN effectué sur les muscles squelettiques de souris WT exprimant MBNL1Δ, n'a pas révélé de dérégulation anormale des transcrits cibles de MBNL ou de ceux contenant des répétitions courtes de CUG, par rapport aux muscles traités avec la construction contrôle AAV9-GFP. MBNL1Δ semble être plus spécifique des CUG que des cibles endogènes de MBNL1 et l'analyse globale du transcriptome indique que la surexpression de MBNL1Δ n'agit pas tel un dominant négatif sur l'expression des cibles de MBNL1 ou sur les événements d'épissage alternatif régulés par MBNL1.

Cela ne semble pas forcément être le cas pour la surexpression de MBNL1 pleine longueur. Les effets observés semblent dépendre du niveau de surexpression. En effet, en fonction de la quantité de MBNL surexprimée, le phénotype de la souris DM1 est corrigé (Kanadia et al. 2006) ou au contraire, est aggravé (Chamberlain et Ranum 2012; Yadava et al. 2019). Dans notre étude, l'injection de la même quantité d'AAV9-MBNL1 induit une correction du phénotype dans la souris DM1, mais provoque des dommages musculaires sévères dans un muscle de souris WT (un contexte à faible niveau d'expression de CUG). Par contre le même niveau de surexpression exogène de MBNL1Δ dans le muscle de souris sauvage n'induit aucun changement histologique. Le niveau de MBNL1 semble donc être un point critique mais nous ne pouvons malheureusement pas évaluer le niveau de surexpression de MBNL qui provoque cette toxicité puisque suite à l'injection de l'AAV MBNL dans le muscle de souris WT, cette surexpression induit une régénération massive très rapide (2 semaines post-injection). Le fait que le traitement avec l'AAV9-MBNL1Δ n'augmente pas le niveau protéique de MBNL1 endogène dans les muscles squelettiques des souris WT et HSA^{LR} traitées nous montre que l'expression de MBNL1Δ n'induit pas une expression anormale de *MBNL1* qui pourrait induire une toxicité. De plus, cela confirme que les corrections des défauts d'épissage ne sont pas dues à une expression compensatoire de MBNL1 et que le leurre joue un rôle dans la délocalisation des protéines MBNL1 des *foci*.

Plusieurs études *in vivo* ont montré que la surexpression d'un nouveau transgène peut provoquer une réponse immunitaire qui pourrait limiter à la fois l'efficacité et la durée de l'effet thérapeutique. Dans la DM1, cette question a été soulevée dans une autre étude de thérapie génique basée sur l'utilisation d'une Cas9 inactivée couplée à un domaine PIN à activité endonucléase qui dégrade de façon efficace les CUGexp. Encapsidée dans un AAV, l'administration locale ou systémique de cette construction montre des effets correcteurs stables à long terme sur le modèle HSA^{LR}, à condition qu'elle soit couplée à un traitement transitoire aux immunosuppresseurs (Batra et al. 2020). Dans notre étude, aucune réponse immunitaire contre le transgène MBNL1 Δ qui n'a été détectée chez les souris HSA^{LR} adultes traitées. Conformément à ce résultat, l'effet bénéfique est maintenu jusqu'à un an après une injection unique d'AAV9-MBNL1 Δ , assurant une expression continue et à long terme du leurre.

Génération de nouveaux outils MBNL Δ

Comme mentionné précédemment, la famille MBNL est composée de trois membres fortement conservés. Dans la DM, les trois paralogues MBNL1, MBNL2 et MBNL3 sont séquestrés dans les *foci* CUGexp (Fardaei et al. 2002; Konieczny, Stepniak-Konieczna, et Sobczak 2014b; Pettersson et al. 2015) et présentent une affinité de liaison similaire pour les répétitions toxiques (Sznajder et al. 2016). En général, les protéines MBNL1 montrent une activité d'épissage plus élevée que les protéines MBNL2 et encore plus que MBNL3. De plus, une analyse par FRAP a montré que les protéines MBNL1 et MBNL2 sont plus mobiles dans les *foci* que les protéines MBNL3 (Sznajder et al. 2016). Dans notre étude, nous avons généré un second leurre à partir du paraglogue MBNL2. Du fait de leur grande similitude, nous avons conçu l'outil MBNL2 Δ en se basant sur la même stratégie que MBNL1 Δ . Nous montrons dans notre étude que la protéine MBNL2 Δ semble avoir la même action de délocalisation que MBNL1 Δ dans le muscle squelettique de souris HSA^{LR}. En se basant sur le fait que MBNL3 est moins mobile dans les *foci*, MBNL3 Δ pourrait jouer un rôle saturant plus élevé que MBNL1 Δ ou MBNL2 Δ pour les répétitions CUG. Il pourrait être intéressant de générer une forme tronquée MBNL3 Δ et de la comparer aux MBNL1 Δ et MBNL2 Δ dans les cellules musculaires immortalisées puis dans le modèle de souris HSA^{LR} par injection d'AAV. Ainsi, nous pourrions nous intéresser aux corrections des défauts d'épissage, mais également au devenir des *foci* et de l'ARN muté. Si cette construction s'avérait plus efficace à la même charge virale, nous pourrions envisager de réduire les quantités de vecteurs viraux injectées chez la souris et observer des effets thérapeutiques plus forts et maintenus sur le long terme. Cependant, stabiliser les ARN-

CUGexp par la présence de MBNL3 Δ pourrait également ralentir le processus de déstructuration des *foci* qui est observé avec MBNL1 Δ . Nous pourrions observer cet effet en s'intéressant au devenir des *foci* par FISH et de l'ARN CUGexp par Northern blot, dans des cellules humaines transduites par une construction MBNL3 Δ .

Dans ces travaux, nous avons montré que MBNL1 Δ se lie aux CUGexp et MBNL1 Δ ne semble pas entrer en compétition pour les cibles endogènes de MBNL1 ne provoquant pas d'effet dominant négatif. En 2017 et 2020, Batra et al. ont proposé avec succès une approche de thérapie génique basée sur l'élimination spécifique de l'ARN muté par l'utilisation d'une Cas9 désactivée couplée à un domaine PIN à activité endonucléase. Comme leur approche induit une réponse immunitaire et nécessite un traitement provisoire aux immunosuppresseurs, ce qui ne semble pas être le cas pour l'outil MBNL1 Δ , il pourrait être avantageux d'utiliser un système similaire où MBNL1 Δ , qui présente une forte affinité pour les CUGexp, serait couplé à un domaine PIN permettant ainsi l'élimination des transcrits *DMPK* mutés et donc la disparition des *foci*. Cependant il faudra vérifier que l'utilisation d'un tel outil, se fixant sur les mêmes séquences consensus que MBNL1, ne puisse pas également induire la dégradation des transcrits régulés par MBNL1.

Concentrer les protéines MBNL1 Δ dans le noyau

Selon les isoformes, les protéines MBNL ont des localisations différentes dans la cellule. L'inclusion de l'exon 5 favorise la présence de ces protéines dans le noyau alors que son absence favorisera une expression cytoplasmique des protéines MBNL. Composée des 4 premiers exons, la construction MBNL1 Δ est dépourvue des exons 5 et 6 portant le signal de localisation bipartite (Sznajder et al. 2016). Nous avons observé dans les cellules immortalisées que MBNL1 Δ présente une localisation nucléaire au *foci* (surement due à la présence d'un NLS dans l'exon 3), mais nous ne pouvons pas exclure une expression cytoplasmique de MBNL1 Δ conformément aux études précédentes (Tran et al. 2011:2). Alors qu'il a été démontré que MBNL1 et MBNL2 sont impliquées dans la localisation des ARNm cellulaires et la traduction locale dans les cellules neuronales, leurs fonctions cytoplasmiques dans les cellules musculaires ne sont pas connues à ce jour. Dans ces travaux de thèse, nous avons démontré que MBNL1 Δ se liait aux répétitions CUG et ne semblait pas agir directement sur les transcrits régulés par MBNL1, comme le montre le peu d'effet de notre outil sur l'épissage après déplétion de MBNL1. Cependant, nous ne pouvons pas exclure totalement que l'expression de MBNL1 Δ dans le noyau et le cytoplasme ne perturbe pas d'autres fonctions liées ou non à MBNL. Afin

d'éviter des effets négatifs, il serait intéressant de tester nos constructions en les fusionnant à un NLS. Ceci permettra probablement de réduire la surexpression cytoplasmique et de concentrer les protéines MBNL Δ dans le noyau afin d'augmenter l'action de leurre.

Génération d'un outil MBNL Δ autorégulé

Dans la DM1, la taille des répétitions diffère d'un tissu à un autre et les quantités de protéines MBNL1 séquestrées dépendent de la taille des répétitions, qui est elle-même impactée par l'instabilité somatique qui induit une augmentation du nombre des répétitions CUG au cours de la vie du patient (Higham et al. 2012; Morales et al. 2012). Dans notre étude, nous avons démontré que l'utilisation de l'outil thérapeutique MBNL1 Δ dans des cellules immortalisées contenant 2600 répétitions permet la correction des défauts d'épissage et module la stabilité des *foci*. Cependant, nous n'avons pas exploré l'impact sur une taille de répétitions plus courte ou plus grande. Il serait intéressant de tester notre approche sur des cellules exprimant des tailles de répétitions différentes. Ainsi, cela nous permettrait d'étudier si la quantité de protéine MBNL Δ nécessaire pour un traitement est variable d'un tissu à un autre et pourrait augmenter avec le temps chez le patient DM1. Par conséquent, une expression contrôlée serait un avantage pour éviter d'éventuels effets indésirables, sans se préoccuper de la charge virale injectée. En tirant avantage du paradigme dans la DM1 dans lequel la perte de fonction de MBNL entraîne une dérégulation de l'épissage alternatif de nombreux transcrits (Du et al. 2010), nous pourrions développer un outil MBNL Δ capable de s'autoréguler en fonction de la présence ou de l'absence des protéines MBNL. Sur le même principe que les travaux récemment publiés par (Rogalska et Sobczak 2022), en positionnant en amont du transgène MBNL1 Δ un exon sensible à la présence de MBNL1 contenant un codon stop, nous pourrions réguler l'expression du transgène. Ainsi, en présence de MBNL1 fonctionnel, l'exon sera inclus, stoppant la production de MBNL1 Δ . Inversement, la perte de fonction de MBNL1 due par exemple à la séquestration dans les *foci*, entraînera l'exclusion de l'exon permettant ainsi la production du transgène.

Validation dans un modèle DM1 multisystémique

Dans ce travail nous avons fourni la preuve de concept d'une approche de thérapie génique par leurre basée sur la modification de protéine de liaison à l'ARN pour la DM1. Ainsi l'administration locale ou systémique d'une dose unique induit des corrections des défauts d'épissage et surtout une abolition de la myotonie. Cependant, il est important de rappeler que la DM1 est une maladie multisystémique, affectant de nombreux tissus de l'organisme.

Plusieurs étapes doivent être validées avant d'envisager cette approche en clinique notamment le choix du sérotype de la capsid AAV et du promoteur permettant l'expression du transgène. Dans notre étude, la validation fonctionnelle *in vivo* du leurre MBNL1 Δ a été effectuée sur le modèle HSA^{LR} qui pour le moment est le modèle le plus utilisé pour l'évaluation d'approches thérapeutiques. Ce modèle qui récapitule une partie des altérations observées dans la DM1, présente une taille de répétition de 220-250 CUG dont l'expression est limitée au muscle squelettique. Afin de valider cette approche comme outil transposable chez le patient, il est crucial d'évaluer son action sur un autre modèle de souris DM1 comme la souris transgénique DMSXL qui exprime de manière ubiquitaire plus de 1000 répétitions CTG dans le transgène humain *DMPK*. En plus de la diminution de la force musculaire et des anomalies des muscles squelettiques caractéristiques de la DM, les souris DMSXL présentent des anomalies de la conduction cardiaque (Algalarrondo et al. 2015) responsables de la deuxième cause de décès la plus fréquente chez les patients atteints de DM1. Le système nerveux central (CNS) est également impacté et de façon similaire aux patients (Seznec et al. 2001). Tout comme le muscle squelettique, le cœur et le CNS présentent des *foci* d'ARN toxiques, colocalisant avec les protéines MBNL1 ce qui induit la perturbation des profils d'épissage de certains transcrits (Hernández-Hernández et al. 2013). Par conséquent, les souris DMSXL représentent un bon modèle pour évaluer l'effet de l'administration systémique ou intrathécale d'AAV9 MBNL1 Δ sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire sur la correction d'un phénotype multisystémique. Ainsi, nous pourrions mener une étude sur le devenir et le comportement des *foci* dans le tissu cardiaque ou cérébral, ainsi que la correction des défauts d'épissage précédemment identifiés. Au niveau comportemental, la souris DMSXL présente des déficits de mémoire et parcourt une distance plus courte que les souris sauvages (Hernández-Hernández et al. 2013). Une injection intracérébroventriculaire d'AAV à P0 afin d'induire une expression généralisée dans le SNC pourrait être envisagée (Chakrabarty et al. 2013). Nous pourrions ainsi nous intéresser à l'effet provoqué par le traitement avec notre outil sur le comportement des souris DMSXL.

L'utilisation de notre outil MBNL1 Δ sur des cultures primaires d'astrocytes issus de souris DMSXL pourrait également être envisagée. Les astrocytes sont caractérisés comme les cellules du cerveau présentant le plus de *foci* et montrent des défauts d'épissage affectant principalement l'adhésion cellulaire, le cytosquelette et la morphogénèse comme observé dans le cerveau de patients DM1. De plus, la présence des *foci* affecte l'adhésion, l'étalement et la morphogénèse des astrocytes primaires de souris en culture (Dincã et al. 2022; Hernández-Hernández et al. 2013). Nous pourrions envisager de traiter ces cellules par notre lentivirus inductible ou avec

les vecteurs AAV MBNL Δ *in vitro* et ainsi s'intéresser au devenir des *foci* en étudiant par exemple leur taille, leur nombre ou leur localisation, mais également la correction des défauts d'épissage dépendants des protéines MBNL, l'adhésion cellulaire, l'étalement et la morphogenèse des cellules traitées.

Conclusion

Dans ce travail de thèse j'ai développé et caractérisé de nouveaux modèles cellulaires immortalisés qui reproduisent les caractéristiques cellulaires spécifiques à la maladie. Ces cellules ont l'avantage d'exprimer la mutation dans son contexte naturel et présentent des *foci* séquestrant les protéines MBNL1 induisant des anomalies de l'épissage alternatif. Elles ont également l'avantage, du fait de leur immortalisation, de contourner l'entrée en sénescence des cellules primaires, leur permettant ainsi de proliférer indéfiniment mais elles gardent la faculté d'initier la différenciation myogénique et de former des myotubes. J'ai également montré dans ce travail que ces cellules présentent de fortes dérégulations de l'épissage qui sont corrigées par l'utilisation de différentes approches thérapeutiques. La DM1 n'étant pas expliquée uniquement par une dérégulation de l'épissage alternatif, d'autres mécanismes liés à la perte de fonction de MBNL1 restent encore à explorer. Ces cellules sont maintenant des outils pertinents utilisés en routine dans notre équipe et par plusieurs laboratoires académiques ou privés, afin de tester de nouvelles approches thérapeutiques ou pour cribler des molécules.

Dans une seconde partie de ce travail de thèse, j'ai développé une nouvelle approche de thérapie génique basée sur l'utilisation de protéines modifiées affines pour les ARN pathogènes. Dans cette étude, j'ai montré que l'utilisation d'une protéine tronquée dans la partie C-terminale de MBNL, appelée MBNL Δ , joue le rôle de leurre et permet la délocalisation des protéines MBNL induisant la correction du transcriptome dans les cellules immortalisées précédemment caractérisées ainsi que dans le modèle de souris HSA^{LR} conduisant à la correction de la myotonie. J'ai également montré que la partie C-terminale joue un rôle important dans la structuration des ARN mutés en *foci* puisque l'utilisation de notre approche provoque une diminution du nombre de *foci* et une diminution d'ARN toxique. Aujourd'hui, cette approche de thérapie génique est très prometteuse et son développement implique un partenaire pharmaceutique.

Enfin pour conclure, dans cette thèse j'ai montré une preuve de concept de l'utilisation de dérivés de protéines de liaison à l'ARN comme approche thérapeutique pour la DM1. Compte tenu du nombre de maladies associées à l'altération des fonctions des protéines de liaison à l'ARN, notamment la dystrophie myotonique de type 2 (DM2), l'ataxie spinocérébelleuse de type 8 (SCA8), la dystrophie cornéenne endothéliale de Fuchs (FECD) et la maladie de Huntington de type 2 (HDL2), cette stratégie pourrait donc être envisagée pour des pathologies dans lesquelles la séquestration de MBNL1 par les répétitions CCUG_{exp} ou CUG_{exp} a

également été décrite (Liquori 2001; Daughters et al. 2009; Rudnicki et al. 2007; Du et al. 2015).

Annexe 1 : Table récapitulant les amorces et siRNA utilisés dans cette étude

		PCR primers		
Human Primers	Exon	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Source
<i>MBNL1</i>	5	TTGCAAGCCAAGATCAAGGC	TAGAGCCTGTTGGTATTGGA	
<i>NFIX</i>	7	GAGCCCTGTTGATGACGTGTTCTA	CTGCACAACTCCTTCAGTGAGTC	Nakamori et al. 2013
<i>DMD</i>	78	TTAGAGGAGGTGATGGAGCA	GATACTAAGGACTCCATCGC	Rau et al., 2015
<i>SOS1</i>	25	CAGTACCACAGATGTTTGCAAGT	TCTGGTCGTCTTCGTGGAGGAA	Nakamori et al. 2013
<i>ATP2A1</i>	22	ATCTTCAAGCTCCGGGCCCT	CAGCTCTGCCTGAAGATGTG	Kimura et al., 2005
<i>MBNL2</i>	5	ACAAGTGACAACCCGTAACCG	TTTGGTAAAGGATGAAGAGCACC	Nakamori et al. 2013
<i>ALPK3</i>	2	CTACCTGCTCAGCGTGCGG	TCTGGGTATCCTGTGACGATGCA	Nakamori et al. 2013
<i>NFIX</i>	7	GAGCCCTGTTGATGACGTGTTCTA	CTGCACAACTCCTTCAGTGAGTC	Nakamori et al. 2013
Mouse Primers				
<i>Mbn1</i>	5	GCTGCCAATACCAGGTCAAC	TGGTGGGAGAAATGCTGTATGC	Nakamori et al. 2013
<i>Atp2a1</i>	22	TGGCTCATGGTCTCAAGAT	CCTCAGCTTTGGCTGAAGAT	Kimura et al., 2005
<i>Clcn1</i>	7	TCCTATCTGCCAGACC	TGGAGTCAACCAATGGTAAAG	Charlet et al 2002
<i>Mbn2</i>	5	ACAAGTGACAACCCGTAACCG	TTTGGTAAAGGATGAAGAGCACC	Nakamori et al. 2013
<i>Capzb</i>	8	GCACGCTGAATGAGATCTACTTTG	CCGGTTAGCGTGAAGCAGAG	Orengo et al. 2008
<i>Ryr1</i>	70	GAC AAT AAGAGCAAAATGGC	CTTGGTGCGTTCTCTGATCTG	Nakamori et al. 2013
<i>Arfgap2</i>	6	GACTCTGATTTCTTCACAGAAT	TGCTCTCGGAGCTTCTCTGCCA	Nakamori et al. 2013
<i>Camk2b</i>	13	CAGGAGACTGTGGAATGTCTG	GGCATCTTCATCCTCTATGGTTG	Nakamori et al. 2013
<i>Scn5a</i>	6a	CTGGTCAAAGATTCTAGCTCGAGG	TCAAGAGCCGACAAATTGC	Freyermuth et al. 2015
<i>Scn5a</i>	6b	CTGGTCAAAGATTCTAGCTCGAGG	CATTGCCAGGTCCACAAATTCAG	Freyermuth et al. 2015
<i>Ablim2</i>	12	ATCCTGGACTACAGGGACTTGGCT	TGCTTTGAGGACCGATCATCCTG	Nakamori et al. 2013
<i>Mif1</i>	3	ACCTCTTGGAAAGAGACTTGCTCAG	TCCACTGTCAAGATCTCTCATTGC	Nakamori et al. 2013
<i>Vps39</i>	3	AAAGCTTCCCTGCAGATCGAC	CTGGGAAACCACATGGATCTGCTG	Nakamori et al. 2013
<i>Insr</i>	11	CAGATCCTGAAGGAGCTGGAGG	GGGCACAAATGGTAGAGGAGACG	Nakamori et al. 2013
<i>Cacnas1</i>	29	GCTATTTTGGAGATCCTTGGAA	AGCAGGGTGCGCACACCCCTC	Nakamori et al. 2013
<i>Txin1</i>	8	TTGGTACTCCAGTCCAGGCAACAA	AGATTAACAGTTTCCGAAGAG	Nakamori et al. 2013
<i>Rapgef1</i>		CGTCTTCTCAGGACAGCAGCTTTC	GCTCACTCGCTTCTTGAACGTG	Tanner et al. 2021
<i>Ppp1r12b</i>		CCAGCAGAAACAAGAGAAGACCTCTG	GTCACAGGCTGAGCTTGGTGTG	Tanner et al. 2021
<i>Ppp3cc</i>		AGCAACTGGCTTTCGGTCACTTATAC	GCCCTTGAGGGTCAGCACATTC	Tanner et al. 2021
<i>Fbxo31</i>		TGGAGATCACAGGTGTGTCTTGC	GGAGGTAGATCCGTCCGTAGGTC	Tanner et al. 2021
<i>Clasp1</i>		CTGAAGCGAGAATAGAAGCCAGGAAG	GAGGGTGTGGAGGCGACATTG	Tanner et al. 2021
<i>Phactr4</i>		GCCAGAGACCAGGTAGGATTTCC	ACCAGGACTGGCTAGAGGACC	Tanner et al. 2021
<i>Tnik</i>		GCACCAAAGCCTCTTTACCC	CCAAGTCACCGACAGTGATCCAG	Tanner et al. 2021
<i>Tnik</i>		GCACCAAAGCCTCTTTACCC	CCAAGTCACCGACAGTGATCCAG	Tanner et al. 2021
<i>Mpdz</i>		CGGAAAGCAGGCAACCCTGTAG	CTCGTCGGCAATCTGTAGTCGG	Tanner et al. 2021
<i>Abcc9</i>		TTCTCCTTGCCATCCTTGGTG	TCTTTCAAAGTCCCTTCCCTTAACAC	Tanner et al. 2021
<i>Neb</i>		GAGACTGTCTTGGACACGCCAGAG	CTAATGTGCTTCTGGGTCTCCTTGAC	Tanner et al. 2021
<i>Cacna2d1</i>		GGACATTCAGTGGATGGCTTGTG	CAGTGTGACTGGCTCCTGAGATTTG	Tanner et al. 2021
<i>Cepb2</i>		GAGCAGAGCAGATCCTCTCAAG	TGATAGTAGGGCTGGAAACACACAAG	Tanner et al. 2021
GFP		ACATGGTCTGCTGGAGTTC		
<i>MBNLΔ</i>			CAGGCGATTACTCGTCCATT	
V5		ATGGGTAAGCCTATCCCTAA		
<i>MBNLΔ2</i>			CTAGATCCGGTGGATCCGCG	
		qPCR primers		
<i>MBNL1</i>		CCAACGGTGCCACCGCAGTC	TGGTGGGAGAAATGCTGTATGC	
<i>MBNL2</i>		ACCACGCTGTTATTGTTCC	GTGTCGATCATGGTCTGTCTC	
		siRNA sequences		
siRNA <i>MBNL1</i>		5'-CAGACAGACUUGAGGUUUGdTdT-3'		Rau et al., 2015
siRNA <i>MBNL2</i>		5'-GAAGAGUAAUUGCCUGCUUUUdTdT-3'		Rau et al., 2015

Bibliographie

- Adereth, Yair, Vincent Dammai, Nurgun Kose, Runzhao Li, et Tien Hsu. 2005. « RNA-Dependent Integrin A3 Protein Localization Regulated by the Muscleblind-like Protein MLP1 ». *Nature Cell Biology* 7(12):1240-47. doi: 10.1038/ncb1335.
- van Agtmaal, Ellen L., Laurène M. André, Marieke Willemse, Sarah A. Cumming, Ingeborg D. G. van Kessel, Walther J. A. A. van den Broek, Geneviève Gourdon, Denis Furling, Vincent Mouly, Darren G. Monckton, Derick G. Wansink, et Bé Wieringa. 2017. « CRISPR/Cas9-Induced (CTG-CAG)_n Repeat Instability in the Myotonic Dystrophy Type 1 Locus: Implications for Therapeutic Genome Editing ». *Molecular Therapy* 25(1):24-43. doi: 10.1016/j.ymthe.2016.10.014.
- Aguti, Sara, Alberto Malerba, et Haiyan Zhou. 2018. « The Progress of AAV-Mediated Gene Therapy in Neuromuscular Disorders ». *Expert Opinion on Biological Therapy* 18(6):681-93. doi: 10.1080/14712598.2018.1479739.
- Algalarrondo, Vincent, Karim Wahbi, Frédéric Sebag, Geneviève Gourdon, Chérif Beldjord, Kamel Azibi, Elise Balse, Alain Coulombe, Rodolphe Fischmeister, Bruno Eymard, Denis Duboc, et Stéphane N. Hatem. 2015. « Abnormal Sodium Current Properties Contribute to Cardiac Electrical and Contractile Dysfunction in a Mouse Model of Myotonic Dystrophy Type 1 ». *Neuromuscular Disorders* 25(4):308-20. doi: 10.1016/j.nmd.2014.11.018.
- Alwazzan, M., E. Newman, M. G. Hamshire, et J. D. Brook. 1999. « Myotonic Dystrophy Is Associated with a Reduced Level of RNA from the DMWD Allele Adjacent to the Expanded Repeat ». *Human Molecular Genetics* 8(8):1491-97. doi: 10.1093/hmg/8.8.1491.
- Amack, J. D. et Mahadevan. 2001. « The Myotonic Dystrophy Expanded CUG Repeat Tract Is Necessary but Not Sufficient to Disrupt C2C12 Myoblast Differentiation ». *Human Molecular Genetics* 10(18):1879-87. doi: 10.1093/hmg/10.18.1879.
- Anders, S., P. T. Pyl, et W. Huber. 2015. « HTSeq--a Python Framework to Work with High-Throughput Sequencing Data ». *Bioinformatics* 31(2):166-69. doi: 10.1093/bioinformatics/btu638.
- Andreassi, Catia, et Antonella Riccio. 2009. « To Localize or Not to Localize: mRNA Fate Is in 3'UTR Ends ». *Trends in Cell Biology* 19(9):465-74. doi: 10.1016/j.tcb.2009.06.001.
- Anvret, M., G. Ahlberg, U. Grandell, B. Hedberg, K. Johnson, et L. Edström. 1993. « Larger Expansions of the CTG Repeat in Muscle Compared to Lymphocytes from Patients with Myotonic Dystrophy ». *Human Molecular Genetics* 2(9):1397-1400. doi: 10.1093/hmg/2.9.1397.
- Arandel, Ludovic, Magdalena Matloka, Arnaud F. Klein, Frédérique Rau, Alain Sureau, Michel Ney, Aurélien Cordier, Maria Kondili, Micaela Polay-Espinoza, Naira Naouar, Arnaud Ferry, Mégane Lemaitre, Séverine Begard, Morvane Colin, Chloé Lamarre, Hélène Tran, Luc Buée, Joëlle Marie, Nicolas Sergeant, et Denis Furling. 2022. « Reversal of RNA Toxicity in Myotonic Dystrophy via a Decoy RNA-Binding Protein with High

Affinity for Expanded CUG Repeats ». *Nature Biomedical Engineering* 6(2):207-20. doi: 10.1038/s41551-021-00838-2.

- Arandel, Ludovic, Micaela Polay Espinoza, Magdalena Matloka, Audrey Bazinet, Damily De Dea Diniz, Naïra Naouar, Frédérique Rau, Arnaud Jollet, Frédérique Edom-Vovard, Kamel Mamchaoui, Mark Tarnopolsky, Jack Puymirat, Christophe Battail, Anne Boland, Jean-Francois Deleuze, Vincent Mouly, Arnaud F. Klein, et Denis Furling. 2017. « Immortalized Human Myotonic Dystrophy Muscle Cell Lines to Assess Therapeutic Compounds ». *Disease Models & Mechanisms* 10(4):487-97. doi: 10.1242/dmm.027367.
- Ashizawa, Tetsuo, et Partha S. Sarkar. 2011. « Myotonic Dystrophy Types 1 and 2 ». P. 193-237 in *Handbook of Clinical Neurology*. Vol. 101. Elsevier.
- Ashwal-Fluss, Reut, Markus Meyer, Nagarjuna Reddy Pamudurti, Andranik Ivanov, Osnat Bartok, Mor Hanan, Naveh Evantal, Sebastian Memczak, Nikolaus Rajewsky, et Sebastian Kadener. 2014. « CircRNA Biogenesis Competes with Pre-mRNA Splicing ». *Molecular Cell* 56(1):55-66. doi: 10.1016/j.molcel.2014.08.019.
- Barde, Isabelle, Maria Antonietta Zanta-Boussif, Sylvain Paisant, Marylene Leboeuf, Philippe Rameau, Christophe Delenda, et Olivier Danos. 2006. « Efficient Control of Gene Expression in the Hematopoietic System Using a Single Tet-on Inducible Lentiviral Vector ». *Molecular Therapy* 13(2):382-90. doi: 10.1016/j.ymthe.2005.09.012.
- Bargiela, Ariadna, Maria Sabater-Arcis, Jorge Espinosa-Espinosa, Miren Zulaica, Adolfo Lopez de Munain, et Ruben Artero. 2019. « Increased Muscleblind Levels by Chloroquine Treatment Improve Myotonic Dystrophy Type 1 Phenotypes in in Vitro and in Vivo Models ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116(50):25203-13. doi: 10.1073/pnas.1820297116.
- Barreau, C., Paillard, et Osborne. 2005. « AU-Rich Elements and Associated Factors: Are There Unifying Principles? » *Nucleic Acids Research* 33(22):7138-50. doi: 10.1093/nar/gki1012.
- Bassez, G., G. Begemann, N. Paricio, R. Artero, I. Kiss, M. Perez-Alonso, et M. Mlodzik. 1997. « Muscleblind, a Gene Required for Photoreceptor Differentiation in Drosophila, Encodes Novel Nuclear Cys3His-Type Zinc-Finger-Containing Proteins ». *Development* 124(21):4321-31. doi: 10.1242/dev.124.21.4321.
- Bassez, G., A. Lazarus, I. Desguerre, J. Varin, P. Laforêt, H. M. Bécane, C. Meune, M. C. Arne-Bes, Z. Ounnoughene, H. Radvanyi, B. Eymard, et D. Duboc. s. d. « CME Severe Cardiac Arrhythmias in Young Patients with Myotonic Dystrophy Type ». 3.
- Batra, R., K. Charizanis, et M. S. Swanson. 2010. « Partners in Crime: Bidirectional Transcription in Unstable Microsatellite Disease ». *Human Molecular Genetics* 19(R1):R77-82. doi: 10.1093/hmg/ddq132.
- Batra, Ranjan, Konstantinos Charizanis, Mini Manchanda, Apoorva Mohan, Moyi Li, Dustin J. Finn, Marianne Goodwin, Chaolin Zhang, Krzysztof Sobczak, Charles A. Thornton, et Maurice S. Swanson. 2014. « Loss of MBNL Leads to Disruption of Developmentally

- Regulated Alternative Polyadenylation in RNA-Mediated Disease ». *Molecular Cell* 56(2):311-22. doi: 10.1016/j.molcel.2014.08.027.
- Batra, Ranjan, David A. Nelles, Elaine Pirie, Steven M. Blue, Ryan J. Marina, Harrison Wang, Isaac A. Chaim, James D. Thomas, Nigel Zhang, Vu Nguyen, Stefan Aigner, Sebastian Markmiller, Guangbin Xia, Kevin D. Corbett, Maurice S. Swanson, et Gene W. Yeo. 2017. « Elimination of Toxic Microsatellite Repeat Expansion RNA by RNA-Targeting Cas9 ». *Cell* 170(5):899-912.e10. doi: 10.1016/j.cell.2017.07.010.
- Batra, Ranjan, David A. Nelles, Daniela M. Roth, Florian Krach, Curtis A. Nutter, Takahiro Tadokoro, James D. Thomas, Łukasz J. Sznajder, Steven M. Blue, Haydee L. Gutierrez, Patrick Liu, Stefan Aigner, Oleksandr Platoshyn, Atsushi Miyanojara, Martin Marsala, Maurice S. Swanson, et Gene W. Yeo. 2020. « The Sustained Expression of Cas9 Targeting Toxic RNAs Reverses Disease Phenotypes in Mouse Models of Myotonic Dystrophy Type 1 ». *Nature Biomedical Engineering*. doi: 10.1038/s41551-020-00607-7.
- Bellini, Massimo, Biagi, Stasi, Costa, Mumolo, Ricchiuti, et Marchi. 2006. « Gastrointestinal Manifestations in Myotonic Muscular Dystrophy ». *World Journal of Gastroenterology* 12(12):1821. doi: 10.3748/wjg.v12.i12.1821.
- Bigot, Anne, Arnaud F. Klein, Erwan Gasnier, Virginie Jacquemin, Philippe Ravassard, Gillian Butler-Browne, Vincent Mouly, et Denis Furling. 2009. « Large CTG Repeats Trigger P16-Dependent Premature Senescence in Myotonic Dystrophy Type 1 Muscle Precursor Cells ». *The American Journal of Pathology* 174(4):1435-42. doi: 10.2353/ajpath.2009.080560.
- Bisset, Darren R., Ewa A. Stepniak-Konieczna, Maja Zavaljevski, Jessica Wei, Gregory T. Carter, Michael D. Weiss, et Joel R. Chamberlain. 2015. « Therapeutic Impact of Systemic AAV-Mediated RNA Interference in a Mouse Model of Myotonic Dystrophy ». *Human Molecular Genetics* 24(17):4971-83. doi: 10.1093/hmg/ddv219.
- Bondy-Chorney, Emma, Tara E. Crawford Parks, Aymeric Ravel-Chapuis, Roscoe Klinck, Lynda Rocheleau, Martin Pelchat, Benoit Chabot, Bernard J. Jasmin, et Jocelyn Côté. 2016. « Staufen1 Regulates Multiple Alternative Splicing Events Either Positively or Negatively in DM1 Indicating Its Role as a Disease Modifier » édité par G. A. Cox. *PLOS Genetics* 12(1):e1005827. doi: 10.1371/journal.pgen.1005827.
- Botta, Annalisa, Adriana Malena, Emanuele Loro, Giulia Del Moro, Matteo Suman, Boris Pantic, Gyorgy Szabadkai, et Lodovica Vergani. 2013. « Altered Ca²⁺ Homeostasis and Endoplasmic Reticulum Stress in Myotonic Dystrophy Type 1 Muscle Cells ». *Genes* 4(2):275-92. doi: 10.3390/genes4020275.
- Braz, Sandra O., Julien Acquaire, Geneviève Gourdon, et Mário Gomes-Pereira. 2018. « Of Mice and Men: Advances in the Understanding of Neuromuscular Aspects of Myotonic Dystrophy ». *Frontiers in Neurology* 9:519. doi: 10.3389/fneur.2018.00519.
- Brockhoff, Marielle, Nathalie Rion, Kathrin Chojnowska, Tatiana Wiktorowicz, Christopher Eickhorst, Beat Erne, Stephan Frank, Corrado Angelini, Denis Furling, Markus A. Rüegg, Michael Sinnreich, et Perrine Castets. 2017. « Targeting Deregulated

AMPK/MTORC1 Pathways Improves Muscle Function in Myotonic Dystrophy Type I ». *Journal of Clinical Investigation* 127(2):549-63. doi: 10.1172/JCI89616.

- Brook, J. David, Mila E. McCurrach, Helen G. Harley, Alan J. Buckler, Deanna Church, Hiroyuki Aburatani, Kent Hunter, Vincent P. Stanton, Jean-Paul Thirion, Thomas Hudson, Robert Sohn, Boris Zemelman, Russell G. Snell, Shelley A. Rundle, Steve Crow, June Davies, Peggy Shelbourne, Jessica Buxton, Clare Jones, Vesa Juvonen, Keith Johnson, Peter S. Harper, Duncan J. Shaw, et David E. Housman. 1992. « Molecular Basis of Myotonic Dystrophy: Expansion of a Trinucleotide (CTG) Repeat at the 3' End of a Transcript Encoding a Protein Kinase Family Member ». *Cell* 68(4):799-808. doi: 10.1016/0092-8674(92)90154-5.
- Buj-Bello, A., Furling, Tronchere, Laporte, Butler-Browne, Lerouge, et Mendel. 2002. « Muscle-Specific Alternative Splicing of Myotubularin-Related 1 Gene Is Impaired in DM1 Muscle Cells ». *Human Molecular Genetics* 11(19):2297-2307. doi: 10.1093/hmg/11.19.2297.
- Byron, Meg, Lisa L. Hall, et Jeanne B. Lawrence. 2013. « A Multifaceted FISH Approach to Study Endogenous RNAs and DNAs in Native Nuclear and Cell Structures ». *Current Protocols in Human Genetics* 76(1). doi: 10.1002/0471142905.hg0415s76.
- Carrell, Samuel T., Ellie M. Carrell, David Auerbach, Sanjay K. Pandey, C. Frank Bennett, Robert T. Dirksen, et Charles A. Thornton. 2016. « *Dmpk* Gene Deletion or Antisense Knockdown Does Not Compromise Cardiac or Skeletal Muscle Function in Mice ». *Human Molecular Genetics* 25(19):4328-38. doi: 10.1093/hmg/ddw266.
- Cass, Danielle, Rachel Hotchko, Paul Barber, Kimberly Jones, Devika P. Gates, et J. Andrew Berglund. 2011. « The Four Zn Fingers of MBNL1 Provide a Flexible Platform for Recognition of Its RNA Binding Elements ». *BMC Molecular Biology* 12(1):20. doi: 10.1186/1471-2199-12-20.
- Castanotto, Daniela, et John J. Rossi. 2004. « Construction and Transfection of PCR Products Expressing siRNAs or ShRNAs in Mammalian Cells ». P. 509 in *Ribozymes and siRNA Protocols*. Vol. 252.
- Cerro-Herrerros, Estefania, Juan M. Fernandez-Costa, María Sabater-Arcis, Beatriz Llamusi, et Ruben Artero. 2016. « Derepressing Muscleblind Expression by miRNA Sponges Ameliorates Myotonic Dystrophy-like Phenotypes in *Drosophila* ». *Scientific Reports* 6(1):36230. doi: 10.1038/srep36230.
- Cerro-Herrerros, Estefanía, Irene González-Martínez, Nerea Moreno-Cervera, Sarah Overby, Manuel Pérez-Alonso, Beatriz Llamusi, et Rubén Artero. 2020. « Therapeutic Potential of AntagomiR-23b for Treating Myotonic Dystrophy ». *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 21:837-49. doi: 10.1016/j.omtn.2020.07.021.
- Cerro-Herrerros, Estefania, Maria Sabater-Arcis, Juan M. Fernandez-Costa, Nerea Moreno, Manuel Perez-Alonso, Beatriz Llamusi, et Ruben Artero. 2018. « MiR-23b and MiR-218 Silencing Increase Muscleblind-like Expression and Alleviate Myotonic Dystrophy Phenotypes in Mammalian Models ». *Nature Communications* 9(1):2482. doi: 10.1038/s41467-018-04892-4.

- Chakrabarty, Paramita, Awilda Rosario, Pedro Cruz, Zoe Siemienski, Carolina Ceballos-Diaz, Keith Crosby, Karen Jansen, David R. Borchelt, Ji-Yoen Kim, Joanna L. Jankowsky, Todd E. Golde, et Yona Levites. 2013. « Capsid Serotype and Timing of Injection Determines AAV Transduction in the Neonatal Mice Brain » édité par J. Qiu. *PLoS ONE* 8(6):e67680. doi: 10.1371/journal.pone.0067680.
- Chamberlain, Christopher M., et Laura P. W. Ranum. 2012. « Mouse Model of Muscleblind-like 1 Overexpression: Skeletal Muscle Effects and Therapeutic Promise ». *Human Molecular Genetics* 21(21):4645-54. doi: 10.1093/hmg/dds306.
- Chaouch, Soraya, Vincent Mouly, Aurélie Goyenvalle, Adeline Vulin, Kamel Mamchaoui, Elisa Negroni, James Di Santo, Gillian Butler-Browne, Yvan Torrente, Luis Garcia, et Denis Furling. 2009. « Immortalized Skin Fibroblasts Expressing Conditional MyoD as a Renewable and Reliable Source of Converted Human Muscle Cells to Assess Therapeutic Strategies for Muscular Dystrophies: Validation of an Exon-Skipping Approach to Restore Dystrophin in Duchenne Muscular Dystrophy Cells ». *Human Gene Therapy* 20(7):784-90. doi: 10.1089/hum.2008.163.
- Charizanis, Konstantinos, Kuang-Yung Lee, Ranjan Batra, Marianne Goodwin, Chaolin Zhang, Yuan Yuan, Lily Shiue, Melissa Cline, Marina M. Scotti, Guangbin Xia, Ashok Kumar, Tetsuo Ashizawa, H. Brent Clark, Takashi Kimura, Masanori P. Takahashi, Harutoshi Fujimura, Kenji Jinnai, Hiroo Yoshikawa, Mário Gomes-Pereira, Geneviève Gourdon, Noriaki Sakai, Seiji Nishino, Thomas C. Foster, Manuel Ares, Robert B. Darnell, et Maurice S. Swanson. 2012. « Muscleblind-like 2-Mediated Alternative Splicing in the Developing Brain and Dysregulation in Myotonic Dystrophy ». *Neuron* 75(3):437-50. doi: 10.1016/j.neuron.2012.05.029.
- Charlet-B., Nicolas, Rajesh S. Savkur, Gopal Singh, Anne V. Philips, Elizabeth A. Grice, et Thomas A. Cooper. 2002. « Loss of the Muscle-Specific Chloride Channel in Type 1 Myotonic Dystrophy Due to Misregulated Alternative Splicing ». *Molecular Cell* 10(1):45-53. doi: 10.1016/S1097-2765(02)00572-5.
- Chen, Guiying, Akio Masuda, Hiroyuki Konishi, Bisei Ohkawara, Mikako Ito, Masanobu Kinoshita, Hiroshi Kiyama, Tohru Matsuura, et Kinji Ohno. 2016. « Phenylbutazone Induces Expression of MBNL1 and Suppresses Formation of MBNL1-CUG RNA Foci in a Mouse Model of Myotonic Dystrophy ». *Scientific Reports* 6(1):25317. doi: 10.1038/srep25317.
- Chen, J., E. E. Bardes, B. J. Aronow, et A. G. Jegga. 2009. « ToppGene Suite for Gene List Enrichment Analysis and Candidate Gene Prioritization ». *Nucleic Acids Research* 37(Web Server):W305-11. doi: 10.1093/nar/gkp427.
- Chen, Kuan-Yu, Huichin Pan, Min-Jon Lin, Yet-Young Li, Li-Chun Wang, Yi-Chun Wu, et Kuang-Ming Hsiao. 2007. « Length-Dependent Toxicity of Untranslated CUG Repeats on *Caenorhabditis Elegans* ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 352(3):774-79. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.11.102.
- Cho, Diane H., Cortlandt P. Thienes, Sarah E. Mahoney, Erwin Analau, Galina N. Filippova, et Stephen J. Tapscott. 2005. « Antisense Transcription and Heterochromatin at the DM1 CTG Repeats Are Constrained by CTCF ». *Molecular Cell* 20(3):483-89. doi: 10.1016/j.molcel.2005.09.002.

- Chong-Nguyen, Caroline, Karim Wahbi, Vincent Algalarrondo, Henri Marc Bécane, Hélène Radvanyi-Hoffman, Pauline Arnaud, Denis Furling, Arnaud Lazarus, Guillaume Bassez, Anthony Béhin, Abdallah Faysoil, Pascal Laforêt, Tanya Stojkovic, Bruno Eymard, et Denis Duboc. 2017. « Association Between Mutation Size and Cardiac Involvement in Myotonic Dystrophy Type 1: An Analysis of the DM1-Heart Registry ». *Circulation: Cardiovascular Genetics* 10(3):e001526. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.116.001526.
- Ciesiolka, Adam, Magdalena Jazurek, Karolina Drazkowska, et Wlodzimierz J. Krzyzosiak. 2017. « Structural Characteristics of Simple RNA Repeats Associated with Disease and Their Deleterious Protein Interactions ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11. doi: 10.3389/fncel.2017.00097.
- Coonrod, Leslie A., Masayuki Nakamori, Wenli Wang, Samuel Carrell, Cameron L. Hilton, Micah J. Bodner, Ruth B. Siboni, Aaron G. Docter, Michael M. Haley, Charles A. Thornton, et J. Andrew Berglund. 2013. « Reducing Levels of Toxic RNA with Small Molecules ». *ACS Chemical Biology* 8(11):2528-37. doi: 10.1021/cb400431f.
- Cooper, Thomas A. 1998. « Muscle-Specific Splicing of a Heterologous Exon Mediated by a Single Muscle-Specific Splicing Enhancer from the Cardiac Troponin T Gene ». *Molecular and Cellular Biology* 18(8):4519-25. doi: 10.1128/MCB.18.8.4519.
- Crawford Parks, Tara E., Kristen A. Marcellus, Christine Péladeau, Bernard J. Jasmin, et Aymeric Ravel-Chapuis. 2020. « Overexpression of Stauf1 in DM1 Mouse Skeletal Muscle Exacerbates Dystrophic and Atrophic Features ». *Human Molecular Genetics* 29(13):2185-99. doi: 10.1093/hmg/ddaa111.
- Dansithong, Warunee, Sharan Paul, Lucio Comai, et Sita Reddy. 2005. « MBNL1 Is the Primary Determinant of Focus Formation and Aberrant Insulin Receptor Splicing in DM1 ». *Journal of Biological Chemistry* 280(7):5773-80. doi: 10.1074/jbc.M410781200.
- Dasgupta, Twishasri, et Andrea N. Ladd. 2012. « The Importance of CELF Control: Molecular and Biological Roles of the CUG-BP, Elav-like Family of RNA-Binding Proteins: Importance of CELF Control ». *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 3(1):104-21. doi: 10.1002/wrna.107.
- Dastidar, Sumitava, Simon Ardui, Kshitiz Singh, Debanjana Majumdar, Nisha Nair, Yanfang Fu, Deepak Reyon, Ermira Samara, Mattia F. M. Gerli, Arnaud F. Klein, Wito De Schrijver, Jaitip Tipanee, Sara Seneca, Warut Tulalamba, Hui Wang, Yoke Chin Chai, Peter In't Veld, Denis Furling, Francesco Saverio Tedesco, Joris R. Vermeesch, J. Keith Joung, Marinee K. Chuah, et Thierry VandenDriessche. 2018. « Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Editing of Trinucleotide Repeat Expansion in Myotonic Dystrophy Patient-Derived IPS and Myogenic Cells ». *Nucleic Acids Research* 46(16):8275-98. doi: 10.1093/nar/gky548.
- Dastidar, Sumitava, Debanjana Majumdar, Jaitip Tipanee, Kshitiz Singh, Arnaud F. Klein, Denis Furling, Marinee K. Chuah, et Thierry VandenDriessche. 2022. « Comprehensive Transcriptome-Wide Analysis of Spliceopathy Correction of Myotonic Dystrophy Using CRISPR-Cas9 in iPSCs-Derived Cardiomyocytes ». *Molecular Therapy* 30(1):75-91. doi: 10.1016/j.ymthe.2021.08.004.

- Daughters, Randy S., Daniel L. Tuttle, Wangcai Gao, Yoshio Ikeda, Melinda L. Moseley, Timothy J. Ebner, Maurice S. Swanson, et Laura P. W. Ranum. 2009. « RNA Gain-of-Function in Spinocerebellar Ataxia Type 8 » édité par C. E. Pearson. *PLoS Genetics* 5(8):e1000600. doi: 10.1371/journal.pgen.1000600.
- Davies, Stephen P., Helen Reddy, Matilde Caivano, et Philip Cohen. 2000. « Specificity and Mechanism of Action of Some Commonly Used Protein Kinase Inhibitors ». 11.
- Davis, B. M., M. E. McCurrach, K. L. Taneja, R. H. Singer, et D. E. Housman. 1997. « Expansion of a CUG Trinucleotide Repeat in the 3' Untranslated Region of Myotonic Dystrophy Protein Kinase Transcripts Results in Nuclear Retention of Transcripts ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94(14):7388-93. doi: 10.1073/pnas.94.14.7388.
- Day, J. W., K. Ricker, J. F. Jacobsen, L. J. Rasmussen, K. A. Dick, W. Kress, C. Schneider, M. C. Koch, G. J. Beilman, A. R. Harrison, J. C. Dalton, et L. P. W. Ranum. 2003. « Myotonic Dystrophy Type 2: Molecular, Diagnostic and Clinical Spectrum ». *Neurology* 60(4):657-64. doi: 10.1212/01.WNL.0000054481.84978.F9.
- Day, John W., Robert Roelofs, Bonnie Leroy, Irene Pech, Kellie Benzow, et Laura P. W. Ranum. 1999. « Clinical and Genetic Characteristics of a Five-Generation Family with a Novel Form of Myotonic Dystrophy (DM2) ». *Neuromuscular Disorders* 9(1):19-27. doi: 10.1016/S0960-8966(98)00094-7.
- De Antonio, M., C. Dogan, D. Hamroun, M. Mati, S. Zerrouki, B. Eymard, S. Katsahian, et G. Bassez. 2016. « Unravelling the Myotonic Dystrophy Type 1 Clinical Spectrum: A Systematic Registry-Based Study with Implications for Disease Classification ». *Revue Neurologique* 172(10):572-80. doi: 10.1016/j.neurol.2016.08.003.
- Denes, Lance T., Chase P. Kelley, et Eric T. Wang. 2021. « Microtubule-Based Transport Is Essential to Distribute RNA and Nascent Protein in Skeletal Muscle ». *Nature Communications* 12(1):6079. doi: 10.1038/s41467-021-26383-9.
- Denis, Jérôme Alexandre, Morgane Gauthier, Latif Rachdi, Sophie Aubert, Karine Giraud-Triboult, Pauline Poydenot, Alexandra Benchoua, Benoite Champon, Yves Maury, Christine Baldeschi, Raphael Scharfmann, Geneviève Piétu, Marc Peschanski, et Cécile Martinat. 2013. « MTOR-Dependent Proliferation Defect in Human ES-Derived Neural Stem Cells Affected by Myotonic Dystrophy Type1 ». *Journal of Cell Science* jcs.116285. doi: 10.1242/jcs.116285.
- Di Tommaso, Paolo, Maria Chatzou, Evan W. Floden, Pablo Prieto Barja, Emilio Palumbo, et Cedric Notredame. 2017. « Nextflow Enables Reproducible Computational Workflows ». *Nature Biotechnology* 35(4):316-19. doi: 10.1038/nbt.3820.
- de Die-Smulders, C., Hoeweler, Thijs, Mirandolle, Anten, Smeets, Chandler, et Geraedts. 1998. « Age and Causes of Death in Adult-Onset Myotonic Dystrophy ». *Brain* 121(8):1557-63. doi: 10.1093/brain/121.8.1557.
- Dincã, Diana M., Louison Lallemand, Anchel González-Barriga, Noémie Cresto, Sandra O. Braz, Géraldine Sicot, Laure-Elise Pillet, Hélène Polvèche, Paul Magneron, Aline Huguët-Lachon, Hélène Benyamine, Cuauhtli N. Azotla-Vilchis, Luis E. Agonizantes-

- Juárez, Julie Tahraoui-Bories, Cécile Martinat, Oscar Hernández-Hernández, Didier Auboeuf, Nathalie Rouach, Cyril F. Bourgeois, Geneviève Gourdon, et Mário Gomes-Pereira. 2022. « Myotonic Dystrophy RNA Toxicity Alters Morphology, Adhesion and Migration of Mouse and Human Astrocytes ». *Nature Communications* 13(1):3841. doi: 10.1038/s41467-022-31594-9.
- Dobin, Alexander, Carrie A. Davis, Felix Schlesinger, Jorg Drenkow, Chris Zaleski, Sonali Jha, Philippe Batut, Mark Chaisson, et Thomas R. Gingeras. 2013. « STAR: Ultrafast Universal RNA-Seq Aligner ». *Bioinformatics* 29(1):15-21. doi: 10.1093/bioinformatics/bts635.
- Du, Hongqing, Melissa S. Cline, Robert J. Osborne, Daniel L. Tuttle, Tyson A. Clark, John Paul Donohue, Megan P. Hall, Lily Shiue, Maurice S. Swanson, Charles A. Thornton, et Manuel Ares. 2010. « Aberrant Alternative Splicing and Extracellular Matrix Gene Expression in Mouse Models of Myotonic Dystrophy ». *Nature Structural & Molecular Biology* 17(2):187-93. doi: 10.1038/nsmb.1720.
- Du, Jintang, Ross A. Aleff, Elisabetta Soragni, Krishna Kalari, Jinfu Nie, Xiaojia Tang, Jaime Davila, Jean-Pierre Kocher, Sanjay V. Patel, Joel M. Gottesfeld, Keith H. Baratz, et Eric D. Wieben. 2015. « RNA Toxicity and Missplicing in the Common Eye Disease Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy ». *Journal of Biological Chemistry* 290(10):5979-90. doi: 10.1074/jbc.M114.621607.
- Ebralidze, A., Y. Wang, V. Petkova, K. Ebralidse, et R. P. Junghans. 2004. « RNA Leaching of Transcription Factors Disrupts Transcription in Myotonic Dystrophy ». *Science* 303(5656):383-87. doi: 10.1126/science.1088679.
- Eisenberg, Iris, Matthew S. Alexander, et Louis M. Kunkel. 2009. « MiRNAs in Normal and Diseased Skeletal Muscle ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13(1):2-11. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00524.x.
- Fabian, Marc Robert, Nahum Sonenberg, et Witold Filipowicz. 2010. « Regulation of MRNA Translation and Stability by MicroRNAs ». *Annual Review of Biochemistry* 79(1):351-79. doi: 10.1146/annurev-biochem-060308-103103.
- Fardaei, M. 2001. « In Vivo Co-Localisation of MBNL Protein with DMPK Expanded-Repeat Transcripts ». *Nucleic Acids Research* 29(13):2766-71. doi: 10.1093/nar/29.13.2766.
- Fardaei, M. 2002. « Three Proteins, MBNL, MBLL and MBXL, Co-Localize in Vivo with Nuclear Foci of Expanded-Repeat Transcripts in DM1 and DM2 Cells ». *Human Molecular Genetics* 11(7):805-14. doi: 10.1093/hmg/11.7.805.
- Fardaei, M., Rogers, Thorpe, Larkin, Hamshere, Harper, et Brook. 2002. « Three Proteins, MBNL, MBLL and MBXL, Co-Localize in Vivo with Nuclear Foci of Expanded-Repeat Transcripts in DM1 and DM2 Cells ». *Human Molecular Genetics* 11(7):805-14. doi: 10.1093/hmg/11.7.805.
- Fautsch, Michael P., Eric D. Wieben, Keith H. Baratz, Nihar Bhattacharyya, Amanda N. Sadan, Nathaniel J. Hafford-Tear, Stephen J. Tuft, et Alice E. Davidson. 2021. « TCF4-Mediated Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy: Insights into a Common Trinucleotide

Repeat-Associated Disease ». *Progress in Retinal and Eye Research* 81:100883. doi: 10.1016/j.preteyeres.2020.100883.

Fernandez-Costa, Juan M., Amparo Garcia-Lopez, Sheila Zuñiga, Victoria Fernandez-Pedrosa, Amelia Felipo-Benavent, Manuel Mata, Oihane Jaka, Ana Aiastui, Francisco Hernandez-Torres, Begoña Aguado, Manuel Perez-Alonso, Jesus J. Vilchez, Adolfo Lopez de Munain, et Ruben D. Artero. 2013. « Expanded CTG Repeats Trigger MiRNA Alterations in Drosophila That Are Conserved in Myotonic Dystrophy Type 1 Patients ». *Human Molecular Genetics* 22(4):704-16. doi: 10.1093/hmg/dds478.

Fernandez-Costa, Juan M., Beatriz Llamusi, Ariadna Bargiela, Miren Zulaica, M. Carmen Alvarez-Abril, Manuel Perez-Alonso, Adolfo Lopez de Munain, Arturo Lopez-Castel, et Ruben Artero. 2016. « Six Serum MiRNAs Fail to Validate as Myotonic Dystrophy Type 1 Biomarkers » édité par R. B. Ray. *PLOS ONE* 11(2):e0150501. doi: 10.1371/journal.pone.0150501.

Fernandez-Costa, Juan M., M. Beatriz Llamusi, Amparo Garcia-Lopez, et Ruben Artero. 2011. « Alternative Splicing Regulation by Muscleblind Proteins: From Development to Disease ». *Biological Reviews* 86(4):947-58. doi: 10.1111/j.1469-185X.2011.00180.x.

Fish, Lisa, Nora Pencheva, Hani Goodarzi, Hien Tran, Mitsukuni Yoshida, et Sohail F. Tavazoie. 2016. « Muscleblind-like 1 Suppresses Breast Cancer Metastatic Colonization and Stabilizes Metastasis Suppressor Transcripts ». *Genes & Development* 30(4):386-98. doi: 10.1101/gad.270645.115.

François, Virginie, Arnaud F. Klein, Cyriaque Beley, Arnaud Jollet, Camille Lemerrier, Luis Garcia, et Denis Furling. 2011. « Selective Silencing of Mutated MRNAs in DM1 by Using Modified HU7-SnRNAs ». *Nature Structural & Molecular Biology* 18(1):85-87. doi: 10.1038/nsmb.1958.

Freyermuth, Fernande, Frédérique Rau, Yosuke Kokunai, Thomas Linke, Chantal Sellier, Masayuki Nakamori, Yoshihiro Kino, Ludovic Arandel, Arnaud Jollet, Christelle Thibault, Muriel Philipps, Serge Vicaire, Bernard Jost, Bjarne Udd, John W. Day, Denis Duboc, Karim Wahbi, Tsuyoshi Matsumura, Harutoshi Fujimura, Hideki Mochizuki, François Deryckere, Takashi Kimura, Nobuyuki Nukina, Shoichi Ishiura, Vincent Lacroix, Amandine Campan-Fournier, Vincent Navratil, Emilie Chautard, Didier Auboeuf, Minoru Horie, Keiji Imoto, Kuang-Yung Lee, Maurice S. Swanson, Adolfo Lopez de Munain, Shin Inada, Hideki Itoh, Kazuo Nakazawa, Takashi Ashihara, Eric Wang, Thomas Zimmer, Denis Furling, Masanori P. Takahashi, et Nicolas Charlet-Berguerand. 2016. « Splicing Misregulation of SCN5A Contributes to Cardiac-Conduction Delay and Heart Arrhythmia in Myotonic Dystrophy ». *Nature Communications* 7:11067. doi: 10.1038/ncomms11067.

Fu, Y. H., A. Pizzuti, R. G. Fenwick, J. King, S. Rajnarayan, P. W. Dunne, J. Dubel, G. A. Nasser, T. Ashizawa, P. de Jong, B. Wieringa, R. Korneluk, M. B. Perryman, H. F. Epstein, et C. Thomas Caskey. 1992. « An Unstable Triplet Repeat in a Gene Related to Myotonic Muscular Dystrophy ». *Science* 255(5049):1256-58. doi: 10.1126/science.1546326.

- Furling, D., L. Coiffier, V. Mouly, J. P. Barbet, J. L. St Guily, K. Taneja, G. Gourdon, C. Junien, et G. S. Butler-Browne. 2001. « Defective Satellite Cells in Congenital Myotonic Dystrophy ». *Human Molecular Genetics* 10(19):2079-87. doi: 10.1093/hmg/10.19.2079.
- Furling, D., Coiffier, Mouly, Barbet, Guily, Taneja, Gourdon, Junien, et Butler-Browne. 2001. « Defective Satellite Cells in Congenital Myotonic Dystrophy ». *Human Molecular Genetics* 10(19):2079-87. doi: 10.1093/hmg/10.19.2079.
- Furling, Denis, Dany Lemieux, Krishan Taneja, et Jack Puymirat. 2001. « Decreased Levels of Myotonic Dystrophy Protein Kinase (DMPK) and Delayed Differentiation in Human Myotonic Dystrophy Myoblasts ». *Neuromuscular Disorders* 11(8):728-35. doi: 10.1016/S0960-8966(01)00226-7.
- Gao, Yuanzheng, Xiuming Guo, Katherine Santostefano, Yanlin Wang, Tammy Reid, Desmond Zeng, Naohiro Terada, Tetsuo Ashizawa, et Guangbin Xia. 2016. « Genome Therapy of Myotonic Dystrophy Type 1 IPS Cells for Development of Autologous Stem Cell Therapy ». *Molecular Therapy* 24(8):1378-87. doi: 10.1038/mt.2016.97.
- García de Andoin, Nagore, Juncal Echeverría, Ana M. Cobo, Ángel Rey, Luis Paisán, et Adolfo López de Munain. 2005. « A Neonatal Form of Steinert's Myotonic Dystrophy in Twins after in Vitro Fertilization ». *Fertility and Sterility* 84(3):756.e5-756.e8. doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.03.062.
- Garcia-Lopez, Amparo, Lidon Monferrer, Irma Garcia-Alcover, Marta Vicente-Crespo, M. Carmen Alvarez-Abril, et Ruben D. Artero. 2008. « Genetic and Chemical Modifiers of a CUG Toxicity Model in Drosophila » édité par A. Lewin. *PLoS ONE* 3(2):e1595. doi: 10.1371/journal.pone.0001595.
- Gates, Devika P., Leslie A. Coonrod, et J. Andrew Berglund. 2011. « Autoregulated Splicing of Muscleblind-like 1 (MBNL1) Pre-mRNA ». *Journal of Biological Chemistry* 286(39):34224-33. doi: 10.1074/jbc.M111.236547.
- Geuens, Thomas, Delphine Bouhy, et Vincent Timmerman. 2016. « The HnRNP Family: Insights into Their Role in Health and Disease ». *Human Genetics* 135(8):851-67. doi: 10.1007/s00439-016-1683-5.
- Goers, Emily S., Jamie Purcell, Rodger B. Voelker, Devika P. Gates, et J. Andrew Berglund. 2010. « MBNL1 Binds GC Motifs Embedded in Pyrimidines to Regulate Alternative Splicing ». *Nucleic Acids Research* 38(7):2467-84. doi: 10.1093/nar/gkp1209.
- Gomes-Pereira, Mário, Thomas A. Cooper, et Geneviève Gourdon. 2011. « Myotonic Dystrophy Mouse Models: Towards Rational Therapy Development ». *Trends in Molecular Medicine* 17(9):506-17. doi: 10.1016/j.molmed.2011.05.004.
- Gomes-Pereira, Mário, Laurent Foiry, Annie Nicole, Aline Huguët, Claudine Junien, Arnold Munnich, et Geneviève Gourdon. 2007. « CTG Trinucleotide Repeat "Big Jumps": Large Expansions, Small Mice ». *PLoS Genetics* 3(4):e52. doi: 10.1371/journal.pgen.0030052.

- González-Barriga, Anchel, Susan AM Mulders, Jeroen van de Giessen, Jeroen D. Hooijer, Suzanne Bijl, Ingeborg DG van Kessel, Josee van Beers, Judith CT van Deutekom, Jack AM Fransen, Bé Wieringa, et Derick G. Wansink. 2013. « Design and Analysis of Effects of Triplet Repeat Oligonucleotides in Cell Models for Myotonic Dystrophy ». *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 2:e81. doi: 10.1038/mtna.2013.9.
- Goodwin, Marianne, Apoorva Mohan, Ranjan Batra, Kuang-Yung Lee, Konstantinos Charizanis, Francisco José Fernández Gómez, Sabiha Eddarkaoui, Nicolas Sergeant, Luc Buée, Takashi Kimura, H. Brent Clark, Joline Dalton, Kenji Takamura, Sebastien M. Weyn-Vanhentenryck, Chaolin Zhang, Tammy Reid, Laura P. W. Ranum, John W. Day, et Maurice S. Swanson. 2015. « MBNL Sequestration by Toxic RNAs and RNA Misprocessing in the Myotonic Dystrophy Brain ». *Cell Reports* 12(7):1159-68. doi: 10.1016/j.celrep.2015.07.029.
- Gourdon, Genevieve, et Giovanni Meola. 2017. « Myotonic Dystrophies: State of the Art of New Therapeutic Developments for the CNS ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11:101. doi: 10.3389/fncel.2017.00101.
- Grammatikakis, Ioannis, Young-Hwa Goo, Gloria V. Echeverria, et Thomas A. Cooper. 2011. « Identification of MBNL1 and MBNL3 Domains Required for Splicing Activation and Repression ». *Nucleic Acids Research* 39(7):2769-80. doi: 10.1093/nar/gkq1155.
- Greco, Simona, Alessandra Perfetti, Pasquale Fasanaro, Rosanna Cardani, Maurizio C. Capogrossi, Giovanni Meola, et Fabio Martelli. 2012. « Deregulated MicroRNAs in Myotonic Dystrophy Type 2 » édité par A. Musaro. *PLoS ONE* 7(6):e39732. doi: 10.1371/journal.pone.0039732.
- Greider, Carol W., et Elizabeth H. Blackburn. 1985. « Identification of a Specific Telomere Terminal Transferase Activity in Tetrahymena Extracts ». *Cell* 43(2):405-13. doi: 10.1016/0092-8674(85)90170-9.
- Gudde, Anke E. E. G., Simon J. van Heeringen, Amanda I. de Oude, Ingeborg D. G. van Kessel, Joseph Estabrook, Eric T. Wang, Bé Wieringa, et Derick G. Wansink. 2017. « Antisense Transcription of the Myotonic Dystrophy Locus Yields Low-Abundant RNAs with and without (CAG)_n Repeat ». *RNA Biology* 14(10):1374-88. doi: 10.1080/15476286.2017.1279787.
- Hale, Melissa A., Jared I. Richardson, Ryan C. Day, Ona L. McConnell, Juan Arboleda, Eric T. Wang, et J. Andrew Berglund. 2018. « An Engineered RNA Binding Protein with Improved Splicing Regulation ». *Nucleic Acids Research* 46(6):3152-68. doi: 10.1093/nar/gkx1304.
- Hamshere, Marion G., Emma E. Newman, Madawi Alwazzan, Balwinder S. Athwal, et J. David Brook. 1997. « Transcriptional Abnormality in Myotonic Dystrophy Affects *DMPK* but Not Neighboring Genes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94(14):7394-99. doi: 10.1073/pnas.94.14.7394.
- Han, Steve S. W., Luis A. Williams, et Kevin C. Eggan. 2011. « Constructing and Deconstructing Stem Cell Models of Neurological Disease ». *Neuron* 70(4):626-44. doi: 10.1016/j.neuron.2011.05.003.

- Harley, Calvin B., A. Bruce Futcher, et Carol W. Greider. 1990. « Telomeres Shorten during Ageing of Human Fibroblasts ». *Nature* 345(6274):458-60. doi: 10.1038/345458a0.
- Harmon, Erin B., Michelle L. Harmon, Tricia D. Larsen, Alicia F. Paulson, et M. Benjamin Perryman. 2008. « Myotonic Dystrophy Protein Kinase Is Expressed in Embryonic Myocytes and Is Required for Myotube Formation ». *Developmental Dynamics* 237(9):2353-66. doi: 10.1002/dvdy.21653.
- Harper, P. S., J. D. Brook, et E. Newman. 2001. *Myotonic Dystrophy*. W. B. Saunders.
- Harper, P. S., Van Engelen, B. Eymard, M. Rogers, et D. Wilcox. 2002. « 99th ENMC International Workshop: Myotonic Dystrophy: Present Management, Future Therapy 9–11 November 2001, Naarden, The Netherlands ». *Neuromuscular Disorders* 4.
- Hernández-Hernández, Oscar, Géraldine Sicot, Diana M. Dinca, Aline Huguet, Annie Nicole, Luc Buée, Arnold Munnich, Nicolas Sergeant, Geneviève Gourdon, et Mário Gomes-Pereira. 2013. « Synaptic Protein Dysregulation in Myotonic Dystrophy Type 1: Disease Neuropathogenesis beyond Missplicing ». *Rare Diseases* 1(1):e25553. doi: 10.4161/rdis.25553.
- Higham, Catherine F., Fernando Morales, Christina A. Cobbold, Daniel T. Haydon, et Darren G. Monckton. 2012. « High Levels of Somatic DNA Diversity at the Myotonic Dystrophy Type 1 Locus Are Driven by Ultra-Frequent Expansion and Contraction Mutations ». *Human Molecular Genetics* 21(11):2450-63. doi: 10.1093/hmg/dd5059.
- Hildebrandt, Ryan P., Kathryn R. Moss, Aleksandra Janusz-Kaminska, Luke A. Knudson, Lance T. Denes, Tanvi Saxena, Devi Prasad Boggupalli, Zhuangyue Li, Kun Lin, Gary J. Bassell, et Eric T. Wang. 2022. *Muscleblind-like Proteins Use Modular Domains to Localize RNAs by Riding Kinesins and Docking to Membranes*. preprint. Cell Biology. doi: 10.1101/2022.07.06.498900.
- Ho, T. H., Savkur, Poulos, Mancini, Swanson, et Cooper. 2005. « Colocalization of Muscleblind with RNA Foci Is Separable from Mis-Regulation of Alternative Splicing in Myotonic Dystrophy ». *Journal of Cell Science* 118(13):2923-33. doi: 10.1242/jcs.02404.
- Holt, Ian, Virginie Jacquemin, Majid Fardaei, Caroline A. Sewry, Gillian S. Butler-Browne, Denis Furling, J. David Brook, et Glenn E. Morris. 2009. « Muscleblind-Like Proteins ». *The American Journal of Pathology* 174(1):216-27. doi: 10.2353/ajpath.2009.080520.
- Holt, Ian, Saloni Mittal, Denis Furling, Gillian S. Butler-Browne, J. David Brook, et Glenn E. Morris. 2007. « Defective mRNA in Myotonic Dystrophy Accumulates at the Periphery of Nuclear Splicing Speckles: Defective mRNA and Nuclear Speckles in DM ». *Genes to Cells* 12(9):1035-48. doi: 10.1111/j.1365-2443.2007.01112.x.
- Hourdé, C., A. Vignaud, I. Beurdy, I. Martelly, A. Keller, et A. Ferry. 2006. « Sustained Peripheral Arterial Insufficiency Durably Impairs Normal and Regenerating Skeletal Muscle Function ». *The Journal of Physiological Sciences* 56(5):361-67. doi: 10.2170/physiolsci.RP008106.

- Hudson, A. J., G. C. Ebers, et D. E. Bulman. 1995. « The Skeletal Muscle Sodium and Chloride Channel Diseases ». *Brain* 118(2):547-63. doi: 10.1093/brain/118.2.547.
- Huguet, Aline, Fadia Medja, Annie Nicole, Alban Vignaud, Céline Guiraud-Dogan, Arnaud Ferry, Valérie Decostre, Jean-Yves Hogrel, Friedrich Metzger, Andreas Hoeflich, Martin Baraibar, Mário Gomes-Pereira, Jack Puymirat, Guillaume Bassez, Denis Furling, Arnold Munnich, et Geneviève Gourdon. 2012. « Molecular, Physiological, and Motor Performance Defects in DMSXL Mice Carrying >1,000 CTG Repeats from the Human DM1 Locus » édité par C. E. Pearson. *PLoS Genetics* 8(11):e1003043. doi: 10.1371/journal.pgen.1003043.
- Huichalaf, Claudia, Keiko Sakai, Bingwen Jin, Karlie Jones, Guo-Li Wang, Benedikt Schoser, Christiane Schneider-Gold, Partha Sarkar, Olivia M. Pereira-Smith, Nikolai Timchenko, et Lubov Timchenko. 2010. « Expansion of CUG RNA Repeats Causes Stress and Inhibition of Translation in Myotonic Dystrophy 1 (DM1) Cells ». *The FASEB Journal* 24(10):3706-19. doi: 10.1096/fj.09-151159.
- Ikeda, Miki, Mariko Taniguchi-Ikeda, Takema Kato, Yasuko Shinkai, Sonoko Tanaka, Hiroki Hagiwara, Naomichi Sasaki, Toshihiro Masaki, Kiichiro Matsumura, Masahiro Sonoo, Hiroki Kurahashi, et Fumiaki Saito. 2020. « Unexpected Mutations by CRISPR-Cas9 CTG Repeat Excision in Myotonic Dystrophy and Use of CRISPR Interference as an Alternative Approach ». *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 18:131-44. doi: 10.1016/j.omtm.2020.05.024.
- Jain, Ankur, et Ronald D. Vale. 2017. « RNA Phase Transitions in Repeat Expansion Disorders ». *Nature* 546(7657):243-47. doi: 10.1038/nature22386.
- Jansen, Gert, Patricia J. T. A. Groenen, Dietmar Bächner, Paul H. K. Jap, Marga Coerwinkel, Frank Oerlemans, Walther van den Broek, Bärbel Gohlsch, Dirk Pette, Jaap J. Plomp, Peter C. Molenaar, Marcel G. J. Nederhoff, Cees J. A. van Echteld, Marleen Dekker, Anton Berns, Horst Hameister, et Bé Wieringa. 1996. « Abnormal Myotonic Dystrophy Protein Kinase Levels Produce Only Mild Myopathy in Mice ». *Nature Genetics* 13(3):316-24. doi: 10.1038/ng0796-316.
- Jauvin, Dominic, Jessina Chrétien, Sanjay K. Pandey, Laurie Martineau, Lucille Revillod, Guillaume Bassez, Aline Lachon, A. Robert MacLeod, Geneviève Gourdon, Thurman M. Wheeler, Charles A. Thornton, C. Frank Bennett, et Jack Puymirat. 2017. « Targeting DMPK with Antisense Oligonucleotide Improves Muscle Strength in Myotonic Dystrophy Type 1 Mice ». *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 7:465-74. doi: 10.1016/j.omtn.2017.05.007.
- Jenquin, Jana R., Leslie A. Coonrod, Quinn A. Silverglate, Natalie A. Pellitier, Melissa A. Hale, Guangbin Xia, Masayuki Nakamori, et J. Andrew Berglund. 2018. « Furamide Rescues Myotonic Dystrophy Type I Associated Mis-Splicing through Multiple Mechanisms ». *ACS Chemical Biology* 13(9):2708-18. doi: 10.1021/acscchembio.8b00646.
- Jenquin, Jana R., Hongfen Yang, Robert W. Huigens III, Masayuki Nakamori, et J. Andrew Berglund. 2019. « Combination Treatment of Erythromycin and Furamide Provides Additive and Synergistic Rescue of Mis-Splicing in Myotonic Dystrophy Type 1

- Models ». *ACS Pharmacology & Translational Science* 2(4):247-63. doi: 10.1021/acsptsci.9b00020.
- Jiménez-Moreno, A. C., J. Raaphorst, H. Babačić, L. Wood, B. van Engelen, H. Lochmüller, B. Schoser, et S. Wenninger. 2018. « Falls and Resulting Fractures in Myotonic Dystrophy: Results from a Multinational Retrospective Survey ». *Neuromuscular Disorders* 28(3):229-35. doi: 10.1016/j.nmd.2017.12.010.
- Jones, Karlie, Christina Wei, Polina Iakova, Enrico Bugiardini, Christiane Schneider-Gold, Giovanni Meola, James Woodgett, James Killian, Nikolai A. Timchenko, et Lubov T. Timchenko. 2012. « GSK3 β Mediates Muscle Pathology in Myotonic Dystrophy ». *Journal of Clinical Investigation* 122(12):4461-72. doi: 10.1172/JCI64081.
- Jones, Karlie, Christina Wei, Benedikt Schoser, Giovanni Meola, Nikolai Timchenko, et Lubov Timchenko. 2015. « Reduction of Toxic RNAs in Myotonic Dystrophies Type 1 and Type 2 by the RNA Helicase P68/DDX5 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(26):8041-45. doi: 10.1073/pnas.1422273112.
- Joosten, Isis B. T., Debby M. E. I. Hellebrekers, Bianca T. A. de Greef, Hubert J. M. Smeets, Christine E. M. de Die-Smulders, Catharina G. Faber, et Monique M. Gerrits. 2020. « Parental Repeat Length Instability in Myotonic Dystrophy Type 1 Pre- and Protomutations ». *European Journal of Human Genetics* 28(7):956-62. doi: 10.1038/s41431-020-0601-4.
- Ju, Tz-Chuen, Hui-Mei Chen, Jiun-Tsai Lin, Ching-Pang Chang, Wei-Cheng Chang, Jheng-Jie Kang, Cheng-Pu Sun, Mi-Hua Tao, Pang-Hsien Tu, Chen Chang, Dennis W. Dickson, et Yijuang Chern. 2011. « Nuclear Translocation of AMPK-A1 Potentiates Striatal Neurodegeneration in Huntington's Disease ». *Journal of Cell Biology* 194(2):209-27. doi: 10.1083/jcb.201105010.
- Kaliman, Perla, et Esther Llagostera. 2008. « Myotonic Dystrophy Protein Kinase (DMPK) and Its Role in the Pathogenesis of Myotonic Dystrophy 1 ». *Cellular Signalling* 20(11):1935-41. doi: 10.1016/j.cellsig.2008.05.005.
- Kalsotra, A., X. Xiao, A. J. Ward, J. C. Castle, J. M. Johnson, C. B. Burge, et T. A. Cooper. 2008. « A Postnatal Switch of CELF and MBNL Proteins Reprograms Alternative Splicing in the Developing Heart ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(51):20333-38. doi: 10.1073/pnas.0809045105.
- Kalsotra, Auinash, Ravi K. Singh, Priyatansh Gurha, Amanda J. Ward, Chad J. Creighton, et Thomas A. Cooper. 2014. « The Mef2 Transcription Network Is Disrupted in Myotonic Dystrophy Heart Tissue, Dramatically Altering MiRNA and mRNA Expression ». *Cell Reports* 6(2):336-45. doi: 10.1016/j.celrep.2013.12.025.
- Kalsotra, Auinash, Xinshu Xiao, Amanda J. Ward, John C. Castle, Jason M. Johnson, Christopher B. Burge, et Thomas A. Cooper. 2008. « A Postnatal Switch of CELF and MBNL Proteins Reprograms Alternative Splicing in the Developing Heart ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(51):20333-38. doi: 10.1073/pnas.0809045105.

- Kanadia, R. N., J. Shin, Y. Yuan, S. G. Beattie, T. M. Wheeler, C. A. Thornton, et M. S. Swanson. 2006. « Reversal of RNA Missplicing and Myotonia after Muscleblind Overexpression in a Mouse Poly(CUG) Model for Myotonic Dystrophy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(31):11748-53. doi: 10.1073/pnas.0604970103.
- Kanadia, Rahul N., Karen A. Johnstone, Ami Mankodi, Codrin Lungu, Charles A. Thornton, Douglas Esson, Adrian M. Timmers, William W. Hauswirth, et Maurice S. Swanson. 2003. « A Muscleblind Knockout Model for Myotonic Dystrophy ». *Science* 302(5652):1978-80. doi: 10.1126/science.1088583.
- Kanadia, Rahul N, Carl R. Urbinati, Valerie J. Crusselle, Defang Luo, Young-Jae Lee, Jeffrey K. Harrison, S. Paul Oh, et Maurice S. Swanson. 2003. « Developmental Expression of Mouse Muscleblind Genes Mbnl1, Mbnl2 and Mbnl3 ». *Gene Expression Patterns* 3(4):459-62. doi: 10.1016/S1567-133X(03)00064-4.
- Kang, Seongman, Adam Jaworski, Keiichi Ohshima, et Robert D. Wells. 1995. « Expansion and Deletion of CTG Repeats from Human Disease Genes Are Determined by the Direction of Replication in *E. Coli* ». *Nature Genetics* 10(2):213-18. doi: 10.1038/ng0695-213.
- Kelley, Chase P., Maja C. Haerle, et Eric T. Wang. 2022. « Negative Autoregulation Mitigates Collateral RNase Activity of Repeat-Targeting CRISPR-Cas13d in Mammalian Cells ». *Cell Reports* 40(7):111226. doi: 10.1016/j.celrep.2022.111226.
- Ketley, Ami, Catherine Z. Chen, Xin Li, Sukrat Arya, Thelma E. Robinson, Javier Granados-Riveron, Inyang Udosen, Glenn E. Morris, Ian Holt, Denis Furling, Soraya Chaouch, Ben Haworth, Noel Southall, Paul Shinn, Wei Zheng, Christopher P. Austin, Christopher J. Hayes, et J. David Brook. 2014. « High-Content Screening Identifies Small Molecules That Remove Nuclear Foci, Affect MBNL Distribution and CELF1 Protein Levels via a PKC-Independent Pathway in Myotonic Dystrophy Cell Lines ». *Human Molecular Genetics* 23(6):1551-62. doi: 10.1093/hmg/ddt542.
- Kim, D. H., Marc-Andre Langlois, Kwang-Back Lee, Arthur D. Riggs, Jack Puymirat, et John J. Rossi. 2005. « HnRNP H Inhibits Nuclear Export of mRNA Containing Expanded CUG Repeats and a Distal Branch Point Sequence ». *Nucleic Acids Research* 33(12):3866-74. doi: 10.1093/nar/gki698.
- Kim, Kook Hwan, et Myung-Shik Lee. 2014. « Autophagy — a Key Player in Cellular and Body Metabolism ». *Nature Reviews Endocrinology* 10(6):322-37. doi: 10.1038/nrendo.2014.35.
- Kimura, Takashi, Masayuki Nakamori, John D. Lueck, Pierre Pouliquin, Futoshi Aoike, Harutoshi Fujimura, Robert T. Dirksen, Masanori P. Takahashi, Angela F. Dulhunty, et Saburo Sakoda. 2005. « Altered mRNA Splicing of the Skeletal Muscle Ryanodine Receptor and Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase in Myotonic Dystrophy Type 1 ». *Human Molecular Genetics* 14(15):2189-2200. doi: 10.1093/hmg/ddi223.
- Kino, Y. 2004. « Muscleblind Protein, MBNL1/EXP, Binds Specifically to CHHG Repeats ». *Human Molecular Genetics* 13(5):495-507. doi: 10.1093/hmg/ddh056.

- Kino, Yoshihiro, Chika Washizu, Masaru Kurosawa, Yoko Oma, Nobutaka Hattori, Shoichi Ishiura, et Nobuyuki Nukina. 2015. « Nuclear Localization of MBNL1: Splicing-Mediated Autoregulation and Repression of Repeat-Derived Aberrant Proteins ». *Human Molecular Genetics* 24(3):740-56. doi: 10.1093/hmg/ddu492.
- Klein, Arnaud F., Ludovic Arandel, Joelle Marie, et Denis Furling. 2020. « FISH Protocol for Myotonic Dystrophy Type 1 Cells ». P. 203-15 in *Trinucleotide Repeats*. Vol. 2056, *Methods in Molecular Biology*, édité par G.-F. Richard. New York, NY: Springer New York.
- Klein, Arnaud F., Mitsuru Ebihara, Christine Alexander, Marie-Josée Dicaire, A. Marie-Josée Sasseville, Yves Langelier, Guy A. Rouleau, et Bernard Brais. 2008. « PABPN1 Polyalanine Tract Deletion and Long Expansions Modify Its Aggregation Pattern and Expression ». *Experimental Cell Research* 314(8):1652-66. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.02.005.
- Klein, Arnaud F., Miguel A. Varela, Ludovic Arandel, Ashling Holland, Naira Naouar, Andrey Arzumanov, David Seoane, Lucile Revillod, Guillaume Bassez, Arnaud Ferry, Dominic Jauvin, Genevieve Gourdon, Jack Puymirat, Michael J. Gait, Denis Furling, et Matthew J. A. Wood. 2019. « Peptide-Conjugated Oligonucleotides Evoke Long-Lasting Myotonic Dystrophy Correction in Patient-Derived Cells and Mice ». *Journal of Clinical Investigation* 129(11):4739-44. doi: 10.1172/JCI128205.
- Klesert, Todd R., Diane H. Cho, John I. Clark, James Maylie, John Adelman, Lauren Snider, Eric C. Yuen, Philippe Soriano, et Stephen J. Tapscott. 2000. « Mice Deficient in Six5 Develop Cataracts: Implications for Myotonic Dystrophy ». *Nature Genetics* 25(1):105-9. doi: 10.1038/75490.
- Klesert, Todd R., Anne D. Otten, Thomas D. Bird, et Stephen J. Tapscott. 1997. « Trinucleotide Repeat Expansion at the Myotonic Dystrophy Locus Reduces Expression of DMAHP ». *Nature Genetics* 16(4):402-6. doi: 10.1038/ng0897-402.
- Koehorst, Emma, Judit Núñez-Manchón, Alfonsina Ballester-López, Miriam Almendrote, Giuseppe Lucente, Andrea Arbex, Jakub Chojnacki, Rafael P. Vázquez-Manrique, Ana Pilar Gómez-Escribano, Guillem Pintos-Morell, Jaume Coll-Cantí, Alba Ramos-Fransi, Alicia Martínez-Piñeiro, Mònica Suelves, et Gisela Nogales-Gadea. 2021. « Characterization of RAN Translation and Antisense Transcription in Primary Cell Cultures of Patients with Myotonic Dystrophy Type 1 ». *Journal of Clinical Medicine* 10(23):5520. doi: 10.3390/jcm10235520.
- Konieczny, Patryk, Ewa Stepniak-Konieczna, et Krzysztof Sobczak. 2014a. « MBNL Proteins and Their Target RNAs, Interaction and Splicing Regulation ». *Nucleic Acids Research* 42(17):10873-87. doi: 10.1093/nar/gku767.
- Konieczny, Patryk, Ewa Stepniak-Konieczna, et Krzysztof Sobczak. 2014b. « MBNL Proteins and Their Target RNAs, Interaction and Splicing Regulation ». *Nucleic Acids Research* 42(17):10873-87. doi: 10.1093/nar/gku767.
- Konieczny, Patryk, Ewa Stepniak-Konieczna, Katarzyna Taylor, Łukasz J. Sznajder, et Krzysztof Sobczak. 2017. « Autoregulation of MBNL1 Function by Exon 1 Exclusion

- from MBNL1 Transcript ». *Nucleic Acids Research* 45(4):1760-75. doi: 10.1093/nar/gkw1158.
- Konieczny, Piotr, Estela Selma-Soriano, Anna S. Rapisarda, Juan M. Fernandez-Costa, Manuel Perez-Alonso, et Ruben Artero. 2017. « Myotonic Dystrophy: Candidate Small Molecule Therapeutics ». *Drug Discovery Today* 22(11):1740-48. doi: 10.1016/j.drudis.2017.07.011.
- Koshelev, Misha, Satyam Sarma, Roger E. Price, Xander H. T. Wehrens, et Thomas A. Cooper. 2010. « Heart-Specific Overexpression of CUGBP1 Reproduces Functional and Molecular Abnormalities of Myotonic Dystrophy Type 1 ». *Human Molecular Genetics* 19(6):1066-75. doi: 10.1093/hmg/ddp570.
- Koutsoulidou, Andrie, Tassos C. Kyriakides, George K. Papadimas, Yiolanda Christou, Evangelia Kararizou, Eleni Zamba Papanicolaou, et Leonidas A. Phylactou. 2015. « Elevated Muscle-Specific MiRNAs in Serum of Myotonic Dystrophy Patients Relate to Muscle Disease Progress » édité par R. Krahe. *PLOS ONE* 10(4):e0125341. doi: 10.1371/journal.pone.0125341.
- Krol, Jacek, Agnieszka Fiszer, Agnieszka Mykowska, Krzysztof Sobczak, Mateusz de Mezer, et Włodzimierz J. Krzyzosiak. 2007. « Ribonuclease Dicer Cleaves Triplet Repeat Hairpins into Shorter Repeats That Silence Specific Targets ». *Molecular Cell* 25(4):575-86. doi: 10.1016/j.molcel.2007.01.031.
- Kuyumcu-Martinez, N. Muge, Guey-Shin Wang, et Thomas A. Cooper. 2007. « Increased Steady-State Levels of CUGBP1 in Myotonic Dystrophy 1 Are Due to PKC-Mediated Hyperphosphorylation ». *Molecular Cell* 28(1):68-78. doi: 10.1016/j.molcel.2007.07.027.
- Laberge, Luc, Benjamin Gallais, Julie Auclair, Yves Dauvilliers, Jean Mathieu, et Cynthia Gagnon. 2020. « Predicting Daytime Sleepiness and Fatigue: A 9-Year Prospective Study in Myotonic Dystrophy Type 1 ». *Journal of Neurology* 267(2):461-68. doi: 10.1007/s00415-019-09592-7.
- Langlois, Marc-André, Christelle Boniface, Gang Wang, Jessica Alluin, Paul M. Salvaterra, Jack Puymirat, John J. Rossi, et Nan Sook Lee. 2005. « Cytoplasmic and Nuclear Retained DMPK MRNAs Are Targets for RNA Interference in Myotonic Dystrophy Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 280(17):16949-54. doi: 10.1074/jbc.M501591200.
- Langlois, Marc-André, Nan Sook Lee, John J. Rossi, et Jack Puymirat. 2003. « Hammerhead Ribozyme-Mediated Destruction of Nuclear Foci in Myotonic Dystrophy Myoblasts ». *Molecular Therapy* 7(5):670-80. doi: 10.1016/S1525-0016(03)00068-6.
- Larsen, Jan, Olof J. Pettersson, Maria Jakobsen, Rune Thomsen, Christina B. Pedersen, Jens M. Hertz, Niels Gregersen, Thomas J. Corydon, et Thomas G. Jensen. 2011. « Myoblasts Generated by Lentiviral Mediated MyoD Transduction of Myotonic Dystrophy Type 1 (DM1) Fibroblasts Can Be Used for Assays of Therapeutic Molecules ». *BMC Research Notes* 4(1):490. doi: 10.1186/1756-0500-4-490.

- Laurent, François-Xavier, Alain Sureau, Arnaud F. Klein, François Trouslard, Erwan Gasnier, Denis Furling, et Joëlle Marie. 2012. « New Function for the RNA Helicase P68/DDX5 as a Modifier of MBNL1 Activity on Expanded CUG Repeats ». *Nucleic Acids Research* 40(7):3159-71. doi: 10.1093/nar/gkr1228.
- Laustriat, Delphine, Jacqueline Gide, Laetitia Barrault, Emilie Chautard, Clara Benoit, Didier Auboeuf, Anne Boland, Christophe Battail, François Artiguenave, Jean-François Deleuze, Paule Bénit, Pierre Rustin, Sylvia Franc, Guillaume Charpentier, Denis Furling, Guillaume Bassez, Xavier Nissan, Cécile Martinat, Marc Peschanski, et Sandrine Baghdoyan. 2015. « In Vitro and In Vivo Modulation of Alternative Splicing by the Biguanide Metformin ». *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 4:e262. doi: 10.1038/mtna.2015.35.
- Lavedan, C., H. Hofmann-Radvanyi, J. P. Rabes, J. Roume, et C. Junien. 1993. « Different Sex-Dependent Constraints in CTG Length Variation as Explanation for Congenital Myotonic Dystrophy ». *The Lancet* 341(8839):237. doi: 10.1016/0140-6736(93)90097-Z.
- Lee, Johanna E., C. Frank Bennett, et Thomas A. Cooper. 2012. « RNase H-Mediated Degradation of Toxic RNA in Myotonic Dystrophy Type 1 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(11):4221-26. doi: 10.1073/pnas.1117019109.
- Lee, Kuang Yung, Moyi Li, Mini Manchanda, Ranjan Batra, Konstantinos Charizanis, Apoorva Mohan, Sonisha A. Warren, Christopher M. Chamberlain, Dustin Finn, Hannah Hong, Hassan Ashraf, Hideko Kasahara, Laura P. W. Ranum, et Maurice S. Swanson. 2013. « Compound loss of muscleblind-like function in myotonic dystrophy ». *EMBO Molecular Medicine* 5(12):1887-1900. doi: 10.1002/emmm.201303275.
- Lee, Kuang-Yung, Moyi Li, Mini Manchanda, Ranjan Batra, Konstantinos Charizanis, Apoorva Mohan, Sonisha A. Warren, Christopher M. Chamberlain, Dustin Finn, Hannah Hong, Hassan Ashraf, Hideko Kasahara, Laura P. W. Ranum, et Maurice S. Swanson. 2013. « Compound Loss of Muscleblind-like Function in Myotonic Dystrophy ». *EMBO Molecular Medicine* 5(12):1887-1900. doi: 10.1002/emmm.201303275.
- Lee, Kuang-Yung, Carol Seah, Ching Li, Yu-Fu Chen, Chwen-Yu Chen, Ching-I. Wu, Po-Cheng Liao, Yu-Chiau Shyu, Hailey R. Olafson, Kendra K. McKee, Eric T. Wang, Chi-Hsiao Yeh, et Chao-Hung Wang. 2022. « Mice lacking MBNL1 and MBNL2 exhibit sudden cardiac death and molecular signatures recapitulating myotonic dystrophy ». *Human Molecular Genetics* 5-6. doi: 10.1093/hmg/ddac108.
- Leger, Andrew J., Leocadia M. Mosquea, Nicholas P. Clayton, I.-Huan Wu, Timothy Weeden, Carol A. Nelson, Lucy Phillips, Errin Roberts, Peter A. Piepenhagen, Seng H. Cheng, et Bruce M. Wentworth. 2013. « Systemic Delivery of a Peptide-Linked Morpholino Oligonucleotide Neutralizes Mutant RNA Toxicity in a Mouse Model of Myotonic Dystrophy ». *Nucleic Acid Therapeutics* 23(2):109-17. doi: 10.1089/nat.2012.0404.
- Li, Moyi, Yan Zhuang, Ranjan Batra, James D. Thomas, Mao Li, Curtis A. Nutter, Marina M. Scotti, Helmut A. Carter, Zhan Jun Wang, Xu-Sheng Huang, Chuan Qiang Pu, Maurice S. Swanson, et Wei Xie. s.d. « HNRNPA1-Induced Spliceopathy in a Transgenic Mouse Model of Myotonic Dystrophy ». *MEDICAL SCIENCES* 6.

- Lin, Xiaoyan, Jill W. Miller, Ami Mankodi, Rahul N. Kanadia, Yuan Yuan, Richard T. Moxley, Maurice S. Swanson, et Charles A. Thornton. 2006. « Failure of MBNL1-Dependent Post-Natal Splicing Transitions in Myotonic Dystrophy ». *Human Molecular Genetics* 15(13):2087-97. doi: 10.1093/hmg/ddl132.
- Liquori, C. L. 2001. « Myotonic Dystrophy Type 2 Caused by a CCTG Expansion in Intron 1 of ZNF9 ». *Science* 293(5531):864-67. doi: 10.1126/science.1062125.
- Lo Scudato, Mirella, Karine Poulard, Célia Sourd, Stéphanie Tomé, Arnaud F. Klein, Guillaume Corre, Aline Huguet, Denis Furling, Geneviève Gourdon, et Ana Buj-Bello. 2019. « Genome Editing of Expanded CTG Repeats within the Human DMPK Gene Reduces Nuclear RNA Foci in the Muscle of DM1 Mice ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 27(8):1372-88. doi: 10.1016/j.ymthe.2019.05.021.
- López Castel, Arturo, Sarah Joann Overby, et Rubén Artero. 2019. « MicroRNA-Based Therapeutic Perspectives in Myotonic Dystrophy ». *International Journal of Molecular Sciences* 20(22):5600. doi: 10.3390/ijms20225600.
- Loro, E., F. Rinaldi, A. Malena, E. Masiero, G. Novelli, C. Angelini, V. Romeo, M. Sandri, A. Botta, et L. Vergani. 2010. « Normal Myogenesis and Increased Apoptosis in Myotonic Dystrophy Type-1 Muscle Cells ». *Cell Death & Differentiation* 17(8):1315-24. doi: 10.1038/cdd.2010.33.
- Love, Michael I., Wolfgang Huber, et Simon Anders. 2014. « Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-Seq Data with DESeq2 ». *Genome Biology* 15(12):550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.
- Mahadevan, M., C. Tsilfidis, L. Sabourin, G. Shutler, C. Amemiya, G. Jansen, C. Neville, M. Narang, J. Barcelo, K. O'Hoy, et al. et. 1992. « Myotonic Dystrophy Mutation: An Unstable CTG Repeat in the 3' Untranslated Region of the Gene ». *Science* 255(5049):1253-55. doi: 10.1126/science.1546325.
- Mamchaoui, Kamel, Capucine Trollet, Anne Bigot, Elisa Negroni, Soraya Chaouch, Annie Wolff, Prashanth K. Kandalla, Solenne Marie, James Di Santo, Jean Lacau St Guily, Francesco Muntoni, Jihee Kim, Susanne Philippi, Simone Spuler, Nicolas Levy, Sergiu C. Blumen, Thomas Voit, Woodring E. Wright, Ahmed Aamiri, Gillian Butler-Browne, et Vincent Mouly. 2011. « Immortalized Pathological Human Myoblasts: Towards a Universal Tool for the Study of Neuromuscular Disorders ». *Skeletal Muscle* 1(1):34. doi: 10.1186/2044-5040-1-34.
- Mamchaoui, Kamel, Capucine Trollet, Anne Bigot, Elisa Negroni, Soraya Chaouch, Annie Wolff, Prashanth K. Kandalla, Solenne Marie, James Di Santo, Jean St Guily, Francesco Muntoni, Jihee Kim, Susanne Philippi, Simone Spuler, Nicolas Levy, Sergiu C. Blumen, Thomas Voit, Woodring E. Wright, Ahmed Aamiri, Gillian Butler-Browne, et Vincent Mouly. 2011. « Immortalized Pathological Human Myoblasts: Towards a Universal Tool for the Study of Neuromuscular Disorders ». *Skeletal Muscle* 1(1):34. doi: 10.1186/2044-5040-1-34.

- Mankodi, Ami, Eric Logigian, Linda Callahan, Carolyn McClain, Robert White, Don Henderson, Matt Krym, et Charles A. Thornton. 2000. « Myotonic Dystrophy in Transgenic Mice Expressing an Expanded CUG Repeat ». 289:5.
- Mankodi, Ami, Masanori P. Takahashi, Hong Jiang, Carol L. Beck, William J. Bowers, Richard T. Moxley, Stephen C. Cannon, et Charles A. Thornton. 2002. « Expanded CUG Repeats Trigger Aberrant Splicing of CIC-1 Chloride Channel Pre-mRNA and Hyperexcitability of Skeletal Muscle in Myotonic Dystrophy ». *Molecular Cell* 10(1):35-44. doi: 10.1016/S1097-2765(02)00563-4.
- Manning, Kassie S., Ashish N. Rao, Miguel Castro, et Thomas A. Cooper. 2017. « BNA^{NC} Gapmers Revert Splicing and Reduce RNA Foci with Low Toxicity in Myotonic Dystrophy Cells ». *ACS Chemical Biology* 12(10):2503-9. doi: 10.1021/acscchembio.7b00416.
- Marteyn, Antoine, Yves Maury, Morgane M. Gauthier, Camille Lecuyer, Remi Vernet, Jérôme A. Denis, Geneviève Pietu, Marc Peschanski, et Cécile Martinat. 2011. « Mutant Human Embryonic Stem Cells Reveal Neurite and Synapse Formation Defects in Type 1 Myotonic Dystrophy ». *Cell Stem Cell* 8(4):434-44. doi: 10.1016/j.stem.2011.02.004.
- Martineau, Laurie, Véronique Racine, Siham Ait Benichou, et Jack Puymirat. 2018. « Lymphoblastoids Cell Lines – Derived iPSC Line from a 26-Year-Old Myotonic Dystrophy Type 1 Patient Carrying (CTG) 200 Expansion in the DMPK Gene: CHUQI001-A ». *Stem Cell Research* 26:103-6. doi: 10.1016/j.scr.2017.12.010.
- Masuda, Akio, Henriette Skovgaard Andersen, Thomas Koed Doktor, Takaaki Okamoto, Mikako Ito, Brage Storstein Andresen, et Kinji Ohno. 2012. « CUGBP1 and MBNL1 Preferentially Bind to 3' UTRs and Facilitate mRNA Decay ». *Scientific Reports* 2(1):209. doi: 10.1038/srep00209.
- Mathieu, J., P. Allard, L. Potvin, C. Prévost, et P. Bégin. 1999. « A 10-Year Study of Mortality in a Cohort of Patients with Myotonic Dystrophy ». *Neurology* 52(8):1658-1658. doi: 10.1212/WNL.52.8.1658.
- Meola, Giovanni, et Rosanna Cardani. 2015. « Myotonic Dystrophies: An Update on Clinical Aspects, Genetic, Pathology, and Molecular Pathomechanisms ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1852(4):594-606. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.05.019.
- Michel, Lise, Aline Huguet-Lachon, et Geneviève Gourdon. 2015. « Sense and Antisense DMPK RNA Foci Accumulate in DM1 Tissues during Development » édité par R. Artero. *PLOS ONE* 10(9):e0137620. doi: 10.1371/journal.pone.0137620.
- Miller, J. W. 2000. « Recruitment of Human Muscleblind Proteins to (CUG)_n Expansions Associated with Myotonic Dystrophy ». *The EMBO Journal* 19(17):4439-48. doi: 10.1093/emboj/19.17.4439.
- Monckton, D. G., L. J. C. Wong, T. Ashizawa, et C. T. Caskey. 1995. « Somatic Mosaicism, Germline Expansions, Germline Reversions and Intergenerational Reductions in Myotonic Dystrophy Males: Small Pool PCR Analyses ». *Human Molecular Genetics* 4(1):1-8. doi: 10.1093/hmg/4.1.1.

- Montagnese, Federica, Stefania Mondello, Stephan Wenninger, Wolfram Kress, et Benedikt Schoser. 2017. « Assessing the Influence of Age and Gender on the Phenotype of Myotonic Dystrophy Type 2 ». *Journal of Neurology* 264(12):2472-80. doi: 10.1007/s00415-017-8653-2.
- Morales, Fernando, Jillian M. Couto, Catherine F. Higham, Grant Hogg, Patricia Cuenca, Claudia Braidá, Richard H. Wilson, Berit Adam, Gerardo del Valle, Roberto Brian, Mauricio Sittenfeld, Tetsuo Ashizawa, Alison Wilcox, Douglas E. Wilcox, et Darren G. Monckton. 2012. « Somatic Instability of the Expanded CTG Triplet Repeat in Myotonic Dystrophy Type 1 Is a Heritable Quantitative Trait and Modifier of Disease Severity ». *Human Molecular Genetics* 21(16):3558-67. doi: 10.1093/hmg/dds185.
- Morriss, Ginny R., Kimal Rajapakshe, Shixia Huang, Cristian Coarfa, et Thomas A. Cooper. 2018. « Mechanisms of Skeletal Muscle Wasting in a Mouse Model for Myotonic Dystrophy Type 1 ». *Human Molecular Genetics* 27(16):2789-2804. doi: 10.1093/hmg/ddy192.
- Mosbach, Valentine, Lucie Poggi, David Viterbo, Marine Charpentier, et Guy-Franck Richard. 2018. « TALEN-Induced Double-Strand Break Repair of CTG Trinucleotide Repeats ». *Cell Reports* 22(8):2146-59. doi: 10.1016/j.celrep.2018.01.083.
- Mouly, V., F. Edom, J. P. Barbet, et G. S. Butler-Browne. 1993. « Plasticity of Human Satellite Cells ». *Neuromuscular Disorders* 3(5-6):371-77. doi: 10.1016/0960-8966(93)90080-4.
- Mulders, Susan A. M., Walther J. A. A. van den Broek, Thurman M. Wheeler, Huib J. E. Croes, Petra van Kuik-Romeijn, Sjef J. de Kimpe, Denis Furling, Gerard J. Platenburg, Geneviève Gourdon, Charles A. Thornton, Bé Wieringa, et Derick G. Wansink. 2009. « Triplet-Repeat Oligonucleotide-Mediated Reversal of RNA Toxicity in Myotonic Dystrophy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(33):13915-20. doi: 10.1073/pnas.0905780106.
- Nakamori, Masayuki, Geneviève Gourdon, et Charles A. Thornton. 2011. « Stabilization of Expanded (CTG)ⁿ(CAG) Repeats by Antisense Oligonucleotides ». *Molecular Therapy* 19(12):2222-27. doi: 10.1038/mt.2011.191.
- Nakamori, Masayuki, Takashi Kimura, Harutoshi Fujimura, Masanori P. Takahashi, et Saburo Sakoda. 2007. « Altered mRNA Splicing of Dystrophin in Type 1 Myotonic Dystrophy ». *Muscle & Nerve* 36(2):251-57. doi: 10.1002/mus.20809.
- Nakamori, Masayuki, Christopher E. Pearson, et Charles A. Thornton. 2011. « Bidirectional Transcription Stimulates Expansion and Contraction of Expanded (CTG)ⁿ(CAG) Repeats ». *Human Molecular Genetics* 20(3):580-88. doi: 10.1093/hmg/ddq501.
- Nakamori, Masayuki, Krzysztof Sobczak, Araya Puwanant, Steve Welle, Katy Eichinger, Shree Pandya, Jeanne Dekdebrun, Chad R. Heatwole, Michael P. McDermott, Tian Chen, Melissa Cline, Rabi Tawil, Robert J. Osborne, Thurman M. Wheeler, Maurice S. Swanson, Richard T. Moxley, et Charles A. Thornton. 2013. « Splicing Biomarkers of Disease Severity in Myotonic Dystrophy ». *Annals of Neurology* 74(6):862-72. doi: 10.1002/ana.23992.

- Nakamori, Masayuki, Katarzyna Taylor, Hideki Mochizuki, Krzysztof Sobczak, et Masanori P. Takahashi. 2016. « Oral Administration of Erythromycin Decreases RNA Toxicity in Myotonic Dystrophy ». *Annals of Clinical and Translational Neurology* 3(1):42-54. doi: 10.1002/acn3.271.
- O'Hoy, Kim L., Catherine Tsilfidis, Mani S. Mahadevan, Catherine E. Neville, Juana Barceló, Alasdair G. W. Hunter, et Robert G. Korneluk. 1993. « Reduction in Size of the Myotonic Dystrophy Trinucleotide Repeat Mutation During Transmission ». *Science* 259(5096):809-12. doi: 10.1126/science.8094260.
- O'Leary, Debra A., Leonardo Vargas, Orzala Sharif, Michael E. Garcia, Yury J. Sigal, Siu-Kei Chow, Christian Schmedt, Jeremy S. Caldwell, Achim Brinker, et Ingo H. Engels. 2010. « HTS-Compatible Patient-Derived Cell-Based Assay to Identify Small Molecule Modulators of Aberrant Splicing in Myotonic Dystrophy Type 1 ». *Current Chemical Genomics* 4:9-18. doi: 10.2174/1875397301004010009.
- Osborne, Robert J., Xiaoyan Lin, Stephen Welle, Krzysztof Sobczak, Jason R. O'Rourke, Maurice S. Swanson, et Charles A. Thornton. 2009. « Transcriptional and Post-Transcriptional Impact of Toxic RNA in Myotonic Dystrophy ». *Human Molecular Genetics* 18(8):1471-81. doi: 10.1093/hmg/ddp058.
- Otero, Brittney A., Kiril Poukalov, Ryan P. Hildebrandt, Charles A. Thornton, Kenji Jinnai, Harutoshi Fujimura, Takashi Kimura, Katharine A. Hagerman, Jacinda B. Sampson, John W. Day, et Eric T. Wang. 2021. « Transcriptome Alterations in Myotonic Dystrophy Frontal Cortex ». *Cell Reports* 34(3):108634. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108634.
- Otten, A. D., et S. J. Tapscott. 1995. « Triplet Repeat Expansion in Myotonic Dystrophy Alters the Adjacent Chromatin Structure. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(12):5465-69. doi: 10.1073/pnas.92.12.5465.
- Overby, Sarah J., Estefanía Cerro-Herreros, Beatriz Llamusi, et Ruben Artero. 2018. « RNA-Mediated Therapies in Myotonic Dystrophy ». *Drug Discovery Today* 23(12):2013-22. doi: 10.1016/j.drudis.2018.08.004.
- Pamudurti, Nagarjuna Reddy, Osnat Bartok, Marvin Jens, Reut Ashwal-Fluss, Christin Stottmeister, Larissa Ruhe, Mor Hanan, Emanuel Wyler, Daniel Perez-Hernandez, Evelyn Ramberger, Shlomo Shenzis, Moshe Samson, Gunnar Dittmar, Markus Landthaler, Marina Chekulaeva, Nikolaus Rajewsky, et Sebastian Kadener. 2017. « Translation of CircRNAs ». *Molecular Cell* 66(1):9-21.e7. doi: 10.1016/j.molcel.2017.02.021.
- Panaite, Petrica-Adrian, Emilien Gantelet, Rudolf Kraftsik, Geneviève Gourdon, Thierry Kuntzer, et Ibteham Barakat-Walter. 2008. « Myotonic Dystrophy Transgenic Mice Exhibit Pathologic Abnormalities in Diaphragm Neuromuscular Junctions and Phrenic Nerves ». *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 67(8):763-72. doi: 10.1097/NEN.0b013e318180ec64.
- Pandey, Sanjay K., Thurman M. Wheeler, Samantha L. Justice, Aneza Kim, Husam S. Younis, Danielle Gattis, Dominic Jauvin, Jack Puymirat, Eric E. Swayze, Susan M. Freier, C. Frank Bennett, Charles A. Thornton, et A. Robert MacLeod. 2015. « Identification and

- Characterization of Modified Antisense Oligonucleotides Targeting *DMPK* in Mice and Nonhuman Primates for the Treatment of Myotonic Dystrophy Type 1 ». *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 355(2):329-40. doi: 10.1124/jpet.115.226969.
- Pantic, Boris, Doriana Borgia, Silvia Giunco, Adriana Malena, Tohru Kiyono, Sergio Salvatori, Anita De Rossi, Emiliano Giardina, Federica Sangiuolo, Elena Pegoraro, Lodovica Vergani, et Annalisa Botta. 2016a. « Reliable and Versatile Immortal Muscle Cell Models from Healthy and Myotonic Dystrophy Type 1 Primary Human Myoblasts ». *Experimental Cell Research* 342(1):39-51. doi: 10.1016/j.yexcr.2016.02.013.
- Pantic, Boris, Doriana Borgia, Silvia Giunco, Adriana Malena, Tohru Kiyono, Sergio Salvatori, Anita De Rossi, Emiliano Giardina, Federica Sangiuolo, Elena Pegoraro, Lodovica Vergani, et Annalisa Botta. 2016b. « Reliable and Versatile Immortal Muscle Cell Models from Healthy and Myotonic Dystrophy Type 1 Primary Human Myoblasts ». *Experimental Cell Research* 342(1):39-51. doi: 10.1016/j.yexcr.2016.02.013.
- Park, In-Hyun, Natasha Arora, Hongguang Huo, Nimet Maherali, Tim Ahfeldt, Akiko Shimamura, M. William Lensch, Chad Cowan, Konrad Hochedlinger, et George Q. Daley. 2008. « Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells ». *Cell* 134(5):877-86. doi: 10.1016/j.cell.2008.07.041.
- Pascual, Maya, Marta Vicente, Lidon Monferrer, et Ruben Artero. 2006. « The Muscleblind Family of Proteins: An Emerging Class of Regulators of Developmentally Programmed Alternative Splicing ». *Differentiation* 74(2-3):65-80. doi: 10.1111/j.1432-0436.2006.00060.x.
- Paul, Sharan, Warunee Dansithong, Sonali P. Jog, Ian Holt, Saloni Mittal, J. David Brook, Glenn E. Morris, Lucio Comai, et Sita Reddy. 2011. « Expanded CUG Repeats Dysregulate RNA Splicing by Altering the Stoichiometry of the Muscleblind 1 Complex ». *Journal of Biological Chemistry* 286(44):38427-38. doi: 10.1074/jbc.M111.255224.
- Pelechano, Vicent, et Lars M. Steinmetz. 2013. « Gene Regulation by Antisense Transcription ». *Nature Reviews Genetics* 14(12):880-93. doi: 10.1038/nrg3594.
- Pelletier, Richard, Frederic Hamel, Daniel Beaulieu, Lysanne Patry, Caroline Haineault, Mark Tarnopolsky, Benedikt Schoser, et Jack Puymirat. 2009. « Absence of a Differentiation Defect in Muscle Satellite Cells from DM2 Patients ». *Neurobiology of Disease* 36(1):181-90. doi: 10.1016/j.nbd.2009.07.009.
- Perbellini, Riccardo, Simona Greco, Gianluca Sarra-Ferraris, Rosanna Cardani, Maurizio C. Capogrossi, Giovanni Meola, et Fabio Martelli. 2011. « Dysregulation and Cellular Mislocalization of Specific MiRNAs in Myotonic Dystrophy Type 1 ». *Neuromuscular Disorders* 21(2):81-88. doi: 10.1016/j.nmd.2010.11.012.
- Perfetti, Alessandra, Simona Greco, Enrico Bugiardini, Rosanna Cardani, Paola Gaia, Carlo Gaetano, Giovanni Meola, et Fabio Martelli. 2014. « Plasma MicroRNAs as Biomarkers for Myotonic Dystrophy Type 1 ». *Neuromuscular Disorders* 24(6):509-15. doi: 10.1016/j.nmd.2014.02.005.

- Pettersson, Olof Joakim, Lars Aagaard, Thomas Gryesten Jensen, et Christian Kroun Damgaard. 2015. « Molecular Mechanisms in DM1 — a Focus on Foci ». *Nucleic Acids Research* 43(4):2433-41. doi: 10.1093/nar/gkv029.
- Philips, Anne V., Lubov T. Timchenko, et Thomas A. Cooper. 1998. « Disruption of Splicing Regulated by a CUG-Binding Protein in Myotonic Dystrophy ». *Science* 280(5364):737-41. doi: 10.1126/science.280.5364.737.
- Phylactou, Leonidas A., Charlotte Darrah, et Matthew J. A. Wood. 1998. « Ribozyme-Mediated Trans-Splicing of a Trinucleotide Repeat ». *Nature Genetics* 18(4):378-81. doi: 10.1038/ng0498-378.
- Picchio, Lucie, Emilie Plantie, Yoan Renaud, Preethi Poovthumkadavil, et Krzysztof Jagla. 2013. « Novel Drosophila Model of Myotonic Dystrophy Type 1: Phenotypic Characterization and Genome-Wide View of Altered Gene Expression ». *Human Molecular Genetics* 22(14):2795-2810. doi: 10.1093/hmg/ddt127.
- Pinto, Belinda S., Tanvi Saxena, Ruan Oliveira, Héctor R. Méndez-Gómez, John D. Cleary, Lance T. Denes, Ona McConnell, Juan Arboleda, Guangbin Xia, Maurice S. Swanson, et Eric T. Wang. 2017. « Impeding Transcription of Expanded Microsatellite Repeats by Deactivated Cas9 ». *Molecular Cell* 68(3):479-490.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2017.09.033.
- Poulos, Michael G., Ranjan Batra, Moyi Li, Yuan Yuan, Chaolin Zhang, Robert B. Darnell, et Maurice S. Swanson. 2013. « Progressive Impairment of Muscle Regeneration in Muscleblind-like 3 Isoform Knockout Mice ». *Human Molecular Genetics* 22(17):3547-58. doi: 10.1093/hmg/ddt209.
- Provenzano, Claudia, Marisa Cappella, Rea Valaperta, Rosanna Cardani, Giovanni Meola, Fabio Martelli, Beatrice Cardinali, et Germana Falcone. 2017. « CRISPR/Cas9-Mediated Deletion of CTG Expansions Recovers Normal Phenotype in Myogenic Cells Derived from Myotonic Dystrophy 1 Patients ». *Molecular Therapy* 12.
- Purcell, Jamie, Julia C. Oddo, Eric T. Wang, et J. Andrew Berglund. 2012. « Combinatorial Mutagenesis of MBNL1 Zinc Fingers Elucidates Distinct Classes of Regulatory Events ». *Molecular and Cellular Biology* 32(20):4155-67. doi: 10.1128/MCB.00274-12.
- Qawasmi, Lena, Maya Braun, Irene Guberman, Emiliano Cohen, Lamis Naddaf, Anna Mellul, Olli Matilainen, Noa Roitenberg, Danielle Share, Doron Stupp, Haya Chahine, Ehud Cohen, Susana M. D. A. Garcia, et Yuval Tabach. 2019. « Expanded CUG Repeats Trigger Disease Phenotype and Expression Changes through the RNAi Machinery in *C. Elegans* ». *Journal of Molecular Biology* 431(9):1711-28. doi: 10.1016/j.jmb.2019.03.003.
- Raaijmakers, Renée H. L., Lise Ripken, C. Rosanne M. Ausems, et Derick G. Wansink. 2019. « CRISPR/Cas Applications in Myotonic Dystrophy: Expanding Opportunities ». *International Journal of Molecular Sciences* 20(15):3689. doi: 10.3390/ijms20153689.

- Ranum, Laura P. W., Paul F. Rasmussen, Kellie A. Benzow, Michael D. Koob, et John W. Day. 1998. « Genetic Mapping of a Second Myotonic Dystrophy Locus ». *Nature Genetics* 19(2):196-98. doi: 10.1038/570.
- Rau, Frédérique, Fernande Freyermuth, Charlotte Fugier, Jean-Philippe Villemin, Marie-Christine Fischer, Bernard Jost, Doulaye Dembele, Geneviève Gourdon, Annie Nicole, Denis Duboc, Karim Wahbi, John W. Day, Harutoshi Fujimura, Masanori P. Takahashi, Didier Auboeuf, Natacha Dreumont, Denis Furling, et Nicolas Charlet-Berguerand. 2011. « Misregulation of MiR-1 Processing Is Associated with Heart Defects in Myotonic Dystrophy ». *Nature Structural & Molecular Biology* 18(7):840-45. doi: 10.1038/nsmb.2067.
- Rau, Frédérique, Jeanne Lainé, Laetitia Ramanoudjame, Arnaud Ferry, Ludovic Arandel, Olivier Delalande, Arnaud Jollet, Florent Dingli, Kuang-Yung Lee, Cécile Peccate, Stéphanie Lorain, Edor Kabashi, Takis Athanasopoulos, Taeyoung Koo, Damarys Loew, Maurice S. Swanson, Elisabeth Le Rumeur, George Dickson, Valérie Allamand, Joëlle Marie, et Denis Furling. 2015. « Abnormal Splicing Switch of DMD's Penultimate Exon Compromises Muscle Fibre Maintenance in Myotonic Dystrophy ». *Nature Communications* 6(1):7205. doi: 10.1038/ncomms8205.
- Ravel-Chapuis, Aymeric, Ali Al-Rewashdy, Guy Bélanger, et Bernard J. Jasmin. 2018. « Pharmacological and Physiological Activation of AMPK Improves the Spliceopathy in DM1 Mouse Muscles ». *Human Molecular Genetics* 27(19):3361-76. doi: 10.1093/hmg/ddy245.
- Ravel-Chapuis, Aymeric, Guy Bélanger, Ramesh S. Yadava, Mani S. Mahadevan, Luc DesGroseillers, Jocelyn Côté, et Bernard J. Jasmin. 2012. « The RNA-Binding Protein Staufen1 Is Increased in DM1 Skeletal Muscle and Promotes Alternative Pre-mRNA Splicing ». *Journal of Cell Biology* 196(6):699-712. doi: 10.1083/jcb.201108113.
- Reardon, W., R. Newcombe, I. Fenton, J. Sibert, et P. S. Harper. 1993. « The Natural History of Congenital Myotonic Dystrophy: Mortality and Long Term Clinical Aspects. » *Archives of Disease in Childhood* 68(2):177-81. doi: 10.1136/adc.68.2.177.
- Reddy, Kaalak, Jana R. Jenquin, John D. Cleary, et J. Andrew Berglund. 2019. « Mitigating RNA Toxicity in Myotonic Dystrophy Using Small Molecules ». *Int. J. Mol. Sci.* 20.
- Reddy, Sita, Daniel B. J. Smith, Mark M. Rich, John M. Leferovich, Patricia Reilly, Brigid M. Davis, Khoa Tran, Helen Rayburn, Roderick Bronson, Didier Cros, Rita J. Balice-Gordon, et David Housman. 1996a. « Mice Lacking the Myotonic Dystrophy Protein Kinase Develop a Late Onset Progressive Myopathy ». *Nature Genetics* 13(3):325-35. doi: 10.1038/ng0796-325.
- Reddy, Sita, Daniel B. J. Smith, Mark M. Rich, John M. Leferovich, Patricia Reilly, Brigid M. Davis, Khoa Tran, Helen Rayburn, Roderick Bronson, Didier Cros, Rita J. Balice-Gordon, et David Housman. 1996b. « Mice Lacking the Myotonic Dystrophy Protein Kinase Develop a Late Onset Progressive Myopathy ». *Nature Genetics* 13(3):325-35. doi: 10.1038/ng0796-325.

- Rehman, Shagufta, Jordan T. Gladman, Ammasi Periasamy, Yuansheng Sun, et Mani S. Mahadevan. 2014. « Development of an AP-FRET Based Analysis for Characterizing RNA-Protein Interactions in Myotonic Dystrophy (DM1) » édité par R. Artero. *PLoS ONE* 9(4):e95957. doi: 10.1371/journal.pone.0095957.
- Renault, V., G. Piron-Hamelin, C. Forestier, S. DiDonna, S. Decary, F. Hentati, G. Saillant, G. S. Butler-Browne, et V. Mouly. 2000. « Skeletal Muscle Regeneration and the Mitotic Clock ». *Experimental Gerontology* 35(6-7):711-19. doi: 10.1016/S0531-5565(00)00151-0.
- Richard, Guy-Franck, David Viterbo, Varun Khanna, Valentine Mosbach, Lauriane Castelain, et Bernard Dujon. 2014. « Highly Specific Contractions of a Single CAG/CTG Trinucleotide Repeat by TALEN in Yeast » édité par T. Ashizawa. *PLoS ONE* 9(4):e95611. doi: 10.1371/journal.pone.0095611.
- Ricker, Kenneth. 1999. « Myotonic Dystrophy and Proximal Myotonic Myopathy ». *Journal of Neurology* 246(5):334-38. doi: 10.1007/s004150050359.
- Rinaldi, Carlo, et Matthew J. A. Wood. 2018. « Antisense Oligonucleotides: The next Frontier for Treatment of Neurological Disorders ». *Nature Reviews Neurology* 14(1):9-21. doi: 10.1038/nrneurol.2017.148.
- Roberts, Thomas C., Robert Langer, et Matthew J. A. Wood. 2020. « Advances in Oligonucleotide Drug Delivery ». *Nature Reviews Drug Discovery* 19(10):673-94. doi: 10.1038/s41573-020-0075-7.
- Rogalska, Zuzanna, et Krzysztof Sobczak. 2022. « Sustainable Recovery of MBNL Activity in Autoregulatory Feedback Loop in Myotonic Dystrophy ». *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 30:438-48. doi: 10.1016/j.omtn.2022.10.023.
- Rudnicki, Dobrila D., Susan E. Holmes, Mark W. Lin, Charles A. Thornton, Christopher A. Ross, et Russell L. Margolis. 2007. « Huntington's Disease-like 2 Is Associated with CUG Repeat-Containing RNA Foci ». *Annals of Neurology* 61(3):272-82. doi: 10.1002/ana.21081.
- Sabater-Arcis, Maria, Ariadna Bargiela, Denis Furling, et Ruben Artero. 2020. « MiR-7 Restores Phenotypes in Myotonic Dystrophy Muscle Cells by Repressing Hyperactivated Autophagy ». *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 19:278-92. doi: 10.1016/j.omtn.2019.11.012.
- Salisbury, Elizabeth, Benedikt Schoser, Christiane Schneider-Gold, Guo-Li Wang, Claudia Huichalaf, Bingwen Jin, Mario Sirtito, Partha Sarkar, Ralf Krahe, Nikolai A. Timchenko, et Lubov T. Timchenko. 2009. « Expression of RNA CCUG Repeats Dysregulates Translation and Degradation of Proteins in Myotonic Dystrophy 2 Patients ». *The American Journal of Pathology* 175(2):748-62. doi: 10.2353/ajpath.2009.090047.
- Sarkar, Partha S., Binoy Appukuttan, Jennifer Han, Yoshihiro Ito, Cuiwei Ai, Wenli Tsai, Yang Chai, J. Timothy Stout, et Sita Reddy. 2000. « Heterozygous Loss of Six5 in Mice Is Sufficient to Cause Ocular Cataracts ». *Nature Genetics* 25(1):110-14. doi: 10.1038/75500.

- Savkur, Rajesh S., Anne V. Philips, et Thomas A. Cooper. 2001. « Aberrant Regulation of Insulin Receptor Alternative Splicing Is Associated with Insulin Resistance in Myotonic Dystrophy ». *Nature Genetics* 29(1):40-47. doi: 10.1038/ng704.
- Sellier, Chantal, Estefanía Cerro-Herreros, Markus Blatter, Fernande Freyermuth, Angeline Gaucherot, Frank Ruffenach, Partha Sarkar, Jack Puymirat, Bjarne Udd, John W. Day, Giovanni Meola, Guillaume Bassez, Harutoshi Fujimura, Masanori P. Takahashi, Benedikt Schoser, Denis Furling, Ruben Artero, Frédéric H. T. Allain, Beatriz Llamusi, et Nicolas Charlet-Berguerand. 2018. « RbFOX1/MBNL1 Competition for CCUG RNA Repeats Binding Contributes to Myotonic Dystrophy Type 1/Type 2 Differences ». *Nature Communications* 9(1):2009. doi: 10.1038/s41467-018-04370-x.
- Seznec, H., Agbulut, Sergeant, Savouret, Ghestem, Tabti, Willer, et Ourth. 2001. « Mice Transgenic for the Human Myotonic Dystrophy Region with Expanded CTG Repeats Display Muscular and Brain Abnormalities ». *Human Molecular Genetics* 10(23):2717-26. doi: 10.1093/hmg/10.23.2717.
- Shiomi, K., T. Kiyono, K. Okamura, M. Uezumi, Y. Goto, S. Yasumoto, S. Shimizu, et N. Hashimoto. 2011. « CDK4 and Cyclin D1 Allow Human Myogenic Cells to Recapture Growth Property without Compromising Differentiation Potential ». *Gene Therapy* 18(9):857-66. doi: 10.1038/gt.2011.44.
- Siboni, Ruth B., Micah J. Bodner, Muhammad M. Khalifa, Aaron G. Docter, Jessica Y. Choi, Masayuki Nakamori, Michael M. Haley, et J. Andrew Berglund. 2015. « Biological Efficacy and Toxicity of Diamidines in Myotonic Dystrophy Type 1 Models ». *Journal of Medicinal Chemistry* 58(15):5770-80. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00356.
- Siboni, Ruth B., Masayuki Nakamori, Stacey D. Wagner, Adam J. Struck, Leslie A. Coonrod, Shanee A. Harriott, Daniel M. Cass, Matthew K. Tanner, et J. Andrew Berglund. 2015. « Actinomycin D Specifically Reduces Expanded CUG Repeat RNA in Myotonic Dystrophy Models ». *Cell Reports* 13(11):2386-94. doi: 10.1016/j.celrep.2015.11.028.
- Smith, Kelly P., Meg Byron, Carol Johnson, Yigong Xing, et Jeanne B. Lawrence. 2007. « Defining Early Steps in mRNA Transport: Mutant mRNA in Myotonic Dystrophy Type I Is Blocked at Entry into SC-35 Domains ». *Journal of Cell Biology* 178(6):951-64. doi: 10.1083/jcb.200706048.
- Sobczak, K., Michlewski, Krol, et Krzyzosiak. 2003. « RNA Structure of Trinucleotide Repeats Associated with Human Neurological Diseases ». *Nucleic Acids Research* 31(19):5469-82. doi: 10.1093/nar/gkg766.
- Sobczak, Krzysztof, Thurman M. Wheeler, Wenli Wang, et Charles A. Thornton. 2013. « RNA Interference Targeting CUG Repeats in a Mouse Model of Myotonic Dystrophy ». *Molecular Therapy* 21(2):380-87. doi: 10.1038/mt.2012.222.
- Sta Maria, Naomi S., Chenyu Zhou, Se Jung Lee, Parvin Valiulahi, Xiandu Li, Jongkyu Choi, Xiaodan Liu, Russell Jacobs, Lucio Comai, et Sita Reddy. 2021. « Mbnl1 and Mbnl2 Regulate Brain Structural Integrity in Mice ». *Communications Biology* 4(1):1342. doi: 10.1038/s42003-021-02845-0.

- Suenaga, Koichi, Kuang-Yung Lee, Masayuki Nakamori, Yoshiki Tatsumi, Masanori P. Takahashi, Harutoshi Fujimura, Kenji Jinnai, Hiroo Yoshikawa, Hongqing Du, Manuel Ares, Maurice S. Swanson, et Takashi Kimura. 2012. « Muscleblind-Like 1 Knockout Mice Reveal Novel Splicing Defects in the Myotonic Dystrophy Brain » édité par T. H. Gillingwater. *PLoS ONE* 7(3):e33218. doi: 10.1371/journal.pone.0033218.
- Suominen, Tiina, Linda L. Bachinski, Satu Auvinen, Peter Hackman, Keith A. Baggerly, Corrado Angelini, Leena Peltonen, Ralf Krahe, et Bjarne Udd. 2011. « Population Frequency of Myotonic Dystrophy: Higher than Expected Frequency of Myotonic Dystrophy Type 2 (DM2) Mutation in Finland ». *European Journal of Human Genetics* 19(7):776-82. doi: 10.1038/ejhg.2011.23.
- Sznajder, Łukasz J., Michał Michalak, Katarzyna Taylor, Piotr Cywoniuk, Michał Kabza, Agnieszka Wojtkowiak-Szlachcic, Magdalena Matłoka, Patryk Konieczny, et Krzysztof Sobczak. 2016. « Mechanistic Determinants of MBNL Activity ». *Nucleic Acids Research* gkw915. doi: 10.1093/nar/gkw915.
- Sznajder, Łukasz J., et Maurice S. Swanson. 2019. « Short Tandem Repeat Expansions and RNA-Mediated Pathogenesis in Myotonic Dystrophy ». *International Journal of Molecular Sciences* 20(13):3365. doi: 10.3390/ijms20133365.
- Tabaglio, Tommaso, Diana HP Low, Winnie Koon Lay Teo, Pierre Alexis Goy, Piotr Cywoniuk, Heike Wollmann, Jessica Ho, Damien Tan, Joey Aw, Andrea Pavesi, Krzysztof Sobczak, Dave Keng Boon Wee, et Ernesto Guccione. 2018. « MBNL1 Alternative Splicing Isoforms Play Opposing Roles in Cancer ». *Life Science Alliance* 1(5):e201800157. doi: 10.26508/lsa.201800157.
- Takahashi, Kazutoshi, Koji Tanabe, Mari Ohnuki, Megumi Narita, Tomoko Ichisaka, Kiichiro Tomoda, et Shinya Yamanaka. 2007. « Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors ». *Cell* 131(5):861-72. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019.
- Taliaferro, J. Matthew, Marina Vidaki, Ruan Oliveira, Sara Olson, Lijun Zhan, Tanvi Saxena, Eric T. Wang, Brenton R. Graveley, Frank B. Gertler, Maurice S. Swanson, et Christopher B. Burge. 2016. « Distal Alternative Last Exons Localize MRNAs to Neural Projections ». *Molecular Cell* 61(6):821-33. doi: 10.1016/j.molcel.2016.01.020.
- Taneja, K. L., M. McCurrach, M. Schalling, D. Housman, et R. H. Singer. 1995. « Foci of Trinucleotide Repeat Transcripts in Nuclei of Myotonic Dystrophy Cells and Tissues. » *Journal of Cell Biology* 128(6):995-1002. doi: 10.1083/jcb.128.6.995.
- Tanner, Matthew K., Zhenzhi Tang, et Charles A. Thornton. 2021. « Targeted Splice Sequencing Reveals RNA Toxicity and Therapeutic Response in Myotonic Dystrophy ». *Nucleic Acids Research* 49(4):2240-54. doi: 10.1093/nar/gkab022.
- Terenzi, Fulvia, et Andrea N. Ladd. 2010. « Conserved Developmental Alternative Splicing of Muscleblind-like (MBNL) Transcripts Regulates MBNL Localization and Activity ». *RNA Biology* 7(1):43-55. doi: 10.4161/rna.7.1.10401.
- Thomas, James D., Łukasz J. Sznajder, Olgert Bardhi, Faaiq N. Aslam, Zacharias P. Anastasiadis, Marina M. Scotti, Ichizo Nishino, Masayuki Nakamori, Eric T. Wang, et

- Maurice S. Swanson. 2017. « Disrupted Prenatal RNA Processing and Myogenesis in Congenital Myotonic Dystrophy ». *Genes & Development* 31(11):1122-33. doi: 10.1101/gad.300590.117.
- Thomson, James A., Joseph Itskovitz-Eldor, Sander S. Shapiro, Michelle A. Waknitz, Jennifer J. Swiergiel, Vivienne S. Marshall, et Jeffrey M. Jones. 1998. « Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts ». *Science* 282(5391):1145-47. doi: 10.1126/science.282.5391.1145.
- Thornell, L. E., M. Lindström, V. Renault, A. Klein, V. Mouly, T. Ansved, G. Butler-Browne, et D. Furling. 2009. « Satellite Cell Dysfunction Contributes to the Progressive Muscle Atrophy in Myotonic Dystrophy Type 1 ». *Neuropathology and Applied Neurobiology* 35(6):603-13. doi: 10.1111/j.1365-2990.2009.01014.x.
- Thornton, Charles A., Keith Johnson, et Richard T. Moxley. 1994. « Myotonic Dystrophy Patients Have Larger CTG Expansions in Skeletal Muscle than in Leukocytes ». *Annals of Neurology* 35(1):104-7. doi: 10.1002/ana.410350116.
- Thornton, Charles A., James P. Wymer, Zachary Simmons, Carolyn McClain, et Richard T. Moxley. 1997. « Expansion of the Myotonic Dystrophy CTG Repeat Reduces Expression of the Flanking DMAHP Gene ». *Nature Genetics* 16(4):407-9. doi: 10.1038/ng0897-407.
- Tian, Bin, et James L. Manley. 2017. « Alternative Polyadenylation of mRNA Precursors ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18(1):18-30. doi: 10.1038/nrm.2016.116.
- Timchenko, L. T., N. A. Timchenko, C. T. Caskey, et R. Roberts. 1996. « Novel Proteins with Binding Specificity for DNA CTG Repeats and RNA CUG Repeats: Implications for Myotonic Dystrophy ». *Human Molecular Genetics* 5(1):115-21. doi: 10.1093/hmg/5.1.115.
- Timchenko, Nikolai A., Zong-Jin Cai, Alana L. Welm, Sita Reddy, Tetsuo Ashizawa, et Lubov T. Timchenko. 2001. « RNA CUG Repeats Sequester CUGBP1 and Alter Protein Levels and Activity of CUGBP1 ». *Journal of Biological Chemistry* 276(11):7820-26. doi: 10.1074/jbc.M005960200.
- Todd, Peter K., Feras Y. Ackall, Junguk Hur, Kush Sharma, Henry L. Paulson, et James J. Dowling. 2014. « Transcriptional changes and developmental abnormalities in a zebrafish model of myotonic dystrophy type 1 ». *Disease Models & Mechanisms* 7(1):143-55. doi: 10.1242/dmm.012427.
- Todorow, Vanessa, Stefan Hintze, Alastair R. W. Kerr, Andreas Hehr, Benedikt Schoser, et Peter Meinke. 2021. « Transcriptome Analysis in a Primary Human Muscle Cell Differentiation Model for Myotonic Dystrophy Type 1 ». *International Journal of Molecular Sciences* 22(16):8607. doi: 10.3390/ijms22168607.
- Tomé, Stéphanie, Elodie Dandelot, Céline Dogan, Alexis Bertrand, David Geneviève, Yann Péréon, DM contraction study group, Marie Simon, Jean-Paul Bonnefont, Guillaume Bassez, et Geneviève Gourdon. 2018. « Unusual Association of a Unique CAG Interruption in 5' of DM1 CTG Repeats with Intergenerational Contractions and Low Somatic Mosaicism ». *Human Mutation* 39(7):970-82. doi: 10.1002/humu.23531.

- Tomé, Stéphanie, Ian Holt, Winfried Edelmann, Glenn E. Morris, Arnold Munnich, Christopher E. Pearson, et Geneviève Gourdon. 2009. « MSH2 ATPase Domain Mutation Affects CTG•CAG Repeat Instability in Transgenic Mice » édité par H. Orr. *PLoS Genetics* 5(5):e1000482. doi: 10.1371/journal.pgen.1000482.
- Tomé, Stéphanie, Kevin Manley, Jodie P. Simard, Greg W. Clark, Meghan M. Slean, Meera Swami, Peggy F. Shelbourne, Elisabeth R. M. Tillier, Darren G. Monckton, Anne Messer, et Christopher E. Pearson. 2013. « MSH3 Polymorphisms and Protein Levels Affect CAG Repeat Instability in Huntington's Disease Mice » édité par G. S. Barsh. *PLoS Genetics* 9(2):e1003280. doi: 10.1371/journal.pgen.1003280.
- Tran, Hélène, Nathalie Gourrier, Camille Lemercier-Neuillet, Claire-Marie Dhaenens, Audrey Vautrin, Francisco José Fernandez-Gomez, Ludovic Arandel, Céline Carpentier, Hélène Obriot, Sabiha Eddarkaoui, Lucie Delattre, Edwige Van Brussels, Ian Holt, Glenn E. Morris, Bernard Sablonnière, Luc Buée, Nicolas Charlet-Berguerand, Susanna Schraen-Maschke, Denis Furling, Isabelle Behm-Ansmant, Christiane Branlant, Marie-Laure Caillet-Boudin, et Nicolas Sergeant. 2011. « Analysis of Exonic Regions Involved in Nuclear Localization, Splicing Activity, and Dimerization of Muscleblind-like-1 Isoforms ». *Journal of Biological Chemistry* 286(18):16435-46. doi: 10.1074/jbc.M110.194928.
- Turner, Chris, et David Hilton-Jones. 2014. « Myotonic Dystrophy: Diagnosis, Management and New Therapies ». *Current Opinion in Neurology* 27(5):599-606. doi: 10.1097/WCO.0000000000000128.
- Udd, Bjarne, et Ralf Krahe. 2012. « The Myotonic Dystrophies: Molecular, Clinical, and Therapeutic Challenges ». *The Lancet Neurology* 11(10):891-905. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70204-1.
- Vignaud, Alban, Arnaud Ferry, Aline Huguet, Martin Baraibar, Capucine Trollet, Janek Hyzewicz, Gillian Butler-Browne, Jack Puymirat, Genevieve Gourdon, et Denis Furling. 2010. « Progressive Skeletal Muscle Weakness in Transgenic Mice Expressing CTG Expansions Is Associated with the Activation of the Ubiquitin-Proteasome Pathway ». *Neuromuscular Disorders* 20(5):319-25. doi: 10.1016/j.nmd.2010.03.006.
- Viterbo, David, Grégoire Michoud, Valentine Mosbach, Bernard Dujon, et Guy-Franck Richard. 2016. « Replication Stalling and Heteroduplex Formation within CAG/CTG Trinucleotide Repeats by Mismatch Repair ». *DNA Repair* 42:94-106. doi: 10.1016/j.dnarep.2016.03.002.
- Voellenkle, Perfetti, Carrara, Fuschi, Renna, Longo, Sain, Cardani, Valaperta, Silvestri, Legnini, Bozzoni, Furling, Gaetano, Falcone, Meola, et Martelli. 2019. « Dysregulation of Circular RNAs in Myotonic Dystrophy Type 1 ». *International Journal of Molecular Sciences* 20(8):1938. doi: 10.3390/ijms20081938.
- Wagner, Stacey D., Adam J. Struck, Riti Gupta, Dylan R. Farnsworth, Amy E. Mahady, Katy Eichinger, Charles A. Thornton, Eric T. Wang, et J. Andrew Berglund. 2016. « Dose-Dependent Regulation of Alternative Splicing by MBNL Proteins Reveals Biomarkers for Myotonic Dystrophy » édité par G. A. Cox. *PLOS Genetics* 12(9):e1006316. doi: 10.1371/journal.pgen.1006316.

- Wahbi, Karim, Vincent Algalarrondo, Henri Marc Bécane, Véronique Fressart, Chérif Beldjord, Kamel Azibi, Arnaud Lazarus, Nawal Berber, Hélène Radvanyi-Hoffman, Tanya Stojkovic, Anthony Béhin, Pascal Laforêt, Bruno Eymard, Stéphane Hatem, et Denis Duboc. 2013. « Brugada Syndrome and Abnormal Splicing of SCN5A in Myotonic Dystrophy Type 1 ». *Archives of Cardiovascular Diseases* 106(12):635-43. doi: 10.1016/j.acvd.2013.08.003.
- Wang, Eric T., Neal A. L. Cody, Sonali Jog, Michela Biancolella, Thomas T. Wang, Daniel J. Treacy, Shujun Luo, Gary P. Schroth, David E. Housman, Sita Reddy, Eric Lécuyer, et Christopher B. Burge. 2012a. « Transcriptome-Wide Regulation of Pre-mRNA Splicing and mRNA Localization by Muscleblind Proteins ». *Cell* 150(4):710-24. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.041.
- Wang, Eric T., Neal A. L. Cody, Sonali Jog, Michela Biancolella, Thomas T. Wang, Daniel J. Treacy, Shujun Luo, Gary P. Schroth, David E. Housman, Sita Reddy, Eric Lécuyer, et Christopher B. Burge. 2012b. « Transcriptome-Wide Regulation of Pre-mRNA Splicing and mRNA Localization by Muscleblind Proteins ». *Cell* 150(4):710-24. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.041.
- Wang, Eric T., Amanda J. Ward, Jennifer M. Cherone, Jimena Giudice, Thomas T. Wang, Daniel J. Treacy, Nicole J. Lambert, Peter Freese, Tanvi Saxena, Thomas A. Cooper, et Christopher B. Burge. 2015. « Antagonistic Regulation of mRNA Expression and Splicing by CELF and MBNL Proteins ». *Genome Research* 25(6):858-71. doi: 10.1101/gr.184390.114.
- Wang, Guey-Shin, Muge N. Kuyumcu-Martinez, Satyam Sarma, Nitin Mathur, Xander H. T. Wehrens, et Thomas A. Cooper. 2009. « PKC Inhibition Ameliorates the Cardiac Phenotype in a Mouse Model of Myotonic Dystrophy Type 1 ». *Journal of Clinical Investigation* 119(12):3797-3806. doi: 10.1172/JCI37976.
- Wang, Li-Chun, Kuan-Yu Chen, Huichin Pan, Chia-Chieh Wu, Po-Hsuan Chen, Yuan-Ting Liao, Chin Li, Min-Lang Huang, et Kuang-Ming Hsiao. 2011. « Muscleblind Participates in RNA Toxicity of Expanded CAG and CUG Repeats in *Caenorhabditis Elegans* ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 68(7):1255-67. doi: 10.1007/s00018-010-0522-4.
- Wang, Mei, Wen-Chin Weng, Lauren Stock, Diana Lindquist, Ana Martinez, Genevieve Gourdon, Nikolai Timchenko, Mike Snape, et Lubov Timchenko. 2019. « Correction of Glycogen Synthase Kinase 3 β in Myotonic Dystrophy 1 Reduces the Mutant RNA and Improves Postnatal Survival of DMSXL Mice ». *Molecular and Cellular Biology* 39(21):e00155-19. doi: 10.1128/MCB.00155-19.
- Wang, Pei-Ying, Kuei-Ting Chang, Yu-Mei Lin, Ting-Yu Kuo, et Guey-Shin Wang. 2018. « Ubiquitination of MBNL1 Is Required for Its Cytoplasmic Localization and Function in Promoting Neurite Outgrowth ». *Cell Reports* 22(9):2294-2306. doi: 10.1016/j.celrep.2018.02.025.
- Wang, Yanlin, Lei Hao, Hongcai Wang, Katherine Santostefano, Arjun Thapa, John Cleary, Hui Li, Xiuming Guo, Naohiro Terada, Tetsuo Ashizawa, et Guangbin Xia. 2018. « Therapeutic Genome Editing for Myotonic Dystrophy Type 1 Using CRISPR/Cas9 ». *Molecular Therapy* 26(11):2617-30. doi: 10.1016/j.ymthe.2018.09.003.

- Wansink, D. G., et B. Wieringa. 2003. « Transgenic Mouse Models for Myotonic Dystrophy Type 1 (DM1) ». *Cytogenetic and Genome Research* 100(1-4):230-42. doi: 10.1159/000072859.
- Ward, Amanda J., Mendell Rimer, James M. Killian, James J. Dowling, et Thomas A. Cooper. 2010. « CUGBP1 Overexpression in Mouse Skeletal Muscle Reproduces Features of Myotonic Dystrophy Type 1 ». *Human Molecular Genetics* 19(18):3614-22. doi: 10.1093/hmg/ddq277.
- Warf, M. Bryan, et J. Andrew Berglund. 2007. « MBNL Binds Similar RNA Structures in the CUG Repeats of Myotonic Dystrophy and Its Pre-mRNA Substrate Cardiac Troponin T ». *RNA* 13(12):2238-51. doi: 10.1261/rna.610607.
- Warf, M. Bryan, Masayuki Nakamori, Catherine M. Matthys, Charles A. Thornton, et J. Andrew Berglund. 2009. « Pentamidine Reverses the Splicing Defects Associated with Myotonic Dystrophy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(44):18551-56. doi: 10.1073/pnas.0903234106.
- Wenninger, Stephan, Federica Montagnese, et Benedikt Schoser. 2018. « Core Clinical Phenotypes in Myotonic Dystrophies ». *Frontiers in Neurology* 9:303. doi: 10.3389/fneur.2018.00303.
- Westerlaken, Jolanda H. A. M., Catharina E. E. M. Van der Zee, Wilma Peters, et Bé Wieringa. 2003. « The DMWD Protein from the Myotonic Dystrophy (DM1) Gene Region Is Developmentally Regulated and Is Present Most Prominently in Synapse-Dense Brain Areas ». *Brain Research* 971(1):116-27. doi: 10.1016/S0006-8993(03)02430-2.
- Wheeler, Thurman M., Andrew J. Leger, Sanjay K. Pandey, A. Robert MacLeod, Masayuki Nakamori, Seng H. Cheng, Bruce M. Wentworth, C. Frank Bennett, et Charles A. Thornton. 2012. « Targeting Nuclear RNA for in Vivo Correction of Myotonic Dystrophy ». *Nature* 488(7409):111-15. doi: 10.1038/nature11362.
- Wheeler, Thurman M., John D. Lueck, Maurice S. Swanson, Robert T. Dirksen, et Charles A. Thornton. 2007. « Correction of CIC-1 Splicing Eliminates Chloride Channelopathy and Myotonia in Mouse Models of Myotonic Dystrophy ». *The Journal of Clinical Investigation* 117(12):3952-57. doi: 10.1172/JCI33355.
- Wheeler, Thurman M., Krzysztof Sobczak, John D. Lueck, Robert J. Osborne, Xiaoyan Lin, Robert T. Dirksen, et Charles A. Thornton. 2009. « Reversal of RNA Dominance by Displacement of Protein Sequestered on Triplet Repeat RNA ». *Science* 325(5938):336-39. doi: 10.1126/science.1173110.
- White, Eleanor, Margarita Schlackow, Kinga Kamieniarz-Gdula, Nick J. Proudfoot, et Monika Gullerova. 2014. « Human Nuclear Dicer Restricts the Deleterious Accumulation of Endogenous Double-Stranded RNA ». *Nature Structural & Molecular Biology* 21(6):552-59. doi: 10.1038/nsmb.2827.
- Xia, Guangbin, Yuanzheng Gao, Shouguang Jin, S. H. Subramony, Naohiro Terada, Laura P. W. Ranum, Maurice S. Swanson, et Tetsuo Ashizawa. 2015. « Genome Modification Leads to Phenotype Reversal in Human Myotonic Dystrophy Type 1 Induced

- Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Stem Cells ». *Stem Cells* 33(6):1829-38. doi: 10.1002/stem.1970.
- Yadava, Ramesh S., Carla D. Frenzel-McCardell, Qing Yu, Varadamurthy Srinivasan, Amy L. Tucker, Jack Puymirat, Charles A. Thornton, Owen W. Prall, Richard P. Harvey, et Mani S. Mahadevan. 2008. « RNA Toxicity in Myotonic Muscular Dystrophy Induces NKX2-5 Expression ». *Nature Genetics* 40(1):61-68. doi: 10.1038/ng.2007.28.
- Yadava, Ramesh S., Yun K. Kim, Mahua Mandal, Karunasai Mahadevan, Jordan T. Gladman, Qing Yu, et Mani S. Mahadevan. 2019. « MBNL1 overexpression is not sufficient to rescue the phenotypes in a mouse model of RNA toxicity ». *Human Molecular Genetics* 28(14):2330-38. doi: 10.1093/hmg/ddz065.
- Yadava, Ramesh S., Qing Yu, Mahua Mandal, Frank Rigo, C. Frank Bennett, et Mani S. Mahadevan. 2020. « Systemic Therapy in an RNA Toxicity Mouse Model with an Antisense Oligonucleotide Therapy Targeting a Non-CUG Sequence within the DMPK 3'UTR RNA ». *Human Molecular Genetics* 29(9):1440-53. doi: 10.1093/hmg/ddaa060.
- Yanovsky-Dagan, Shira, Michal Avitzour, Gheona Altarescu, Paul Renbaum, Talia Eldar-Geva, Oshrat Schonberger, Stella Mitrani-Rosenbaum, Ephrat Levy-Lahad, Ramon Y. Birnbaum, Lior Gepstein, Silvina Epsztejn-Litman, et Rachel Eiges. 2015. « Uncovering the Role of Hypermethylation by CTG Expansion in Myotonic Dystrophy Type 1 Using Mutant Human Embryonic Stem Cells ». *Stem Cell Reports* 5(2):221-31. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.06.003.
- Yanovsky-Dagan, Shira, Ester Bnaya, Manar Abu Diab, Tayma Handal, Fouad Zahdeh, Walther J. A. A. van den Broek, Silvina Epsztejn-Litman, Derick G. Wansink, et Rachel Eiges. 2019. *Deletion of the CTG Expansion in Myotonic Dystrophy Type 1 Reverses DMPK Aberrant Methylation in Human Embryonic Stem Cells but Not Affected Myoblasts*. preprint. Genetics. doi: 10.1101/631457.
- Yin, Qi, Hongye Wang, Na Li, Yifu Ding, Zhenfei Xie, Lifang Jin, Yan Li, Qiong Wang, Xinyi Liu, Liuqing Xu, Qing Li, Yongjian Ma, Yanbo Cheng, Kai Wang, Cuiqing Zhong, Qian Yu, Wei Tang, Wanjin Chen, Wenjun Yang, Fan Zhang, Chen Ding, Lan Bao, Bin Zhou, Ping Hu, et Jinsong Li. 2020. « Dosage Effect of Multiple Genes Accounts for Multisystem Disorder of Myotonic Dystrophy Type 1 ». *Cell Research* 30(2):133-45. doi: 10.1038/s41422-019-0264-2.
- Yoshida, Kosuke, Yoko Aburakawa, Yasuhiro Suzuki, Kenji Kuroda, et Takashi Kimura. 2018. « The Frequency and Risk Factors for Ischemic Stroke in Myotonic Dystrophy Type 1 Patients ». *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* 27(4):914-18. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.10.030.
- Young, Nathan P., Jasper R. Daube, Eric J. Sorenson, et Margherita Milone. 2010. « Absent, Unrecognized, and Minimal Myotonic Discharges in Myotonic Dystrophy Type 2 ». *Muscle & Nerve* 41(6):758-62. doi: 10.1002/mus.21615.
- Yu, Junying, Maxim A. Vodyanik, Kim Smuga-Otto, Jessica Antosiewicz-Bourget, Jennifer L. Frane, Shulan Tian, Jeff Nie, Gudrun A. Jonsdottir, Victor Ruotti, Ron Stewart, Igor I. Slukvin, et James A. Thomson. 2007. « Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived

- from Human Somatic Cells ». *Science* 318(5858):1917-20. doi: 10.1126/science.1151526.
- Yuan, Y., S. A. Compton, K. Sobczak, M. G. Stenberg, C. A. Thornton, J. D. Griffith, et M. S. Swanson. 2007. « Muscleblind-like 1 Interacts with RNA Hairpins in Splicing Target and Pathogenic RNAs ». *Nucleic Acids Research* 35(16):5474-86. doi: 10.1093/nar/gkm601.
- Zhang, Fan, Nicole E. Bodycombe, Keith M. Haskell, Yumei L. Sun, Eric T. Wang, Carl A. Morris, Lyn H. Jones, Lauren D. Wood, et Mathew T. Pletcher. 2017. « A Flow Cytometry-Based Screen Identifies MBNL1 Modulators That Rescue Splicing Defects in Myotonic Dystrophy Type I ». *Human Molecular Genetics* 26(16):3056-68. doi: 10.1093/hmg/ddx190.
- Zhang, Wenjing, Yang Wang, Shuyun Dong, Rajarshi Choudhury, Yongfeng Jin, et Zefeng Wang. 2014. « Treatment of Type 1 Myotonic Dystrophy by Engineering Site-Specific RNA Endonucleases That Target (CUG) n Repeats ». *Molecular Therapy* 22(2):312-20. doi: 10.1038/mt.2013.251.
- Zhou, Ting, Christina Benda, Sarah Dunzinger, Yinghua Huang, Jenny Cy Ho, Jiayin Yang, Yu Wang, Ya Zhang, Qiang Zhuang, Yanhua Li, Xichen Bao, Hung-Fat Tse, Johannes Grillari, Regina Grillari-Voglauer, Duanqing Pei, et Miguel A. Esteban. 2012. « Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells from Urine Samples ». *Nature Protocols* 7(12):2080-89. doi: 10.1038/nprot.2012.115.
- Zhu, Chun-Hong, Vincent Mouly, Racquel N. Cooper, Kamel Mamchaoui, Anne Bigot, Jerry W. Shay, James P. Di Santo, Gillian S. Butler-Browne, et Woodring E. Wright. 2007. « Cellular Senescence in Human Myoblasts Is Overcome by Human Telomerase Reverse Transcriptase and Cyclin-Dependent Kinase 4: Consequences in Aging Muscle and Therapeutic Strategies for Muscular Dystrophies ». *Aging Cell* 6(4):515-23. doi: 10.1111/j.1474-9726.2007.00306.x.
- Zincarelli, Carmela, Stephen Soltys, Giuseppe Rengo, et Joseph E. Rabinowitz. 2008. « Analysis of AAV Serotypes 1–9 Mediated Gene Expression and Tropism in Mice After Systemic Injection ». *Molecular Therapy* 16(6):1073-80. doi: 10.1038/mt.2008.76.
- Zu, Tao, John D. Cleary, Yuanjing Liu, Monica Bañez-Coronel, Jodi L. Bubenik, Fatma Ayhan, Tetsuo Ashizawa, Guangbin Xia, H. Brent Clark, Anthony T. Yachnis, Maurice S. Swanson, et Laura P. W. Ranum. 2017. « RAN Translation Regulated by Muscleblind Proteins in Myotonic Dystrophy Type 2 ». *Neuron* 95(6):1292-1305.e5. doi: 10.1016/j.neuron.2017.08.039.
- Zu, Tao, Brian Gibbens, Noelle S. Doty, Mário Gomes-Pereira, Aline Huguet, Matthew D. Stone, Jamie Margolis, Mark Peterson, Todd W. Markowski, Melissa A. C. Ingram, Zhenhong Nan, Colleen Forster, Walter C. Low, Benedikt Schoser, Nikunj V. Somia, H. Brent Clark, Stephen Schmechel, Peter B. Bitterman, Geneviève Gourdon, Maurice S. Swanson, Melinda Moseley, et Laura P. W. Ranum. 2011. « Non-ATG-Initiated Translation Directed by Microsatellite Expansions ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(1):260-65. doi: 10.1073/pnas.1013343108.

