



HAL
open science

Perte des protéines MBNL dans les motoneurones : impact sur la fonction de l'unité motrice dans la Dystrophie myotonique

Charles Frison-Roche

► **To cite this version:**

Charles Frison-Roche. Perte des protéines MBNL dans les motoneurones : impact sur la fonction de l'unité motrice dans la Dystrophie myotonique. Médecine humaine et pathologie. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT : 2022SORUS305 . tel-04265649v2

HAL Id: tel-04265649

<https://theses.hal.science/tel-04265649v2>

Submitted on 31 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.

Sorbonne Université

ED515 : Complexité du vivant

UMRS974 / *Equipe Repeat expansions & Myotonic Dystrophy*

**Perte des protéines MBNL dans les motoneurones : Impact
sur la fonction de l'unité motrice dans la Dystrophie
myotonique**

Par Charles Frison-Roche

Thèse de doctorat de Biologie

Dirigée par Denis Furling et co-encadrée par Frédérique Rau

Présentée et soutenue publiquement le 30 septembre 2022

Devant un jury composé de :

Dr. Nicolas Sergeant, directeur de recherche, rapporteur

Pr. Claire Legay, professeur émérite, rapporteur

Pr. Onnik Agbulut, professeur, examinateur

Dr. Perrine Castets, assistant professeur, examinateur

Dr. Denis Furling, directeur de recherche, directeur de thèse

Dr. Frédérique Rau, chargé de recherche, co-encadrant de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier les membres du Jury qui ont accepté d'évaluer l'ensemble de mes travaux de thèse. Je remercie le Pr. Claire Legay et le Dr. Nicolas Sergeant et qui ont endossé le rôle de rapporteur. Je remercie également le Pr. Onnik Agbulut et le Dr. Perrine Castets, examinateurs ayant également jugé la qualité de mon travail.

Je remercie la fondation pour la recherche médicale (FRM) pour avoir financé 3 ans de recherche sur ce projet, sans quoi il n'aurait pas pu voir le jour.

Mille mercis au Dr. Denis Furling pour m'avoir accueilli dans cette équipe. Merci pour ta guidance durant les périodes charnières de cette thèse et les longues discussions sur ce sujet qui n'était pas toujours facile. Merci également pour ta bienveillance qui m'a permis de me sentir intégré dans cette équipe.

Merci infiniment au Dr. Frédérique Rau. Je n'aurais pas pu espérer une meilleure encadrante de thèse. Tu m'as scientifiquement guidé tout au long de ce travail et je n'aurai pas pu en apprendre autant sans ta rigueur, ton savoir et ton intelligence. Merci également pour ton implication sans faille dans ce projet, et ce jusqu'à la dernière minute ! Je te remercie enfin d'avoir toujours essayé de me comprendre et de te mettre à ma place ce qui m'a permis de vivre cette thèse avec plus de calme et de sérénité que je ne l'aurais jamais espéré. Notre entente m'a fait donner le meilleur de moi-même et je suis immensément heureux d'avoir travaillé avec toi pendant ces 4 ans.

Je tiens également à remercier tous les membres de mon équipe pour leur conseil et leur participation dans ce projet. Je tiens à remercier particulièrement Ludovic Arandel pour la manipulation des animaux et Xavière Lornage pour ses magnifiques génotypes mais aussi nos discussions qui m'ont énormément apporté. Merci encore à Steve Cottin qui n'aura été dans cette équipe que quelques mois mais a permis au projet d'avancer à pas de géants.

Merci à Julien Messéant et Marius Halliez pour leur aide sur l'étude des JNM. C'était un vrai plaisir d'en apprendre autant sur ce sujet avec des personnes aussi savantes et didactiques. Merci également à Jeanne Lainè pour son étude par MET de la JNM. Je remercie aussi Stéphanie Godard-Bauché pour son expertise de la JNM et de l'ACHE. Merci pour tes conseils ainsi que nos

séances improvisées de vocalise. Merci à Mégane Lemaitre pour la partie électrophysiologie des animaux mais également le CatWalk, mais aussi pour ta compréhension et ton implication.

Merci à tous mes collègues et amis de Babinski avec qui j'ai passé d'excellents moments au cours de ces 4 ans. Je remercie particulièrement Saline, Xavière, Eline, Alexandra et Alexandrine pour leur bonne humeur et leur soutien quotidien, je n'aurais pas pu y arriver sans vous !

Pour finir, merci à toute ma famille et à mes amis d'avoir été présents pour moi durant ces 4 ans. Merci d'avoir pris le temps de m'écouter radoter sur ma thèse. Cela m'a donné la force de continuer et m'a fait réaliser la chance que j'avais.

Sommaire

Remerciements.....	1
Sommaire.....	3
Introduction.....	7
1 Dystrophia myotonica.....	7
1.1 Dystrophie myotonique de type 1	8
1.1.1 Anticipation dans la DM1.....	9
1.1.2 Mosaïcisme somatique dans la DM1.....	10
1.1.3 Interruptions inter-répétitions dans la DM1.....	11
1.2 Dystrophie myotonique de type 2	11
1.3 Phénotype clinique des formes adultes des DM.....	12
1.3.1 Symptômes musculaires dans la DM	13
1.3.1.1 Myotonie.....	14
1.3.1.2 Faiblesse musculaire et atrophie.....	14
1.3.1.3 Atteinte cardiaque dans la DM.....	17
1.3.2 L'atteinte du système nerveux central dans la DM.....	17
1.3.3 Symptômes génito-urinaires et gastro-intestinaux dans la DM	18
1.3.4 Autres symptômes des patients DM.....	19
1.4 Physiopathologie de la DM1.....	19
1.4.1 L'haploinsuffisance des gènes <i>DMPK</i> , <i>SIX5</i> et <i>DMWD</i>	20
1.4.2 Le gain de fonction toxique de l'ARN muté.....	21
1.4.3 Mécanisme pathologique impliquant des protéines de liaison à l'ARN.....	23
1.4.3.1 Séquestration de MBNL.....	23
1.4.3.2 Hyperactivation de CELF.....	25
1.4.3.3 Autres protéines dérégulées.....	26
1.5 Mécanismes physiopathologiques dans la DM.....	27
1.5.1 Dérégulation de l'épissage alternatif dans la DM	28
1.5.2 Autres mécanismes physiopathologiques de la DM	30
1.5.2.1 Dérégulation des facteurs de transcription.....	30
1.5.2.2 Traduction, localisation et stabilité des ARNm.....	30
1.5.2.3 Dérégulation des miARN	31
1.5.2.4 ARN interférence.....	32

1.5.2.5	L'expression d'un ARN antisens	32
1.5.2.6	Traduction sans ATG.....	33
1.6	Modèles de la DM.....	33
1.6.1	Modèle DMSXL : expression d'un grand nombre de répétitions CTG dans le gène <i>DMPK</i> humain.....	34
1.6.2	Modèles de souris invalidées pour Mbnl.....	35
1.6.2.1	Perte de Mbnl1 de manière ubiquitaire.....	35
1.6.2.2	dKO Mbnl1/Mbnl2 : déplétion homozygote de Mbnl1 et hétérozygote de Mbnl2	35
1.6.2.3	KO Mbnl1/Myo-Mbnl2 : déplétion homozygote de Mbnl1 et muscle spécifique de Mbnl2	36
1.6.2.4	KO Mbnl1/Myog-Mbnl2/Myog-Mbnl3 : déplétion homozygote de Mbnl1 et muscle spécifique de Mbnl2 et Mbnl3.....	36
1.6.2.5	KO Mbnl1/Nestine-Mbnl2 : déplétion homozygote de Mbnl1 et neurone spécifique de Mbnl2.....	37
1.6.2.6	KO Mbnl1/Myh6-Mbnl2 : déplétion homozygote de Mbnl1 et muscle cardiaque spécifique de Mbnl2.....	37
1.7	Stratégies thérapeutiques pour la DM1	40
2	La famille de protéines MBNL	42
2.1	Trois paralogues : MBNL1, MBNL2 et MBNL3.....	42
2.1.1	L'implication de MBNL dans le muscle squelettique	45
2.1.2	L'implication de MBNL dans le système nerveux central.....	46
2.2	Fonctions individuelles des différents domaines des protéines MBNL.....	47
2.2.1	Propriétés de liaison à l'ARN de la partie N-terminale.....	47
2.2.2	Modalités de liaison de MBNL à sa cible ARN	48
2.2.2.1	Séquence consensus.....	48
2.2.2.2	Structure de l'ARN cible	48
2.2.2.3	Nombre et positions des motifs consensus	49
2.2.3	Régulation de l'épissage alternatif par la partie C-terminale de la protéine.....	50
2.3	Régulateurs des protéines MBNL.....	50
2.3.1	Autorégulation de MBNL.....	50
2.3.2	Autres régulateurs de MBNL	51
2.4	Fonction des protéines MBNL	52
2.4.1	Régulation de l'épissage alternatif.....	52

2.4.2	Régulation des processus 3'UTR-dépendants.....	54
2.4.2.1	Polyadénylation alternative	54
2.4.2.2	Localisation des ARN.....	55
2.4.2.3	Stabilisation des ARN.....	57
2.4.3	Biosynthèse des miARN	58
2.4.4	Inhibition des gènes d'induction à la pluripotence	58
3	L'unité motrice	59
3.1	Le motoneurone	61
3.1.1	Développement des MNs	62
3.1.1.1	Organisation des MNs en colonnes	64
3.1.1.2	Organisation en groupes de MNs.....	65
3.1.1.3	Types de MNs somatiques.....	66
3.1.1.3.1	MNs α	66
3.1.1.3.2	MNs β et γ	66
3.1.2	La transmission synaptique dans les MNs.....	67
3.1.2.1	Cellules gliales, soutien des cellules neuronales	68
3.1.2.2	Guidage axonal des MNs.....	69
3.1.2.3	Transport des ARNm et traduction locale.....	70
3.2	La jonction neuromusculaire.....	71
3.2.1	Structure tripartite de la JNM.....	72
3.2.1.1	La présynapse axonale.....	73
3.2.1.2	La postsynapse.....	73
3.2.1.3	La cellule de Schwann.....	74
3.2.2	Développement de la JNM chez la souris	76
3.2.2.1	Formation.....	76
3.2.2.1.1	« Clustering » des RACH et voie de signalisation Agrine-Lrp4-MuSK	76
3.2.2.1.2	Acteurs en aval de MuSK.....	78
3.2.2.1.3	Voie de signalisation Wnt.....	78
3.2.2.1.4	Voies de signalisation rétrogrades.....	79
3.2.2.1.5	Élimination des RACH aneuxaux.....	79
3.2.2.2	Maturation de la JNM.....	80
3.2.3	Maintien, régénération et vieillissement de la JNM	81
3.2.3.1	Maintien de la JNM.....	81
3.2.3.2	Régénération de la JNM après une blessure nerveuse.....	82

3.2.3.3	L'évolution de la JNM avec l'âge.....	82
3.3	Muscle squelettique et couplage excitation-contraction.....	83
3.4	Altération du MN et de la JNM dans la DM1	85
	Problématique et objectifs.....	87
	Résultats	89
	Article en préparation	89
	Résultats complémentaires	122
	Discussion Générale	136
	Conclusion & perspectives.....	151
	Bibliographie.....	153
	Annexes à l'article en préparation.....	201
	Annexe – Vidéos de locomotion des souris.....	201
	Annexe – Tables supplémentaires.....	201
	Table des figures	202
	Table des tableaux	204
	Abréviations.....	205

Introduction

1 Dystrophia myotonica

Le terme dystrophia myotonica (DM), ou dystrophie myotonique, a été introduit au début du siècle dernier, formulé à partir de patients présentant une atrophie musculaire accompagnée d'une difficulté de relaxation des muscles après une contraction, ou myotonie (Batten & Gibb, 1909; Steinert, 1909). A l'heure actuelle, la dystrophie myotonique regroupe deux maladies multisystémiques rares héréditaires à transmission autosomique dominante, la Dystrophie Myotonique de type 1 (DM1) et la Dystrophie Myotonique de type 2 (DM2), originellement appelée dystrophie myotonique proximale (PROMM).

La DM1 et la DM2 sont des maladies dites à expansion. La DM1 est due à une expansion de triplets CTG dans le gène *DMPK* (Brook et al., 1992; Buxton et al., 1992; Fu et al., 1992) et la DM2 a une expansion de quadruplets CCTG dans le gène *ZNF9*, aujourd'hui nommé *CNBP*, respectivement (Thornton et al., 1994; Day et al., 1999; Liquori et al., 2001; Ranum et al., 1998; Ricker et al., 1994). Si l'atteinte musculaire est le symptôme le plus proéminent et caractéristique de la DM, les patients peuvent développer des défauts dans de multiples tissus et selon des degrés très différents (Thornton, 1999; Day et al., 2003). La DM est la dystrophie la plus répandue chez l'adulte avec une prévalence mondiale estimée à 1/8500 (Harper, 2001), ce nombre étant sans doute sous-estimé à cause de la difficulté de diagnostic des patients asymptomatiques ou peu atteints (Suominen et al., 2011).

Ce premier chapitre aura pour but de décrire la pathologie et comprendra 7 parties. Je présenterai d'abord les spécificités de la DM1 (1), puis de la DM2 (2). Les deux pathologies partageant de nombreux aspects, je traiterai par la suite de la DM au sens général, avec mention des différences entre la DM1 et la DM2. J'aborderai ainsi le phénotype clinique (3), le mécanisme moléculaire à l'origine de la DM (4) ainsi que les mécanismes physiopathologiques qui en découlent (5). Je finirai ce chapitre en détaillant les nombreux modèles murins utilisés pour étudier la DM (6) ainsi que les stratégies thérapeutiques considérées jusqu'à présent (7).

1.1 Dystrophie myotonique de type 1

La DM1 a été décrite au début des années 1900 (Batten & Gibb, 1909; Steinert, 1909). Elle est désormais reconnue parmi les dystrophies les plus communes chez l'adulte. La DM1 semble être plus présente dans les continents européen et américain avec une prévalence de 1/2100 qui peut monter jusqu'à 1/529 dans certaines régions d'Amérique du Nord (Mathieu et al., 1990; Johnson et al., 2021). Elle est cependant peu représentée en Asie avec une incidence pouvant descendre jusqu'à 1/100 000 (Hsiao et al., 2003). La DM1 est due à une mutation dans le gène *DMPK*, pour *dystrophia myotonia protein kinase*, qui se trouve sur le chromosome 19 (19q13.32) (figure 1) (Johnson et al., 1990).

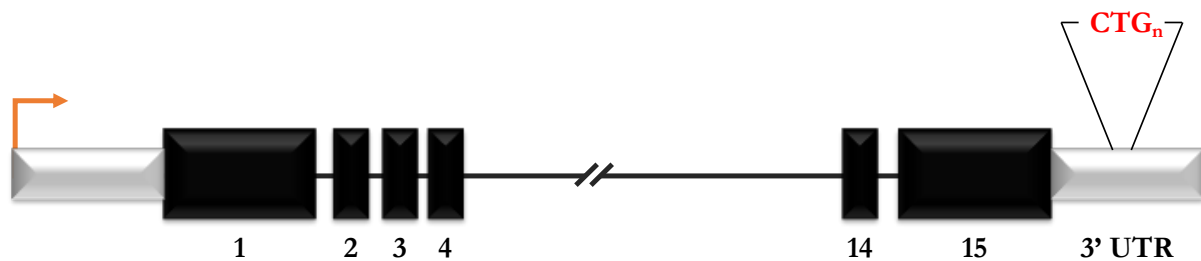
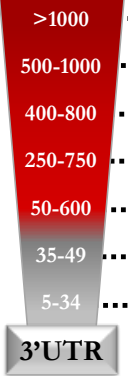


Figure 1 : Représentation schématique du gène *DMPK*.

Le gène *DMPK* présente dans sa partie 3'UTR des répétitions de triplets nucléotidiques CTG. Chez les individus sains, ce nombre de répétitions varie entre 5 et 35 CTG alors que les patients DM1 en comptent entre 50 à plusieurs milliers (Brook et al., 1992; Mahadevan et al., 1992). Le nombre de répétitions CTG est généralement proportionnel à la sévérité des symptômes et inversement proportionnel à l'âge d'apparition des premiers signes de la maladie (Hunter et al., 1992). Actuellement, on distingue 5 catégories de patients et formes de DM1 qui se basent donc à la fois sur le pronostic et la taille des répétitions (figure 2). En partant des formes les plus graves et précoces (De Antonio et al., 2016), les patients peuvent développer la forme :

- Congénitale, apparaissant à la naissance
- Infantile, apparaissant entre 1 mois et 10 ans
- Juvénile, apparaissant entre 11 ans et 20 ans
- Adulte, apparaissant entre 21 ans et 40 ans
- Adulte tardive, apparaissant après 40 ans



The diagram shows a 3'UTR region with a red-to-white gradient. A red arrow on the left points downwards, labeled 'CTG_n' at the top. The arrow contains the following repeat count ranges from top to bottom: >1000, 500-1000, 400-800, 250-750, 50-600, 35-49, and 5-34. A grey box at the bottom of the arrow is labeled '3'UTR'. Dotted lines connect these ranges to the rows of the table below.

	Catégorie clinique	Âge d'apparition de la pathologie	Principaux symptômes possibles
>1000	Congénitale	A la naissance	Muscle immature, hypotonie, retard mental et ceux mentionnés plus bas
500-1000	Infantile	1 mois - 10 ans	
400-800	Juvenile	11 an - 20 ans	Myotonie, cataractes, problèmes gastriques, faiblesse faciale, défauts de conduction cardiaque, faiblesse et fonte des muscles distaux, résistance à l'insuline, insuffisance respiratoire, QI faible
250-750	Adulte	21 - 40 ans	
50-600	Adulte tardif	> 40 ans	Légère myotonie, cataractes, problèmes gastriques
35-49	Prémutation		Aucun
5-34	Sain		Aucun

Figure 2 : Catégories de patients DM1 et principaux symptômes associés

(adapté de Thomas, Oliveira, Sznajder, & Swanson, 2018).

1.1.1 Anticipation dans la DM1

La transmission de la pathologie suit le principe d'anticipation (Höweler et al., 1989), c'est-à-dire que la sévérité des symptômes, et le nombre de répétitions CTG, tendent à augmenter de génération en génération (Harley et al., 1993). Les répétitions CTG deviennent instables à plus de 35 répétitions, les individus présentant entre environ 35 et 49 répétitions sont donc considérés en pré-mutation car ce nombre peut augmenter et provoquer l'apparition de symptômes DM1 à la génération suivante (Kumar et al., 2014; Yamagata et al., 1994). Cette augmentation n'est pas systématique et n'est pas forcément uniforme d'une génération à l'autre, avec chez certains enfants une augmentation considérable du nombre de répétitions CTG par rapport à leur parent porteur de la mutation (figure 3) (Martorell et al., 1998, 2001; Monckton & Caskey, 1995).



Figure 3 : Phénomène d'anticipation entre les générations mis en évidence par une famille atteinte de DM1.

Les contractions du nombre de répétitions sont également possibles entre les générations mais celles-ci ne concernent que 6,4% des transmissions de parents atteints de DM1 (Ashizawa et al., 1994).

1.1.2 Mosaïcisme somatique dans la DM1

Les cellules somatiques de l'organisme, ne comprenant donc pas les cellules germinales servant à la reproduction, présentent elles aussi un biais vers l'expansion du nombre de répétitions CTG au cours de la vie de l'individu (Lavedan et al., 1993). L'instabilité somatique dépend de multiples facteurs dont : la taille de l'allèle responsable de la pathologie (Wong et al., 1995), le tissu concerné et le type cellulaire affecté (Ashizawa et al., 1993).

L'instabilité somatique dans le sang a été reliée avec un âge d'apparition des symptômes plus précoce que celui prédit par la taille estimée de l'allèle d'origine (Morales et al., 2012, 2020). Le muscle (Anvret et al., 1993; Martorell et al., 1997) et le cerveau (Otero et al., 2021) figurent parmi les tissus avec le plus grand nombre de répétitions CTG, celui-ci pouvant dépasser 5000 au cours de la vie de l'individu. Ce nombre ne corrèle alors plus avec l'âge d'apparition des symptômes ou leur sévérité dans ces tissus (Zatz et al., 1995). Cette absence de corrélation pour les très longues répétitions montre que leur effet pathogénique est saturable, l'augmentation extensive du nombre de répétitions n'impliquant pas l'aggravation des symptômes (Day & Ranum, 2005b; Harper, 2001). Étant donné que l'instabilité somatique concerne à la fois les cellules somatiques mitotiques et post-mitotiques, les mécanismes physiologiques de réplication, de méthylation (Castel et al., 2011; Cleary et al., 2010) et de réparation (Franck et al., 2020) de l'ADN ont été explorés comme causes possibles de l'instabilité somatique.

1.1.3 Interruptions inter-répétitions dans la DM1

Entre 3 et 5% des patients DM1 ne présentent pas une répétition pure de triplets CTG au locus DMPK, celle-ci est en effet interrompue par des triplets variants tels que CCG, CAG ou CGG (Musova et al., 2009; Pešović et al., 2017; Santoro et al., 2013). Étant donné qu'aucun patient avec des interruptions n'a développé de forme congénitale, il en a été déduit que les interruptions atténuent indirectement le phénotype causé par la mutation. En effet, les patients DM1 avec des répétitions interrompues semblent présenter des altérations musculaires et neurologiques amoindries par rapport aux patients présentant des défauts similaires mais sans interruption (Cumming et al., 2019; Miller et al., 2020). Cette atténuation phénotypique peut être due à la répression de l'expansion somatique par stabilisation des répétitions CTG (Pešović et al., 2018), dont le mécanisme reste inconnu. Un profil de méthylation spécifique aux patients avec interruptions pourrait également participer à ce phénomène (de Pontual & Tomé, 2022).

1.2 Dystrophie myotonique de type 2

La DM2 représente 2% des patients DM avec une incidence d'un individu touché sur 20 000. Cette incidence est certainement sous-estimée (Suominen et al., 2011) de par la variabilité des symptômes qui caractérise la pathologie. La DM2 est due à une expansion de répétitions tétra-nucléotidiques CCTG (de 75 à 11 000) dans le premier intron du gène *CNBP*, pour *CCHC-type zinc finger nucleic acid binding*, qui se trouve sur le chromosome 3 (3q21) (figure 4) (Day et al., 1999; Liquori et al., 2001; Ranum et al., 1998; Ricker, 1999). Le premier porteur de la mutation à l'origine de la DM2 a été identifié au nord de l'Europe (Bachinski et al., 2003), région ayant la prévalence de la DM2 la plus élevée (Day et al., 2003).

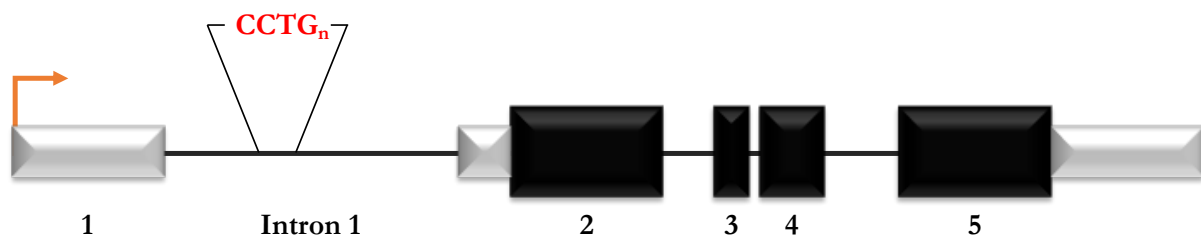


Figure 4 : Représentation schématique du gène *CNBP*.

Le gène *CNBP* présente dans son 1^{er} intron des répétitions de tétramères CCTG. Comme la DM1, la DM2 est une maladie à expansion de répétitions. L'allèle normal compte moins de 30 répétitions CCTG alors que les patients DM2 peuvent présenter jusqu'à 11 000 répétitions, avec une moyenne de 5 000 répétitions dans le sang (Liquori et al., 2001). Contrairement à la DM1, aucun cas de forme congénitale DM2 n'a été décrit et aucune corrélation évidente entre le nombre de répétitions CCTG et la sévérité ou l'âge d'apparition des premiers symptômes n'a été observée. De plus, la DM2 ne suit pas le phénomène d'anticipation mais, comme la DM1, la DM2 est soumise au mosaïcisme somatique (Ashizawa & Sarkar, 2011; Day et al., 2003). Les mécanismes moléculaires pouvant expliquer la différence d'instabilités entre les répétitions CTG et CCTG sont encore peu clairs.

Enfin, chez les patients atteints de la DM2, l'apparition des symptômes est souvent plus tardive dans et ceux-ci sont souvent moins prononcés que chez les patients atteints de la DM1, malgré un nombre de répétitions bien supérieur (figure 5).

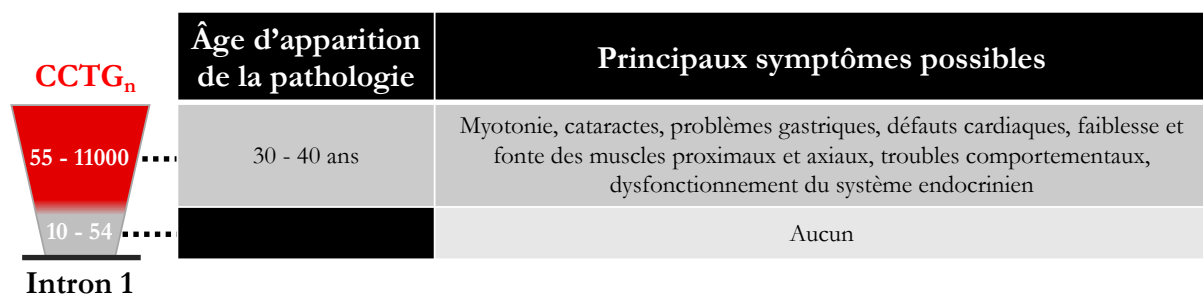


Figure 5 : Principaux symptômes associés à la DM2
(adapté de Thomas, Oliveira, Sznajder, & Swanson, 2018).

1.3 Phénotype clinique des formes adultes des DM

Les DM sont caractérisées par des atteintes multisystémiques (figure 6). De plus, ces défauts sont extrêmement variables entre les individus. D'une part à cause de la distinction entre la DM1 et la DM2 et d'autre part à cause des différentes catégories de patients DM1. Enfin, les symptômes varient même au sein des patients DM2 ou au sein des patients DM1 d'une même forme clinique. La DM affecte principalement les tissus musculaires, la myotonie ainsi que la faiblesse et l'atrophie musculaires étant les symptômes les plus représentatifs de la pathologie. Des atteintes cardiaques se manifestent dans 3 patients DM1 sur 4 et 1 patient DM2 sur 5. Avec l'insuffisance respiratoire causée par la faiblesse musculaire, elles constituent les causes majeures de décès chez les patients DM, ces derniers pouvant également développer des troubles neurologiques que l'on retrouve dans

les formes les plus graves de la DM1. En contraste, toutes les formes de la DM peuvent provoquer l'apparition de cataractes atypiques dites en « sapin de Noël ».

Enfin, la majorité des patients souffrent de problèmes gastrointestinaux. Les patients atteints de la forme congénitale de la DM1 ont l'espérance de vie la plus faible parmi les patients DM : 25% de mortalité dans la période postnatale et environ 50% avant 35 ans. Alors que, dans la grande majorité des cas, la DM2 n'impacte pas l'espérance de vie des patients, les patients DM1 avec une forme clinique adulte ont une espérance de vie réduite de 60% par rapport à la population saine à 65 ans. (Day et al., 2003; De Antonio et al., 2016; Mahadevan et al., 2021; Meola, 2020).

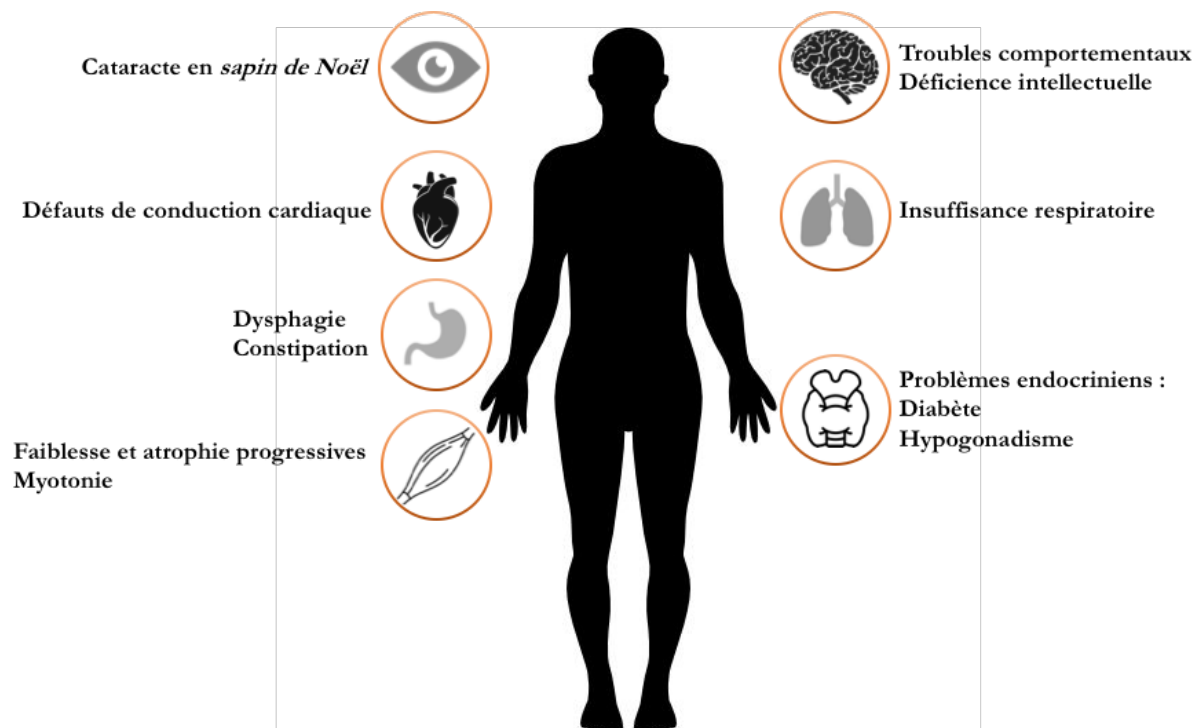


Figure 6 : Symptômes plurisystémiques de la DM

Les patients DM développent des défauts dans de nombreux tissus, incluant les systèmes nerveux central, respiratoire, cardiaque, gastro-intestinal et musculaire.

1.3.1 Symptômes musculaires dans la DM

Les atteintes musculaires représentent le défaut le plus commun aux patients DM. Les patients se plaignent ainsi de fortes douleurs musculaires (myalgies) (Romeo, 2012).

1.3.1.1 Myotonie

La myotonie, définie comme la difficulté à relâcher les muscles une fois qu'ils ont été contractés, est un défaut musculaire qui affecte la quasi-totalité des patients DM1 avec un profil adulte (figure 7) (Myotonic Dystrophy Foundation, n.d.). La myotonie affecte le plus sévèrement la main, les pieds, la mâchoire et la langue (Wang & Huang, 2011). Elle peut être mesurée par EMG, l'hyperexcitabilité des fibres musculaires produisant des décharges continues de potentiels d'action après une stimulation (Hudson et al., 1995). Alors que la myotonie est un symptôme très commun parmi les patients DM1, les patients DM2 n'en développent que rarement, et encore plus rarement de manière sévère (Udd & Krahe, 2012; Young et al., 2010). La myotonie dans la DM a été associée à un défaut de l'épissage alternatif des transcrits du canal chlorure 1 voltage-dépendant (*CLC-1*) conduisant à la perte d'expression des canaux (Charlet-B. et al., 2002; Mankodi et al., 2002). La myotonie peut être réduite par traitement avec des bloqueurs des canaux sodiques ou chlorure ou encore des antidépresseurs tricycliques (Antonini et al., 1990; Grant et al., 1987; Leyburn & Walton, 1959).

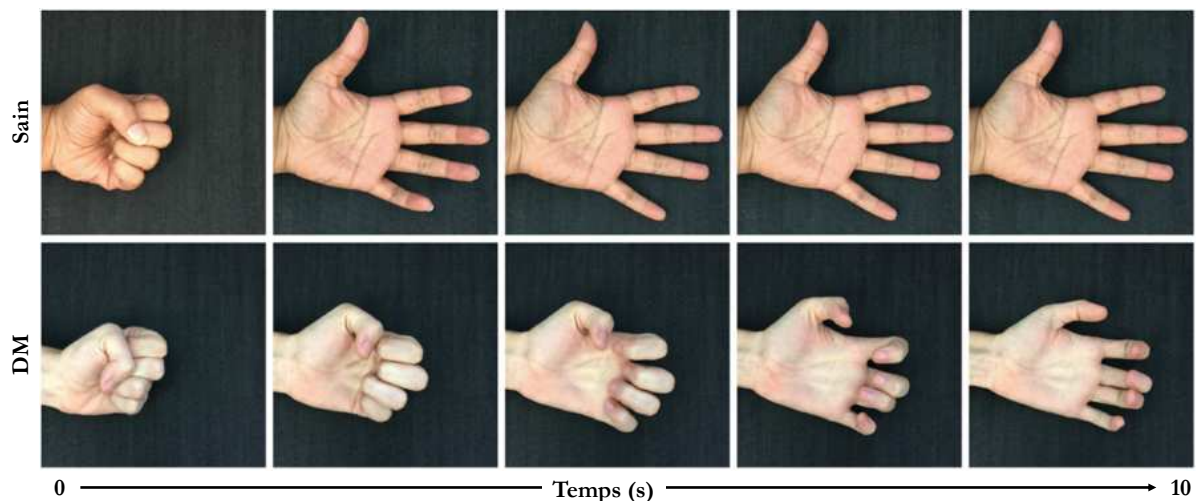


Figure 7 : La myotonie chez les patients DM

(adapté de Thomas, Oliveira, Sznajder, & Swanson, 2018). Myotonie de la main après avoir fermé le poing.

1.3.1.2 Faiblesse musculaire et atrophie

Les muscles squelettiques des patients DM sont également caractérisés par une faiblesse progressive, accompagnée d'une atrophie, qui touche plus de la moitié des patients (De Antonio et

al., 2016; Montagnese et al., 2017). La DM1 et DM2 se distinguent notamment en fonction des muscles atteints. En effet, la DM1 touche prioritairement les muscles distaux comme les muscles fléchisseurs des doigts et des poignets ainsi que les muscles extenseurs du pied, lesquels provoquent des défauts de locomotion chez les patients (Jiménez-Moreno et al., 2018). Cette faiblesse musculaire est progressive et peut toucher les muscles oropharyngés et respiratoires dont le dysfonctionnement mène à des dysphagies et insuffisances respiratoires, qui représentent la cause majeure de mortalité chez les patients (Mathieu et al., 1999).

La faiblesse et l'atrophie musculaire touchent également les muscles temporaux, sterno-cléido-mastoïdien du cou et orbiculari oculi des paupières qui peuvent engendrer un ptosis. Ces altérations mènent à un profil facial DM1 défini par une tête allongée avec les tempes creuses et souvent associé à une alopecie frontale. Ce faciès est peu représenté chez les patients DM2 et constitue une des distinctions entre les patients. De plus, chez les patients DM2, la faiblesse musculaire touche majoritairement les muscles proximaux et axiaux tels que les muscles fléchisseurs du cou, des cuisses et extenseurs des cuisses (Wenninger et al., 2018). Cette atteinte des muscles proximaux ont valu à la DM2 son nom initial de PROMM (Abbruzzese et al., 1996; Thornton et al., 1994; Meola & Sansone, 1996; Ricker et al., 1994).

Chez les patients DM, la faiblesse musculaire pourrait être due à une altération de l'épissage alternatif conduisant à des défauts du couplage excitation/contraction des membranes musculaires. En effet, l'épissage alternatif des ARNm de la protéine 1 d'interaction dépendante de la boîte myc (*BIN1*) (Fugier et al., 2011), et des récepteurs à la dihydropyridine (*DHPR*) par la sous-unité 1S des canaux calciques voltage-dépendant de type L (*CACNA1S*) (Tang et al., 2012) est altéré à la fois dans la DM1 et la DM2. A ces altérations se rajoutent des défauts de l'épissage alternatif des ARNm du récepteur à la ryanodine 1 (*RYR1*) et de la pompe ATPase calcique du réticulum sarcoplasmique (RS) (*SERCA* ou *ATP2A1*) uniquement dans la DM1 (Kimura et al., 2005).

Au niveau histologique (figure 8), les fibres musculaires des patients DM ont des diamètres particulièrement hétérogènes, sont parfois scindées, certaines pouvant même être orthogonales. Les fibres musculaires peuvent également contenir des agrégats de noyaux pycnotiques qui se manifestent dans les fibres fortement atrophiées. Quant à l'atrophie, elle est plus représentée dans les fibres oxydatives lentes de type I dans la DM1 et dans les fibres glycolytiques rapides de type II dans la DM2. Ce même tropisme a été remarqué pour la centronucléation (Vihola et al., 2003). D'ordinaire, les noyaux des cellules musculaires sont en périphérie de la fibre mais, de manière générale, dans les fibres de type I et II dans la DM1, et dans les fibres de type II dans la DM2, ils sont parfois observés au centre de la fibre (Bassez et al., 2008). Dans un contexte normal, les fibres

centronucléées sont présentes dans les muscles en régénération mais, à ce jour, seule une faible régénération musculaire a été décrite dans les muscles de la DM (Grimby et al., 1988).

Les fibres musculaires de patients DM peuvent également présenter des accumulations de lipides, des noyaux extraordinairement larges ou déformés, des chaînes de noyaux, des masses sarcoplasmiques et de la fibrose au stade tardif (Ikezoe et al., 2007; Meola & Cardani, 2015; Ozimski et al., 2021). Enfin, les muscles des patients peuvent présenter des fibres orthogonales (Schröder & Adams, 1968), associées au défaut d'épissage de la dystrophine (Rau et al., 2015). Pour finir, les muscles lisses, et notamment les muscles du pharynx, l'œsophage et le côlon sont également touchés et ceci peut-être plus fréquemment que les muscles striés squelettiques (Garrett et al., 1969; Schuman et al., 1965).

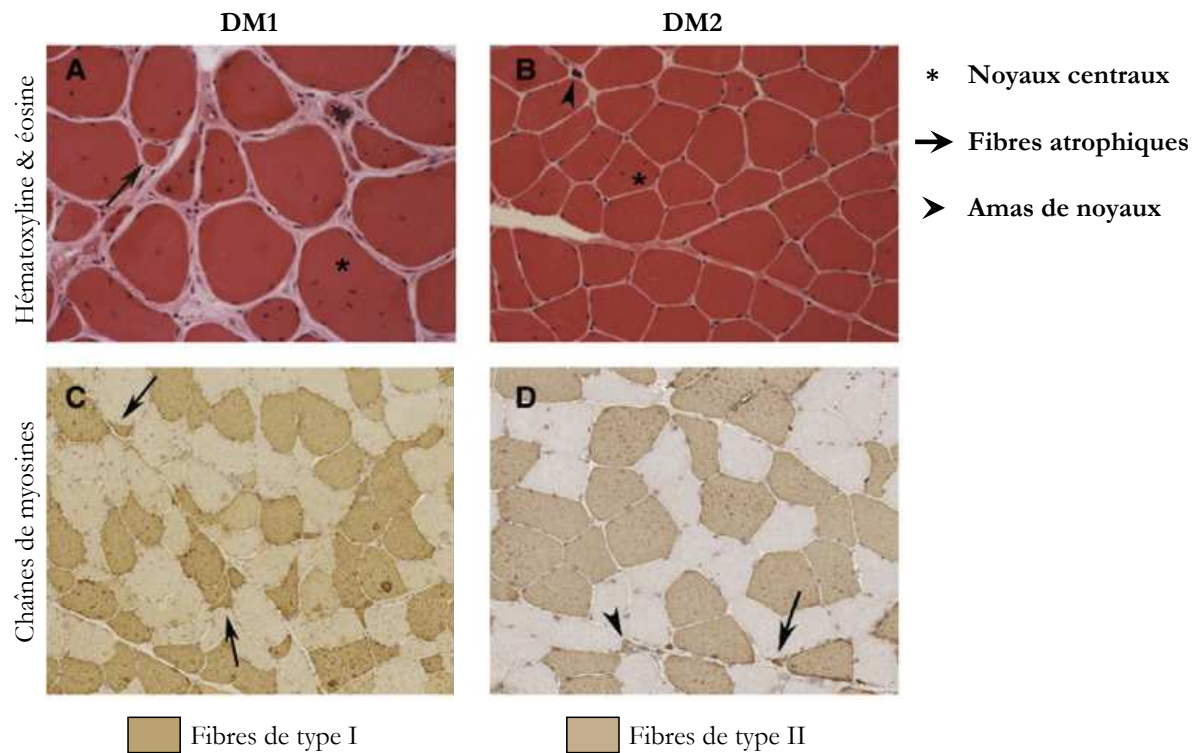


Figure 8 : Défauts histologiques du muscle squelettique chez les patients DM1 et DM2

(adapté de Meola & Cardani, 2015). (A-B) Marquages à l'hématoxyline & à l'éosine révélant les noyaux centraux, fibres atrophiées et amas de noyaux. (C-D) Marquages des chaînes lourdes de myosines révélant l'atrophie préférentielle des fibres de type I dans la DM1 et de type II dans la DM2.

1.3.1.3 Atteinte cardiaque dans la DM

Après l'insuffisance respiratoire, la mort subite a priori d'origine cardiaque, est la deuxième cause de mortalité chez les patients DM (Groh et al., 2008). Les atteintes cardiaques concernent plus de 80% des patients DM, et peuvent être présentes dès l'adolescence avec des arythmies atriales et ventriculaires ainsi que des embolies (Bassez et al., 2004). Les manifestations cardiaques présentes chez les patients DM1 comprennent des anomalies de la conduction cardiaque, des arythmies, et plus rarement des atteintes cardiaques ischémiques sous forme d'angine stable, instable ou d'infarctus du myocarde. Pour cette raison, des analyses par ECG sont essentielles pour détecter les défauts cardiaques des patients DM, qui peuvent précéder les défauts des muscles squelettiques (McNally et al., 2020). Plus précisément, les ECG révèlent des blocs atrio-ventriculaires, des blocs de branche (Petri et al., 2014) ainsi que des fibrillations et « flutter » atriaux qui semblent être liés aux cas de mort subites des patients (Brembilla-Perrot et al., 2014).

Les patients DM portent des pacemakers ou des défibrillateurs cardiaques, qui augmentent le risque d'ischémie cérébrale (Yoshida et al., 2018). Au niveau histologique, le système de conduction cardiaque des patients DM1 présente majoritairement de la fibrose interstitielle accompagnée d'infiltrations graisseuses (Phillips & Harper, 1997). Les défauts de la conduction cardiaque ont été associées à une altération de l'épissage alternatif de la sous-unité alpha du canal sodique voltage dépendant V (*SCN5A*) (Freyermuth et al., 2016). La forme des myocytes est également altérée par une hypertrophie et un désalignement les uns par rapport aux autres (Rakocevic-Stojanovic et al., 1999). Chez les patients DM2, ces défauts cardiaques sont similaires mais généralement moins marqués (Kimura & Saito, 2011).

1.3.2 L'atteinte du système nerveux central dans la DM

Depuis quelques années, les études cliniques et neuropsychologiques ont prouvé l'implication du système nerveux central (CNS) dans la pathologie, notamment dans les formes les plus sévères de la maladie, renforçant l'idée que la DM1 renvoie aussi à une pathologie neurologique. Un des grands traits cliniques de la DM1 est l'hypersomnie. Les patients DM peuvent également souffrir de douleurs, fatigue, et d'une diminution de la qualité du sommeil (apnée du sommeil et insomnie) (Yu et al., 2011; Rubinsztein et al., 1998). D'autres atteintes neurologiques variées incluent : apathie, un syndrome dysexécutif, des défauts de repérage dans l'espace et une mémoire défaillante. Un tiers des patients présentant la forme adulte classique ont un QI réduit et la moitié présentent une dysfonction exécutive (Liu et al., 2021).

L'atteinte neurologique est encore plus importante chez les formes précoces de la maladie. Ainsi les formes congénitales sont caractérisées par un retard mental pouvant aller de modéré à sévère, alors que la forme infantile est caractérisée par un QI plus bas ainsi qu'un déficit de l'exécution (Angeard et al., 2007; Liu et al., 2021). Au niveau histologique, la DM1 et la DM2 causent une atrophie cérébrale diffuse (Antonini et al., 2004; Kornblum et al., 2004) et des lésions de la matière blanche, notamment des lésions hyperintenses (Romeo et al., 2010) avec une perte axonale associée à une démyélinisation dans la matière blanche profonde dans la DM1 (Itoh et al., 2010)(Minnerop et al., 2018; Weijs et al., 2021). Par ailleurs, des enchevêtrements fibrillaires, associés aux tauopathies, ont été décrits dans la DM (Kiuchi et al., 1991; Maurage et al., 2005). De plus, la physiopathologie de la DM comprend des altérations de l'épissage alternatif, du transport nucléocytoplasmique ainsi que de la traduction sans ATG qui sont des phénomènes réminiscent d'autres maladies neurodégénératives (Caillet-Boudin et al., 2014; Fernandez-Gomez et al., 2019). Dans la DM1, les enchevêtrements fibrillaires sont dus aux défauts de l'épissage alternatif des transcrits codant la protéine Tau associée aux microtubules (*MAPT*) (Dhaenens et al., 2008; Goodwin et al., 2015; Sergeant et al., 2001). Ces études désignent la DM, et particulièrement la DM1, comme une tauopathie mais cette dénomination reste débattue. Ainsi, une étude récente n'a pas détecté de signature de Tau *in vivo* dans une petite cohorte de patients DM1, soulignant la variabilité entre les patients (Laforce et al., 2022).

1.3.3 Symptômes génito-urinaires et gastro-intestinaux dans la DM

La DM altérant le muscle strié mais également le muscle lisse (Harvey et al., 1965), les systèmes génito-urinaires et gastro-intestinaux sont également affectés dans la DM (Fisette-Paulhus et al., 2022). Ainsi, les patients souffrent d'incontinence urinaire (Vohánka et al., 2014). Alors que les femmes sont plus touchées par ce problème, les hommes peuvent présenter une dysfonction érectile ainsi qu'un hypogonadisme (Antonini et al., 2009). Quant aux atteintes gastro-intestinales, les patients peuvent présenter une incontinence anale et des épisodes de diarrhée, de constipation et de douleurs abdominales (Rönblom et al., 1996). Ces dysfonctionnements semblent plus toucher les femmes que les hommes (Hilbert et al., 2017).

Les symptômes DM sont parfois associés à des défauts du sphincter anal ainsi qu'à une faiblesse et une atrophie des muscles du plancher pelvien, du sphincter anal externe et du muscle pubo-rectal (Eckardt & Nix, 1991; Hamel-Roy et al., 1984). Le foie semble également touché, avec une augmentation des aspartate/alanine aminotransférases (Bellini et al., 2006). La DM est parfois décrite comme une maladie du vieillissement prématuré (Mateos-Aierdi et al., 2015), cela se

retrouve dans les systèmes génito-urinaires et gastro-intestinaux, les symptômes des patients DM ressemblant à ceux de la population gériatrique (Osman & Chapple, 2014; Selvin et al., 2007)

1.3.4 Autres symptômes des patients DM

La DM est associée à l'apparition de nombreux autres symptômes dans différents tissus. La survenue de cataractes caractéristiques de la DM dites en « sapin de Noël », est un des symptômes les plus décrits et observé chez plus de la moitié des patients (Day et al., 2003; Ekström et al., 2010; Montagnese et al., 2017). Cependant, le mécanisme physiopathologique associé n'a pas été décrit. Dans un autre registre, les patients DM sont vulnérables face à d'autres pathologies, étant plus susceptibles que la population générale de développer des cancers endométriaux, cervicaux, ovariens et du côlon (Gadalla et al., 2011) ainsi que des maladies thromboemboliques veineuses pour les patients DM1 (Sochala et al., 2018).

Certaines altérations présentes chez les patients DM n'ont pas encore été reliées aux symptômes de la pathologie. Ainsi, la majorité des patients DM1 développent une hypogammaglobulinémie des immunoglobulines G qui n'a pas été associée à des défauts cliniques (Kaminsky et al., 2011). Quant aux patients DM2, ils présentent une plus grande quantité d'auto-anticorps, qui pourrait causer des maladies auto-immunes (Tieleman et al., 2009). Les fonctions endocrines peuvent également être touchées chez les patients DM avec un risque accru de cancer thyroïdien (Alsaggaf et al., 2018), un hypogonadisme, un hyperinsulinisme probablement dû à une résistance à l'insuline, ainsi qu'une alopecie frontale (Winters, 2021).

1.4 Physiopathologie de la DM1

Les expansions de répétitions CTG et CCTG à l'origine de la DM1 et DM2 se trouvant toutes deux dans des régions non-codantes et étant donné le grand nombre de ressemblances entre les deux pathologies, il a été postulé qu'un unique mécanisme pathologique était à l'origine des symptômes des patients DM. Deux mécanismes principaux ont été étudiés. D'une part, pour la DM1, l'haploinsuffisance des gènes porteurs de la mutation et des gènes flanquant l'allèle *DMPK* muté contenant les répétitions : *SIX homeobox 5 (SIX5)* et *DM1 Locus, WD Repeat Containing (DMWD)*. D'autre part, un gain de fonction toxique des ARNs transcrits contenant de longues répétitions CUG ou CCUG ayant un impact sur des cibles en aval.

1.4.1 L'haploinsuffisance des gènes *DMPK*, *SIX5* et *DMWD*

L'expansion de répétitions CTG est située dans la région 3'UTR du gène *DMPK*, située entre les gènes *SIX5* et *DMWD*. Une première hypothèse postulait d'un modèle d'haploinsuffisance par un effet en cis sur l'expression des gènes *DMPK*, *SIX5* et *DMWD* comme mécanisme pathologique possible pour expliquer les symptômes associés à la DM1. En effet, les ARN mutés contenant de longues répétitions CUG ne sont pas exportés et sont retenus dans les noyaux des cellules sous forme d'agrégats nucléaires (Davis et al., 1997; Sabouri et al., 1993), entraînant une diminution d'expression de 50% du gène *DMPK* dans des tissus et cellules dérivés de patients (Carango et al., 1993; Davis et al., 1997; Klein et al., 2011; Maeda et al., 1995; Ueda et al., 1999; Fu et al., 1992, 1993).

Les îlots CpG en amont et en aval des répétitions CTG ne sont pas méthylés chez les individus sains mais sont hyperméthylés chez les patients atteints de la forme congénitale de la DM1. Cette différence suggère que les longues répétitions sont plus susceptibles à certaines modifications épigénétiques (Barbé et al., 2017; Steinbach et al., 1998). Cependant, même si la perte de fonction de la protéine DMPK avait d'abord été reliée à des anomalies cardiaques et une légère myopathie (Berul et al., 1999, 2000; Saba et al., 1999), une étude plus récente a montré que la perte de fonction de DMPK n'avait aucun impact sur la fonction des muscles squelettiques ou cardiaques (Carrell et al., 2016).

L'hypothèse d'haploinsuffisance s'est également portée sur les gènes proches des expansions de répétitions, étant donné que *SIX5* et *DMWD* ont également une expression diminuée dans la DM1 (Alwazzan et al., 1999)(Klesert et al., 1997). Pour *SIX5* particulièrement, le site *enhancer* hypersensible entre les répétitions CTG et le promoteur du gène *SIX5* a été considéré comme une cause possible de l'haploinsuffisance de *SIX5* (Thornton et al., 1997; Klesert et al., 1997; Otten & Tapscott, 1995). Les souris invalidées pour le gène *SIX5* développent des cataractes à l'état homozygote et des anomalies cardiaques légères chez les hétérozygotes. Cependant, les patients développent des cataractes alors que l'expression de *SIX5* n'est que diminuée, et pas abolie (Klesert et al., 2000; Sarkar et al., 2000).

Une étude récente a cependant combiné les approches précédentes en générant un modèle de souris invalidées pour les gènes *Dmpk*, *Six5*, *Dmwd* et *Mbnl1*. Ainsi, un modèle quadruple KO incluant ces trois premiers gènes, et *Mbnl1* (dont nous verrons l'implication dans la pathologie dans la suite de ce chapitre), aggrave fortement le Triple KO qui n'inclut pas la déplétion de *Dmwd*. En effet, le quadruple KO reproduit de nombreux aspects de la forme congénitale de la DM1 : mortalité plus élevée, atrophie musculaire généralisée et taches dans les yeux qui pourraient être

associées à une cataracte (Yin et al., 2019). Cette étude a remis en perspective l'implication de l'haploinsuffisance de *DMPK*, *SIX5* et *DMWD* dans le développement de la pathologie mais reste toutefois relié à la perte de MBNL1.

Pour la DM2, le modèle murin invalidé pour le gène *Cnbp* reproduit une atteinte plurisystémique des patients avec notamment des cataractes, des défauts cardiaques et une fonte musculaire (Chen et al., 2007). Pour conclure, bien que l'haploinsuffisance des gènes liés aux locus DM1 et DM2 puissent être liée dans une certaine mesure aux différences entre la DM1 et la DM2 (Raheem et al., 2010), le fait que les mutations de la DM1 et de la DM2 ne soient pas sur le même locus exclut ce processus pour expliquer la plus grande partie du mécanisme pathologique responsable des grandes similitudes entre la DM1 et la DM2.

1.4.2 Le gain de fonction toxique de l'ARN muté

Le modèle d'haploinsuffisance des gènes *DMPK* et *SIX5* a été contesté dans une étude montrant que l'expression seule de 200 répétitions CTG en dehors du contexte de la région 3'UTR du gène *DMPK* était suffisante pour induire une inhibition de la myogenèse de cellules C2C12 (Amack et al., 1999).

De plus en plus d'études soutiennent l'hypothèse d'un gain de fonction toxique des ARNs mutés comme source du mécanisme pathologique de la DM. La transcription des expansions de répétitions C(C)TG produisent des ARNs toxiques contenant des expansions de répétitions (C(C)UGexp) qui s'agrègent dans le noyau des cellules et forment des structures imparfaites à deux brins, ou foci ARN, qui sont visibles dans les cellules dérivées et tissus de patients DM (Figure 9). Ces foci ont été observés dans les cellules des patients DM1 et DM2, confortant leur implication dans un mécanisme pathologique commun aux deux maladies.

Le rôle majeur de ces ARNs mutés dans la DM a d'abord été révélé par les modèles de souris transgéniques DM300 et HSA^{LR}, qui expriment des transcrits avec des CUGexp (Gourdon et al., 1997; Mankodi et al., 2000). Les souris DM300, générées par insertion d'un fragment génomique humain d'environ 45kb avec 300 répétitions CTG, récapitulent les défauts plurisystémiques de la DM1. Tandis que les souris HSA^{LR}, générées par expression d'un transgène avec l'actine squelettique humaine comprenant 250 répétitions CTG dans sa partie 3'UTR, récapitulent certaines altérations musculaires de la DM1, telles que la myotonie et la présence de noyaux centraux au niveau histologique, qui corrèlent positivement avec l'expression du transgène.

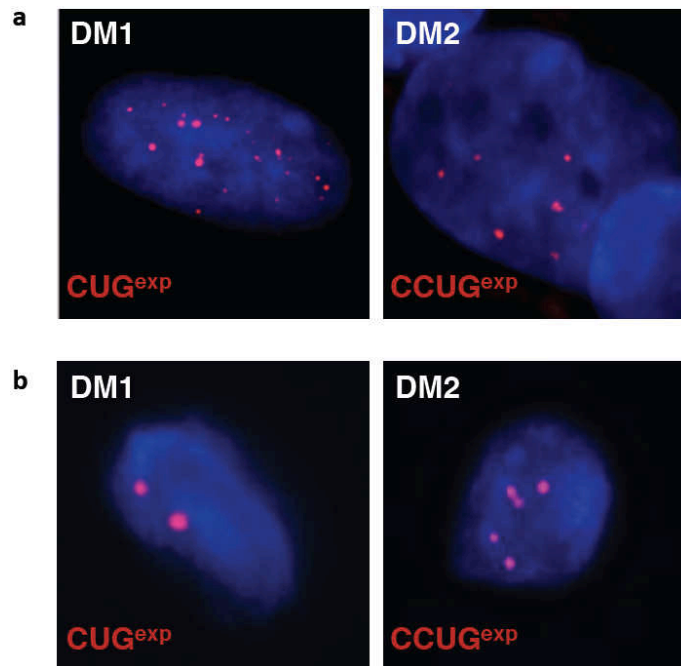


Figure 9 : Foci ARN dans la DM1 et la DM2

(adapté de Liquori et al., 2001). Hybridation *in situ* de sondes CAG (DM1) et CAGG (DM2) dans le noyau (bleu) de cellules dérivées (a) ou de tissus musculaires (b) de patients.

Non seulement la DM1 et la DM2 ne sont pas causées par des mutations dans le même gène mais la localisation des répétitions dans le gène muté est essentielle au mécanisme pathologique de l'ARN. En effet, dans la DM1, les ARNm *DMPK* mutés, coiffés en 5', polyadénylés en 3', sont épissés et traduits, ce qui signifie que leur rétention intranucléaire n'est pas due à une dérégulation du métabolisme de l'ARN *DMPK* (Taneja et al., 1995). Alors que dans le cas de la DM2, les CCTG^{exp} devraient être intégralement éliminées au cours de l'épissage alternatif. Les foci CCTG observés dans la DM2 seraient donc composés de séquences introniques dépourvues des régions adjacentes (Margolis et al., 2006). Il est cependant également possible qu'il y ait une rétention d'intron au cours de l'épissage alternatif du gène, comme cela a été décrit dans des lymphoblastes de patients avec la sclérose latérale amyotrophique présentant des répétitions GGGGCC (Niblock et al., 2016).

Par ailleurs, l'encombrement moléculaire des hélices électro-négatives ARN de type A avec des renflements de mésappariements U-U ainsi que la localisation éparses des foci C(C)UG^{exp} leur donnent de grandes zones disponibles pour interagir avec des protéines de liaison à l'ARN ou d'autres facteurs cellulaires, perturbant leur fonction (Mooers et al., 2005; Tian et al., 2000). Ces facteurs diminuent la mobilité de ces complexes ribonucléoprotéiques au sein du noyau et entraînent leur rétention dans le noyau (Querido et al., 2011).

Enfin des études ont été menées afin de comprendre le rôle des gènes *DMPK* et *CNBP* portant respectivement les répétitions CTG et CCTG. L'absence de DMPK dans les myotubes des souris *Dmpk*^{-/-} conduirait à des augmentations du calcium intracellulaire et à des défauts du couplage excitation/contraction, mettant en évidence le rôle de Dmpk dans l'homéostasie calcique (Benders et al., 1997). Plus récemment, il a été montré que la protéine DMPK migre au niveau de l'enveloppe nucléaire au cours de la différenciation induite par le facteur LIF ainsi qu'au cours de la mitose de cellules C2C12 (Harmon et al., 2008). Enfin, la surexpression ou la déplétion de *Dmpk* dans des cellules C2C12 perturbe l'intégrité de la membrane nucléaire (Harmon et al., 2011). La protéine CNBP est exprimée de manière ubiquitaire et localisée au niveau des bandes Z du muscle squelettique et au niveau des axones neuronaux chez l'homme (Massa et al., 2010). A ce jour, ses fonctions restent méconnues.

1.4.3 Mécanisme pathologique impliquant des protéines de liaison à l'ARN

La fonction de deux familles de protéines de liaison à l'ARN, Muscleblind-like (MBNL) et CUGBP Elav-like Family member (CELF), a été décrite comme profondément altérée dans la DM et directement liée à l'établissement de la physiopathologie des patients DM. MBNL et CELF sont notamment des facteurs d'épissage qui contrôlent la transition des isoformes fœtales aux isoformes adultes de leurs cibles au cours du développement (Ho et al., 2004; Kuyumcu-Martinez et al., 2007; Philips et al., 1998; Lin et al., 2006). MBNL et CELF ont des actions antagonistes sur leurs cibles, qui sont dues aux régulations qui découlent de leur liaison à des sites en amont et en aval de l'exon régulé (Wang et al., 2015; Kalsotra et al., 2008). La perte de fonction des protéines MBNL combinée à l'hyperactivation de CELF promeut donc un profil d'expression fœtale pathologique des transcrits caractéristique de la DM. Ce mécanisme étant central dans cette pathologie, la DM est qualifiée de *spliceopathy* (Nakamori et al., 2013). L'activité d'autres protéines de liaison à l'ARN est également perturbée dans la DM1, notamment Staufén homolog 1 (STAUFEN1) (Bondy-Chorney et al., 2016) et la ribonucléoprotéine nucléaire hétérogène H (hnRNP h) (Kim et al., 2005).

1.4.3.1 Séquestration de MBNL

Les protéines MBNL se lient spécifiquement aux ARN contenant des répétitions CUG (Miller et al., 2000) grâce aux bases GC interrompues par des bases pyrimidiques désappariées, telles que les mésappariements U-U (tels que dans les CUGexp de la DM1) et C-U/U-C (tels que dans les CCUGexp de la DM2) (Yuan et al., 2007). La quantité de MBNL séquestré est

proportionnelle à la longueur des répétitions (Miller et al., 2000). MBNL colocalise avec les foci CUG et CCUG (figure 10) (Cardani et al., 2006; Fardaei et al., 2001; Holt et al., 2009; Mankodi et al., 2001; Perdoni et al., 2009). Elle est par ailleurs essentielle à la stabilisation des foci caractéristiques de la DM. Ainsi, la déplétion de MBNL entraîne une diminution du nombre de foci (Dansithong et al., 2005), et sa surexpression conduit à leur augmentation (Osborne & Thornton, 2008).

Au-delà de son implication dans la formation des foci, la perte de fonction de MBNL est un phénomène central dans la mise en place du mécanisme pathologique de la DM. En effet, les souris modèles déplétées pour *Mbnl1* de manière ubiquitaire reproduisent les altérations plurisystémiques de la DM, incluant la myotonie, des cataractes et les défauts d'épissage alternatif rencontrés dans cette *spliceopathy* (Kanadia, Johnstone, et al., 2003). A contrario, la surexpression de MBNL1 annule les altérations dues aux CUGexp dans le modèle HSA^{LR} (Kanadia et al., 2006). Quant à la perte globale de MBNL2, elle induit l'apparition de troubles exclusivement neurologiques tels que des troubles du sommeil paradoxal et un déficit de la mémoire spatiale (Charizanis et al., 2012). La perte simultanée des protéines MBNL1 et MBNL2, cette dernière à l'état hétérozygote (le double KO homozygote étant létal à l'état embryonnaire) aggrave les défauts décrits suite à la perte de MBNL1 uniquement. Ces souris développent une atrophie musculaire associée à des altérations supplémentaires de l'épissage alternatif par rapport aux souris déplétées pour MBNL1 uniquement (Goodwin et al., 2015; Lee et al., 2013).

Ces défauts de l'épissage alternatif sont encore aggravés par une perte simultanée des 3 protéines MBNL1, MBNL2 et MBNL3 dans le muscle squelettique. Ces souris MBNL triple KO développent ainsi une myopathie comparable aux patients atteints de la forme congénitale de la DM1 (Thomas et al., 2017). Ainsi, les modèles murins de déplétion des protéines MBNL récapitulent les altérations principales de la DM, démontrant l'importance de la perte de fonction de ces protéines dans le mécanisme pathologique de la DM (Du et al., 2010).

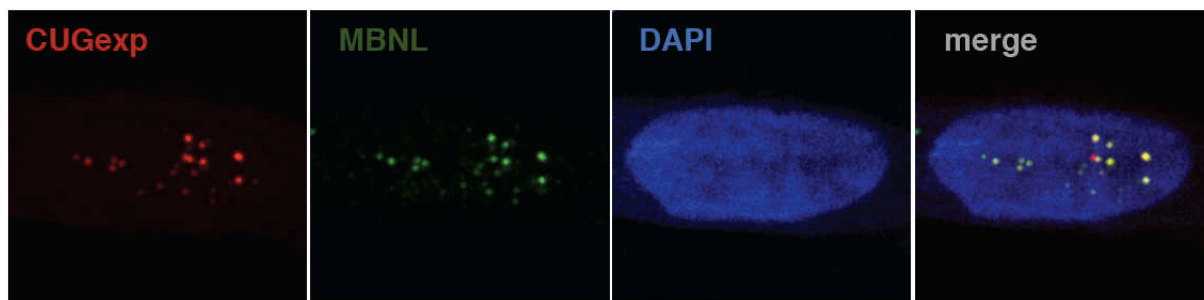


Figure 10 : MBNL est séquestré par les foci ARN dans le noyau des cellules DM

FISH révélant les CUGexp (rouge) combiné à un immunomarquage de MBNL (vert) dans le noyau (bleu) de cellules dérivées de patients DM1.

Dans la DM2 spécifiquement, il a été montré *in vitro* que RBFOX, un autre facteur d'épissage, est en compétition avec MBNL pour la liaison aux répétitions CCUG à l'origine de la pathologie (Sellier et al., 2018). De cette compétition résulte une séquestration amoindrie de MBNL dans les foci qui pourrait expliquer les symptômes moins prononcés des patients atteints de la DM2 par rapport à ceux atteints de la DM1 (Sellier et al., 2018).

1.4.3.2 Hyperactivation de CELF

Le potentiel de liaison de CELF1 aux C(C)UGexp a été identifié *in vitro* (Timchenko et al., 1996; Timchenko et al., 2001). Cependant, CELF1 ne colocalise pas avec les foci CUG dans des fibroblastes dérivés de patients DM (Fardaei et al., 2002; Faustino & Cooper, 2005; Timchenko, 1999; Teplova et al., 2010). A l'inverse, CELF1 est surexprimé dans les muscles squelettiques et cardiaques DM1 (Kalsotra et al., 2008; Philips et al., 1998) ainsi que dans certains modèles cellulaires et murins exprimant des CUGexp (Kuyumcu-Martinez et al., 2007; Timchenko et al., 2001; Roberts et al., 1997; Savkur et al., 2001). De plus, la surexpression de CELF1 dans des souris modèles suffit à reproduire en partie la myopathie (fonte musculaire, défauts de conduction cardiaque), *spliceopathy* de la DM ainsi qu'une mortalité précoce (Ho, Bundman, et al., 2005; Koshelev et al., 2010; Timchenko et al., 2004; Ward et al., 2010).

La surexpression de CELF1 est due à une hyperphosphorylation et stabilisation de la protéine par la voie de la protéine kinase C (PKC) (Kuyumcu-Martinez et al., 2007). Ainsi, une inhibition de la voie PKC a réduit la quantité de protéines CELF1 et amélioré le phénotype de souris modèles présentant 960 CUGexp dans un transgène *DMPK* humain (Wang et al., 2009; Kuyumcu-Martinez et al., 2007; Morriss et al., 2018). Cependant, le mécanisme par lequel les expansions de triplets CTG activent la voie PKC est inconnu à ce jour. D'autres régulateurs de

CELF1 incluent la glycogène kinase synthase 3 beta (GSK3 β), la kinase cycline-dépendante 4 (CDK4)/Cycline D3 et la calcineurine (Jones et al., 2012; Ravel-Chapuis et al., 2018). 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 dérivées de patients DM2 (Pelletier et al., 2009; Lin et al., 2006).

1.4.3.3 Autres protéines dérégulées

MBNL et CELF1 ne sont pas les seules protéines liées au métabolisme des ARNs impactées par les C(C)UGexp dans la DM. En effet, hnRNP h fait partie d'un complexe protéique régulant l'épissage alternatif. Son expression est augmentée dans des cellules musculaires DM1 et pourrait jouer un rôle dans la *spliceopathy* de la DM1 (Kim et al., 2005; Paul et al., 2011). Pareillement, STAUFEN1 est surexprimée dans le muscle DM1 et de modèles DM1. STAUFEN1 régule le transport des ARNm et semble être impliquée dans l'épissage alternatif de certains transcrits dérégulés de la DM (Bondy-Chorney et al., 2016) ainsi que l'export des ARN *DMPK* mutés non associés aux foci en dehors du noyau. Tout comme hnRNPh, on ne sait pas si STAUFEN1 est séquestrée par les foci (Ravel-Chapuis et al., 2012).

DEAD box protein 5 (DDX5) et DEAD box protein 6 (DDX6) sont des hélicases ARN capables de séparer les structures en épingles à cheveux des C(C)UGexp, les rendant plus susceptibles à la dégradation. Leur expression est réduite dans la DM1 mais leur surexpression dans des cellules DM1 a donné des résultats prometteurs, réduisant le nombre de foci et corrigeant quelques épissages altérés dans la pathologie (Jones et al., 2015; Pettersson et al., 2014). En revanche, l'action de DDX5 sur les répétitions CUG exacerbe leur liaison à MBNL1 *in vitro* (Laurent et al., 2012). Ainsi, à la fois la diminution et l'augmentation de l'activité de DDX5 dans le cadre de la DM pourrait participer à la mise en place du mécanisme pathologique de la DM.

Enfin, dans la DM2, les protéines de liaison à l'ARN rbFOX, régulant l'épissage alternatif, se lient directement aux CCUGexp mais ne sont pas séquestrées dans les foci. rbFOX1 et rbFOX2 rivalisent avec MBNL pour la liaison aux CCUGexp et la surexpression de rbFOX1 libère une partie des protéines MBNL, conduisant à une amélioration des défauts d'épissage. rbFOX pourrait ainsi participer aux mécanismes responsables de la pathogénicité réduite de la DM2 par rapport à la DM1 (Sellier et al., 2018).

1.5 Mécanismes physiopathologiques dans la DM

L'expansion du nombre de répétitions C(C)TG altère le fonctionnement d'autres voies métaboliques qui sont à l'origine du développement de la DM (figure 11). Le mécanisme principal décrit est la séquestration des protéines MBNL et l'hyperactivation de CELF1 qui causent des défauts de l'épissage alternatif dans les multiples tissus affectés par la pathologie. Par ailleurs, les C(C)UG induisent un dérèglement de certains facteurs de transcription, de la traduction, de la stabilité des ARNm et du fonctionnement des miARN. Les ARNm mutés *DMPK* et *CNBP* sont également concernés par la transcription antisens et la traduction sans ATG dont les conséquences restent à déterminer précisément.

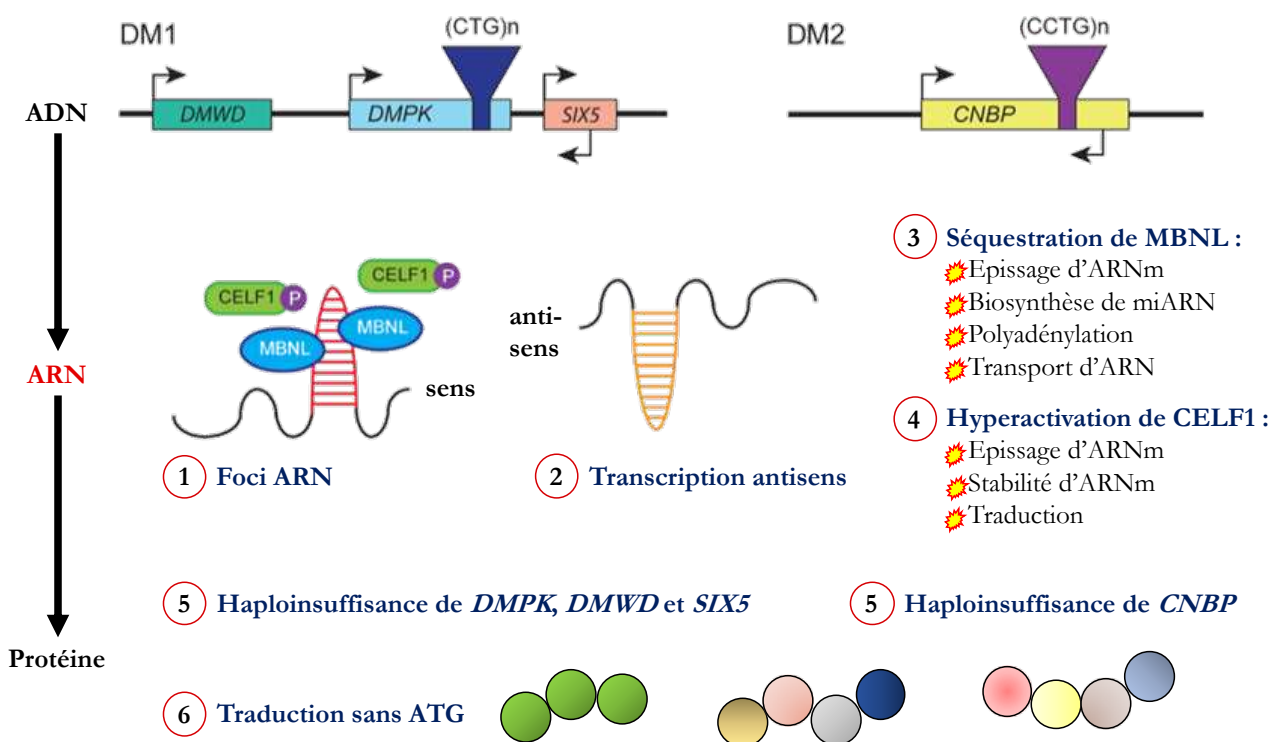


Figure 11 : Mécanisme pathologiques principaux de la DM




(adapté de André, Ausems, Wansink, & Wieringa, 2018). Locus DM1 et DM2 avec les gènes *DMPK* et *CNBP* présentant des répétitions CTG ou CCTG dans leur région 3'UTR ou intronique respectivement. Les transcrits mutés *DMPK* et *CNBP* s'accumulent dans le noyau des cellules et ne sont pas exportés vers le cytoplasme. Ces foci ARN séquestrent les protéines MBNL, nuisant à leur fonction. CELF1, ayant un rôle antagoniste de MBNL, est hyperphosphorylé et exacerbe notamment les défauts d'épissage dus à la perte de MBNL. Les protéines des loci DM1 et DM2 ne sont traduites correctement que par l'allèle sauvage. Les C(C)TGexp sont partiellement traduits en polypeptides qui s'accumulent dans le noyau.

1.5.1 Dérégulation de l'épissage alternatif dans la DM

La DM est considérée comme une *spliceopathy*, c'est-à-dire qu'une majeure partie de son mécanisme pathologique est dû à des altérations de l'épissage alternatif, lequel est un processus cellulaire essentiel par lequel les introns d'un pre-ARNm sont excisés et les exons joints les uns aux autres, formant un ARNm mature pour la traduction en protéine. Par rapport à l'épissage constitutif, l'épissage alternatif ajoute à ces étapes l'excision de certains exons, démultipliant le nombre de protéines pouvant être traduites à partir d'un seul gène (pour revue : Wilkinson, Charenton, & Nagai, 2020).

Dans le cas de la DM, la dérégulation de l'épissage alternatif est due à un effet trans dominant des expansions CUGexp et CCUGexp situé sur un seul allèle des gènes *DMPK* et *ZNF9* respectivement, sur des facteurs d'épissage alternatif (MBNL et CELF notamment). Plus précisément, les facteurs d'épissage MBNL et CELF, dérégulés par les C(C)UGexp contrôlent le basculement entre les isoformes fœtales et adultes au cours du développement. La perte de fonction de MBNL et/ou l'hyperphosphorylation de CELF1 induit une expression d'isoforme fœtale de nombreux transcrits dans un tissu adulte. Plus d'une centaine d'événements d'épissage alternatif altéré ont été décrits dans la DM et certains ont été directement reliés à certains symptômes caractéristiques de la DM (Tableau 1).

Tableau 1 : Événements d'épissage alternatif altérés et associés aux symptômes de la DM1

Organe	Symptôme	Gène	Exon(s)	Évènement	Fonction de la protéine	Conséquence moléculaire	Référence(s)
	Faiblesse musculaire	BIN1	11	Exclusion	Régulation de la biogenèse des tubules transverses	Tubules transverses anormaux	Fugier et al., 2011
		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 Ca ²⁺	Tang et al., 2012
		SERCA1	22	Exclusion	Pompe sarcoplasmique permettant le repompage du Ca ²⁺	Dérégulation de l'homéostasie du Ca ²⁺ dans le réticulum sarcoplasmique.	Kimura et al., 2005
		RYR1	70	Exclusion	Canal calcique essentiel pour la libération du Ca ²⁺ dans le réticulum sarcoplasmique	Couplage excitation/contraction perturbé	
	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
	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
	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 régulatrice de MBNL dont 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
		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
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
	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 2004 Goodwin et al., 2015
	Mémoire défaillante	NMDAR1	5	Inclusion	Récepteur ionotrope à la synapse neuronale impliqué dans la plasticité synaptique	Délocalisation des dendrites vers le soma	Jiang et al., 2004

1.5.2 Autres mécanismes physiopathologiques de la DM

Aux défauts d'épissage alternatifs s'ajoutent d'autres mécanismes moléculaires qui témoignent de la complexité et de la variété des atteintes de la DM.

1.5.2.1 Dérégulation des facteurs de transcription

Au-delà de la *spliceopathy* caractérisant la DM, l'expression de nombreux gènes dans différents tissus a été décrite comme altérée dans des biopsies de patients et des modèles de la pathologie (Botta et al., 2007; Du et al., 2010; Wang et al., 2012; Otero et al., 2021). De plus, des facteurs de transcription sont dérégulés dans la DM, que ce soit dans leur distribution et accessibilité comme la specificity protein 1 (SP1), le récepteur gamma à l'acide rétinoïque (RAR γ) (Ebraldze et al., 2004) et la protéine de répression associée à SMRT/HDAC1 (SHARP) dans des cellules musculaires DM1 ou dans leur expression comme NK2 homeobox 5 (NKX2-5), diminuée dans le muscle DM1 et impliquée dans la conduction cardiaque et la régénération musculaire (Yadava et al., 2008).

1.5.2.2 Traduction, localisation et stabilité des ARNm

La traduction, la localisation et la stabilité des ARN sont également dérégulées dans la DM. En effet, non seulement les protéines MBNL et CELF se lient dans les régions introniques et exoniques des ARNm régulant l'épissage alternatif, mais des expériences de cross-linking immunoprecipitation (CLIP) ont révélé des sites de liaison de ces protéines dans la partie 3'UTR de certains ARN, suggérant un rôle supplémentaire dans leur régulation (Wang et al., 2012). Ainsi, dans les neurones, MBNL1 et MBNL2 contrôlent l'épissage alternatif d'exons terminaux alternatifs (ALE) influençant la localisation de transcrits vers le soma ou les neurites (Taliaferro et al., 2016). Le 3'UTR est souvent le lieu contrôlant la localisation de l'ARN (Andreassi & Riccio, 2009), MBNL pourrait donc être impliqué dans la localisation d'un grand nombre de transcrits.

De plus, MBNL pourrait également affecter la stabilité des ARNm, suggérant ainsi que l'altération de l'expression de certains gènes ne serait pas liées à leur transcription mais à une modification de la stabilité de leur ARNm (Wang et al., 2012, 2015; Masuda et al., 2012).

De la même manière que pour l'épissage alternatif, le choix du site de polyadénylation est perturbé dans la DM, conduisant à l'expression d'isoformes fœtales (Wang et al., 2012). Ces défauts

ont été reliés 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).

Chez les patients DM, la stabilité augmentée de CELF1 conduit à des anomalies de la traduction (Timchenko, 1999, 2002; Timchenko et al., 2004). Il interagit avec le facteur eucaryote d'initiation 2 (eIF2), lui-même impliqué dans le recrutement du complexe d'initiation à la traduction pour l'ARNm cible (Dasgupta & Ladd, 2012). Cette interaction dépend de l'état de phosphorylation de CELF1, qui est altéré dans la DM1 et la DM2, provoquant l'agrégation de complexes CELF1-eIF2 dans des granules de stress (Vlasova-St. Louis et al., 2013). Ce faisant, l'hyperphosphorylation de CELF1 perturbe la traduction de ces ARNm cibles, impliqués dans la différenciation des cellules musculaires (Barreau et al., 2006). D'autre part, CELF1, en se liant aux ARN contenant une séquence riche en G-U dans leur 3'UTR, peut modifier leur expression en réduisant leur demi-vie (Wang et al., 2015; Vlasova et al., 2008). Parmi ces ARN, on retrouve des transcrits codant pour des protéines impliquées dans l'homéostasie musculaire (Timchenko, 2013; Rattenbacher et al., 2010).

1.5.2.3 Dérégulation des miARN

Les miARNs sont de petits ARNs non codants qui régulent de manière post-transcriptionnelle l'expression de transcrits cibles. Tel que cela a été décrit dans différentes myopathies (Eisenberg et al., 2009), l'expression de miARNs tels que miR-1, miR-7, miR-10 et miR-29 dans la DM1 et miR221-3p, miR34c-5p et miR125b-5p dans la DM2, semble altérée dans des cellules musculaires dérivées de patients DM (Fernandez-Costa et al., 2013; Greco et al., 2012; Perbellini et al., 2011). Plus particulièrement, dans le cœur de patients DM1, plus d'une vingtaine de miARNs ont une expression diminuée, associée à des arythmies et de la fibrose, tel que cela est décrit dans la DM (Kalsotra et al., 2014). Parmi ces miARNs, miR-1 a été relié à des défauts de conduction cardiaque, sa diminution induisant une augmentation de l'expression de la sous-unité alpha 1 du canal calcique voltage-dépendant (CACNA1C) et de la protéine alpha-1 des jonctions communicantes (GJA1) (Rau 2011). Deux mécanismes ont été proposés pour expliquer le défaut de maturation de miR-1 dans un contexte DM. Le premier l'impute à la déplétion de MBNL1, qui, dans un contexte sain, peut se lier au pre-miR-1, le rendant disponible pour son activation par le complexe dicer, une ribonucléase responsable de la biogenèse des miARNs et siARNs.

Des sites de liaison ont également été identifiés dans d'autres pre-miARNs, suggérant un rôle similaire de MBNL1 pour d'autres cibles (Rau et al., 2011). Le second mécanisme impute la

dérégulation de miR-1, et de nombreux autres miARNs, à la diminution de la protéine myocyte enhancer factor-2 (MEF2) (Kalsotra et al., 2014).

Dans des cellules musculaires dérivées de patients DM1, il a été montré que la diminution de miR-7 induit des défauts de fusion des myoblastes en myotubes en promouvant le processus d'autophagie, un processus de recyclage des composants cellulaires, permettant un apport énergétique nécessaire à l'homéostasie tissulaire. Ce défaut ayant pu être corrigé par une surexpression de miR-7, il est intéressant de noter que cette régulation ne semble pas dépendante de MBNL (Sabater-Arcis et al., 2020). En effet, l'autophagie a été montrée comme hyperactivée dans des cellules musculaires dérivées de patients DM1 (Loro et al., 2010).

1.5.2.4 ARN interférence

Il a été suggéré que les CUGexp, structurés en épingle à cheveux, puissent être clivés, de la même manière que les ARNs double-brin à l'origine des shARN, par Dicer en petits ARN CUG se comportant comme de petits ARNs interférant et régulant négativement l'expression de divers transcrits (Krol et al., 2007). Cependant, les ARNs mutés *DMPK* étant séquestrés dans le noyau et l'activité de maturation des pre-miARNs et pre-siARNs de Dicer étant exclusivement cytoplasmique, ce processus est peu probable (White et al., 2014). Ce processus d'ARN interférence n'a été démontré que dans un modèle DM1 invertébré avec *C.elegans* (Qawasmî et al., 2019), aucune corrélation n'ayant été décrite dans d'autres modèles et chez des patients.

1.5.2.5 L'expression d'un ARN antisens

La transcription étant bidirectionnelle, des ARNs sont aussi produits à partir du brin complémentaire de celui à partir duquel est produit tel ou tel gène d'intérêt. Leur régulation peut être dépendante ou indépendante du gène auquel ils sont associés. Souvent, ces ARNs ont un effet régulateur sur le gène, que ce soit au niveau transcriptionnel, traductionnel ou encore de la dégradation de l'ARNm (Pelechano & Steinmetz, 2013). Ce phénomène a été confirmé également pour les séquences présentant des CTGexp (Batra et al., 2010; Cho et al., 2005).

A l'image des ARNs *DMPK* mutés, l'ARN antisens *DMPK* original s'étend sur plus de 6kb et comprend plusieurs sites d'initiation de la transcription. Il est également soumis à l'épissage alternatif, produisant différents ARNm avec ou sans répétitions CAG (Cho et al., 2005). Non seulement la variété de transcrits est augmentée dans la DM1 à cause des CTGexp, mais la quantité d'ARNs antisens produite semble plus élevée que dans la population générale, bien qu'elle demeure

négligeable dans de nombreux tissus (Gudde, van Heeringen, et al., 2017). Peu de choses sont connues sur l'effet de ces transcrits antisens. Il a été supposé qu'ils pourraient intervenir dans la formation d'agrégats toxiques de ribonucléoprotéines ou dans la traduction sans ATG (Gudde, van Kessel, et al., 2017). *In vitro*, il semble que ces transcrits antisens soient impliqués dans l'instabilité des CTGexp, augmentant le taux d'expansions ou contractions entre générations par rapport aux cellules sans expansions (Nakamori, Pearson, et al., 2011).

1.5.2.6 Traduction sans ATG

Il a été montré qu'en plus de toutes les anomalies que suscitent les expansions de répétitions CTG, ils sont également sujet à une forme particulière de traduction qui ne nécessite pas de codon initiateur ATG. La DM1 (Zu et al., 2011) et la DM2 (Zu et al., 2017) sont toutes deux concernées par ce phénomène, produisant des tripeptides de polyglutamines dans des cellules musculaires et du tissu musculaire 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. Quant à la DM1, des tripeptides de polyglutamines ont été détectés dans des cellules musculaires et du tissu musculaire de patients (Zu et al., 2011) mais une étude plus récente n'a pas reproduit ce résultat dans des cellules dérivées de 10 patients DM1 (Koehorst et al., 2021). Il est possible que les outils utilisés ne soient pas assez sensibles pour détecter ces peptides en faible quantité.

Ces produits anormaux de traduction ayant été caractérisés dans des tissus altérés dans la DM, il est possible qu'ils jouent un rôle dans le mécanisme de la pathologie. Leur présence a en effet été reliée au phénomène d'apoptose mais le mécanisme sous-jacent reste inconnu. Enfin, en se basant sur les séquences des brins sens et antisens des gènes *DMPK* et *CNBP*, il est possible que d'autres polypeptides soient produits dans la DM mais ceux-ci n'ont pas encore été découverts.

1.6 Modèles de la DM

Durant les vingt dernières années, de nombreux modèles *in vitro* et *in vivo* ont été générés pour décrire le mécanisme pathologique de la DM. La DM faisant partie des maladies les plus hétérogènes et complexes, aucun modèle ne récapitule de manière idéale le mécanisme pathologique moléculaire et ses implications. Cependant, indépendamment et de manière groupée, les modèles DM ont permis d'identifier et de caractériser différentes voies moléculaires impliquées

dans le développement de la pathologie. Ils sont également régulièrement utilisés pour le test de stratégies thérapeutiques.

Caenorhabditis elegans et le poisson zèbre (*Danio rerio*) par exemple, bien que phylogénétiquement éloignés de l'homme, ont permis d'étoffer certains aspects de la DM (Machuca-Tzili et al., 2011; Spilker et al., 2012). L'expression de transgènes codant pour des CUGexp a permis l'apparition de foci associée à une myopathie chez ces espèces, confirmant l'importance de ce mécanisme pathologique fondateur de la DM (deLorimier et al., 2014; K. Y. Chen et al., 2007; Wang et al., 2011; Todd et al., 2014). En plus de ces défauts, *Drosophila melanogaster* récapitule également la séquestration des protéines Muscleblind (Mbl), associée à une altération de l'épissage alternatif (Garcia-Lopez et al., 2008; Picchio et al., 2013; Yu & Bonini, 2011).

Afin d'étudier le mécanisme pathologique de la DM chez les vertébrés et dans un contexte plus proche de l'homme, de nombreux modèles murins ont été générés. Ils miment les mécanismes centraux de la pathologie : l'expansion de répétitions CTG (tableau 2) ainsi que la perte de fonction de MBNL ou la surexpression de CELF1 (tableau 3). Parmi ces modèles, je développerai plus précisément le modèle de souris DMSXL ainsi que les souris déficientes pour Mbnl.

1.6.1 Modèle DMSXL : expression d'un grand nombre de répétitions CTG dans le gène *DMPK* humain

La souris DMSKL est porteuse de répétitions CTG élargies dans leur contexte naturel. Elle est originelle d'une insertion de 45kb de séquence génomique humaine comprenant le gène DMK, ne comprenant que 300 répétitions (Seznec et al., 2001). En raison de l'instabilité intergénérationnelle, ce nombre a augmenté au cours du temps et atteint aujourd'hui plus de 1500 répétitions (Gomes-Pereira et al., 2001, 2007).

Le transgène, sous contrôle du promoteur *DMPK* humain a une expression presque ubiquitaire, quoiqu'un peu faible par rapport à l'homme. Celle-ci est notamment assez faible dans le muscle squelettique mais elle est élevée dans le cerveau (Vignaud et al., 2010). Les souris DMSXL présentent un phénotype sévère avec un retard de croissance, des déficiences neurologiques, une atrophie musculaire bien que les défauts d'épissage restent légers (Hernández-Hernández et al., 2013; Huguet et al., 2012; Vignaud et al., 2010). En raison de l'expression ubiquitaire du transgène muté, les souris DMSXL constituent un bon modèle pour étudier les défauts plurisystémiques de la DM1 et de sa forme congénitale.

1.6.2 Modèles de souris invalidées pour Mbnl

1.6.2.1 Perte de Mbnl1 de manière ubiquitaire

La première souris déplétée pour Mbnl1 de manière ubiquitaire a été réalisée par délétion de l'exon 3 du gène *Mbnl1* chez la souris (Kanadia, Johnstone, et al., 2003). Il a en effet été supposé que la perte de cet exon éliminerait toute isoforme capable de se lier aux répétitions CUG, reproduisant la perte de fonction induite par la séquestration de MBNL1 dans la DM (Miller et al., 2000).

Ces souris présentent de nombreuses altérations similaires aux patients DM : myotonie, anomalies de l'épissage alternatif, myopathie musculaire et cardiaque ainsi que des cataractes (Kanadia, Johnstone, et al., 2003). Ainsi, cette étude a démontré le rôle central qu'occupe MBNL1 dans le mécanisme pathologique de la DM. Elle a notamment permis d'identifier MBNL1 comme le régulateur de l'épissage alternatif de *CLCN1*, dérégulé dans la DM et causant la myotonie (Charlet-B. et al., 2002; Mankodi et al., 2002).

Plus récemment, un autre modèle a été généré, également en déléant l'exon 3 du gène *Mbnl1* qui contient le codon ATG d'initiation de la traduction (Dixon et al., 2015). Ces souris présentent des anomalies cardiaques progressives, démontrant le rôle de MBNL1 pour la pathologie cardiaque des patients DM. Enfin le modèle murin invalidé pour *Mbnl1* via la délétion de l'exon 3 a été dérivé dans un autre fond génétique et induit une atteinte plus sévère (Sznajder et al., 2020).

1.6.2.2 dKO Mbnl1/Mbnl2 : déplétion homozygote de Mbnl1 et hétérozygote de Mbnl2

La souris dKO *Mbnl1/Mbnl2* combine la déplétion de *Mbnl1* par excision de l'exon 3 (Kanadia, Johnstone, et al., 2003) à celle de l'exon 2 comprenant l'ATG de *Mbnl2* (Charizanis et al., 2012). La perte conjointe de *Mbnl1* et *Mbnl2* exacerbe les défauts musculaires présents dans la souris KO-*Mbnl1* (Lee et al., 2013). En effet, ces souris développent un phénotype plus sévère avec une mortalité précoce, une atrophie et une faiblesse musculaire et des altérations plus vastes de l'épissage alternatif. *Mbnl2* étant très peu exprimé dans le muscle squelettique, cette souris démontre pour la première fois la compensation de la perte de *Mbnl1* par la surexpression de *Mbnl2*. Cette étude, ainsi que celle démontrant l'importance de MBNL2 dans le cerveau (Charizanis et al., 2012), remettent donc en cause le rôle unique de MBNL1 dans le développement du mécanisme pathologique de la DM. Ce principe de compensation entre *Mbnl1* et *Mbnl2* a donné

lieu à de nombreux modèles avec une approche tissu-spécifique, la perte de ces deux protéines étant létale au stade embryonnaire.

1.6.2.3 KO Mbn1/Myo-Mbn2 : déplétion homozygote de Mbn1 et muscle spécifique de Mbn2

Dans la même étude, le double KO Mbn1 et Mbn2 spécifique du muscle squelettique présente une myopathie encore plus altérée que celle des souris avec une déplétion globale mais hétérozygote de Mbn2 (Lee et al., 2013). Ce modèle a été généré en croisant des souris avec une expression de la Cre recombinase spécifique dans le muscle squelettique sous contrôle du promoteur de la myogénine (Li et al., 2005) avec des souris dont l'exon 2 de *Mbn2* contenant l'ATG d'initiation de la traduction est entouré de sites lox (Charizanis et al., 2012).

Ces souris développent ainsi une faiblesse musculaire décuplée associée à des anomalies musculaires histologiques sévères et un dérèglement encore plus marqué de l'épissage alternatif de transcrits tels que *BIN1* et *CACNA1S*, le rapprochant d'un profil d'une forme congénitale de la DM1 (Fugier et al., 2011; Lee et al., 2013; Tang et al., 2012).

1.6.2.4 KO Mbn1/Myog-Mbn2/Myog-Mbn3 : déplétion homozygote de Mbn1 et muscle spécifique de Mbn2 et Mbn3

Dans la même démarche que le modèle précédent, le modèle triple KO Mbn1, Mbn2 et Mbn3 spécifique au muscle squelettique (Thomas et al., 2017) a été généré par expression de la Cre recombinase sous contrôle du promoteur de la myogénine chez des souris loxées autour de l'exon 2 de *Mbn2* (Charizanis et al., 2012) et l'exon 2 de *Mbn3* qui contient un ATG d'initiation de la traduction (Poulos et al., 2013). Les souris triple KO présentent des défauts similaires à ceux décrits dans les souris double KO avec cependant des altérations de l'épissage alternatif plus étendues, les rapprochant des altérations des patients avec une forme congénitale de la DM1 (Thomas et al., 2017). Les différences entre ces deux modèles restent cependant discrètes, montrant les rôles prépondérants de MBNL1 et MBNL2 par rapport à MBNL3 dans le muscle squelettique.

1.6.2.5 KO Mbnl1/Nestine-Mbnl2 : déplétion homozygote de Mbnl1 et neurone spécifique de Mbnl2

Les souris déplétées de manière ubiquitaire pour Mbnl1 (Suenaga et al., 2012) ou Mbnl2 (Charizanis et al., 2012) développent des défauts de l'épissage alternatif dans le cerveau, montrant l'importance de ces deux protéines, particulièrement Mbnl2, pour le développement du système nerveux central. Afin de tester si, de la même manière que dans le muscle squelettique (Lee et al., 2013), la perte simultanée de Mbnl1 et Mbnl2 dans le cerveau aggrave les modèles simple KO, les souris KO Mbnl1 et loxées dans *Mbnl2* ont été croisées avec des souris exprimant la Cre recombinase sous contrôle du promoteur neurone spécifique de la nestine (Goodwin et al., 2015).

La perte simultanée de Mbnl1 et Mbnl2 dans le cerveau provoque des défauts musculaires et moteurs chez les souris, suggérant que la perte de MBNL dans le SNC pourrait participer au phénotype musculaire de la DM. De plus, les souris KO Mbnl1/Nestine-Mbnl2 développent des altérations de l'épissage alternatif aggravées ou supplémentaires par rapport aux souris KO Mbnl2 dans le cerveau, les rapprochant d'un profil DM (Goodwin et al., 2015). Ainsi, l'épissage de *MAPT*, altéré dans la DM (Sergeant et al., 2001) et partiellement dans les souris KO Mbnl2 (Charizanis et al., 2012), est fortement dérégulé dans la souris KO Mbnl1/Nestine-Mbnl2 (Goodwin et al., 2015). Dans le cerveau, MBNL1 et MBNL2, de manière prépondérante, sont donc impliqués dans le mécanisme pathologique de la DM.

1.6.2.6 KO Mbnl1/Myh6-Mbnl2 : déplétion homozygote de Mbnl1 et muscle cardiaque spécifique de Mbnl2

Le dernier modèle de codéplétion des protéines Mbnl1 et Mbnl2 utilise une expression de la Cre recombinase spécifiquement dans le cœur par le promoteur de la chaîne lourde de la myosine 6 (*MYH6*) pour déléter Mbnl2 (Lee et al., 2022). Ces souris développent un délai de conduction cardiaque et des tachyarrhythmies ventriculaires par rapport aux souris KO Mbnl1. Ces défauts sont associés à des morts subites cardiaques et à une réduction de l'espérance de vie. Enfin, la perte conjointe de Mbnl1 et Mbnl2 dans le cœur provoque des aggravations d'altérations de l'épissage alternatif révélées dans les souris KO Mbnl1 tels que *Ryr2* et la protéine 4 interagissant avec la kinase c-jun-amino-terminale (*Spag9*) (Lee et al., 2022). La perte de MBNL1 et MBNL2 dans le cœur pourrait donc participer au phénomène de mort subite cardiaque des patients DM, la deuxième cause de mortalité chez ces individus (Mathieu et al., 1999).

Tableau 2 : Modèles murins avec répétitions CTG.

Modèles de souris avec répétitions 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 Mbnl, épissage altéré, myotonie, myopathie, noyaux centraux	Expression cantonnée au muscle squelettique au stade post-développemental et très élevée par rapport au gène Dmpk. Pas de faiblesse ou d'atrophie musculaire. Pas d'effet sur CELF.	A démontré le gain de fonction toxique de l'ARN de la DM1. Très utilisé pour le test de molécules 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, myopathy, 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 Mbnl1 et hyperactivation de Celf1, épissage altéré	Répétitions interrompues, modèle spécifique au cœur avec une mortalité précoce	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 inducible d'un transcrit portant 5-200 répétitions CTG	Myotonie, myopathie, défauts de conduction cardiaque, épissage altéré	Pas de faiblesse musculaire ni de foci. La souris avec 5 répétitions a une haute mortalité précoce 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/CaMK II-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 Mbnl1	Répétitions interrompues	Modèle DM1 spécifique au cerveau	Wang et al, 2017

Tableau 3 : Modèles murins d'expression de MBNL et CELF1.

Modèles de souris <i>Knock-Out (KO)</i> ou avec surexpression					
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 de défauts, contradictions entre les études	La perte de fonction de DMPK n'explique pas la pathophysiologie de la DM1	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 de celle caractéristique de la DM1, dosage différent avec les patients	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
KO Cnbp	Haploinsuffisance de Cnbp dans la DM2	Myotonie, épissage altéré, cataracte comparable aux patients, myopathie, noyaux centraux	CNBP n'est pas indistinctivement réduit chez tous les patients, ne récapitule pas certains défauts majeurs d'épissage alternatifs	La perte de fonction de CNBP peut contribuer aux symptômes de la DM2	Chen et al., 2003 Margolis et al., 2006 Chen et al., 2007 Raheem et al., 2010
tKO hétérozygote Dmpk/Six5/Mbnl1	Haploinsuffisance de Dmpk, Six5 et Dmwd et réduction de Mbnl1 dans la DM1	Mortalité précoce, atrophie et faiblesse musculaire, myotonie, défauts histologiques	On ne connaît pas la part de la perte de Mbnl1 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/Mbnl1/Dmwd		Mortalité précoce plus élevée, déformation cardiaque, myopathie du diaphragme, quelques noyaux centraux, tâches oculaires, jonctions neuromusculaires immatures			
KO Mbnl1	Perte de fonction de Mbnl1	Myotonie, épissage altéré, cataracte comparable aux patients, myopathie musculaire et cardiaque, noyaux centraux	Pas de faiblesse musculaire, CELF1 pas altéré	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 centraux, 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 Mbnl2	Perte de fonction de Mbnl2	Epissage d'ARN altérés dans le cerveau, défauts de mémoire et de sommeil	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 Mbnl3	Perte de fonction de Mbnl3	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 Mbnl1/Mbnl2 hétérozygote	Perte de fonction constitutive de Mbnl1 et réduction de Mbnl2	Retard de croissance, Myotonie, faiblesse et atrophie musculaires, épissage fortement altéré, noyaux centraux, bloc cardiaque, Jonction neuromusculaire affectée	Haute mortalité, Perte de fonction de Mbnl2 n'est pas totale car létale au stade embryonnaire	La perte de fonction de MBNL1 et MBNL2 aggrave celle limitée à MBNL1, reproduisant des défauts plus proches de la forme congénitale de la DM1	Lee et al., 2013.
dKO Mbnl1/Mbnl2 Myo-Cre	Perte de fonction constitutive de Mbnl1 et spécifique au muscle de Mbnl2	Cyphose, Myotonie, forte faiblesse et atrophie musculaires, épissage fortement altéré, noyaux exclusivement centraux	Haute 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 Mbnl1/Mbnl2 hétérozygote	Perte de fonction constitutive de Mbnl1 et réduction de Mbnl2	Non décrit, le modèle a été utilisé uniquement au niveau transcriptomique	Perte de fonction de Mbnl2 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 Mbnl1/Mbnl2 Nestine-Cre	Perte de fonction constitutive de Mbnl1 et spécifique au SNC de Mbnl2	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 Mbnl1/Mbnl2 Myh6-Cre	Perte de fonction constitutive de Mbnl1 et spécifique au cœur de Mbnl2	Mortalité précoce, hypertrophie cardiaque, fibrose, tachyarythmies, défauts cardiaques, défauts de conduction cardiaque	Peu de défauts par rapport aux souris KO Mbnl1, 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 Mbnl1/Mbnl2/Mbnl3 Myog-Cre	Perte de fonction constitutive de Mbnl1 et spécifique au muscle de Mbnl2 et Mbnl3	Retard de croissance post-natal, faiblesse et atrophie musculaire, défauts histologiques, problèmes respiratoires, épissage altéré	Haute mortalité, phénotypes limités au muscle squelettique	Modèle plus complet pour mimer la forme congénitale de la DM1	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

1.7 Stratégies thérapeutiques pour la DM1

A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement curatif pour la DM et seules existent des stratégies visant à réduire la douleur et la myotonie ressenties par les patients. Ces traitements mettent en œuvre les connaissances accumulées sur les différents mécanismes pathologiques de la DM et agissent ainsi à différents niveaux. Jusqu'à présent, le développement de thérapies se concentre principalement sur la DM1, l'absence de modèles spécifiques pour la DM2 limitant leur évaluation au stade préclinique (Day & Ranum, 2005a; Margolis et al., 2006). Seulement quelques études ont fait état de petites molécules spécifiques aux répétitions CCUG ou ont examiné l'extinction post-transcriptionnelle de l'allèle mutant *CNBP* (Cheng et al., 2014; Wong et al., 2011; Childs-Disney et al., 2014; Nguyen et al., 2014; Lee et al., 2009).

Pour les raisons décrites ci-dessus, seules les stratégies thérapeutiques liées à la DM1 ont été résumées dans le tableau suivant (Tableau 4). Globalement, la mise au point des thérapies pour la DM1 cible 4 niveaux du mécanisme de la pathologie. Premièrement, éliminer à la source l'effet toxique des expansions de répétition CTG par génie génétique (Dastidar et al., 2022) ou inhibition de la transcription (Reddy et al., 2019), bien que ce dernier ne corrigerait pas le phénomène d'haploinsuffisance de la DM1.

Au niveau du transcrit *DMPK* muté, des stratégies visent à inactiver les expansions de répétitions CUG, en les dégradant (Yadava et al., 2020) ou en les saturant (Klein et al., 2019). CELF et MBNL ayant des rôles prépondérants dans le développement de la DM1, des stratégies ont également pour but de restaurer l'activité de ces protéines (Arandel et al., 2022; Horrigan et al., 2020). Enfin, certaines études se sont focalisées sur des gènes dérégulés en aval de MBNL (Wheeler, Lueck, et al., 2007) ou sur d'autres mécanismes impactés par les répétitions (Sabater-Arcis et al., 2021).

Tableau 4 : Stratégies thérapeutiques pour la DM1.

Stratégies thérapeutiques pour la DM1			
Stratégie	Molécule ou traitement	Limites	Références
Induction de contractions des répétitions	Lumière UV, agents anticancéreux (cisplatine, rayons X, agents alkylants) par modulation des mécanismes de réparation et de réplication de l'ADN, oligonucléotides antisens (ASO)	Manque de spécificité, doses trop élevées	Gomes-Pereira et al., 2004 Hashem et al., 2002 Nakamori et al., 2011
Inhibition de la transcription du gène <i>DMPK</i> muté	Extinction de <i>SUPT4H1</i> (stimulateur transcriptionnel), pentamidine et dérivés (ligand des répétitions), actinomycine D (intercalant de l'ADN), colchicine (inhibiteur de polymérisation des microtubules)	Toxicité, manque de spécificité	Cheng et al., 2015. Coonrod et al., 2013 Siboni et al., 2015. Reddy et al., 2019
Compétition avec MBNL pour la liaison aux répétitions CUG	ASO : réduction du nombre de foci, redistribution de Mbn1, correction d'épissages alternatifs, morpholino oligonucléotides phosphorodiamidate (PMO) avec une sonde CAG conjugués avec des peptides pénétrants, MiniPEG-γ	Faible pénétrance des ASO, dose dépendant du nombre de répétitions donc différente selon le patient	Wheeler et al., 2009 Mulders et al., 2009 Klein et al., 2019 Hsieh et al., 2018
Dégradation des ARNs <i>DMPK</i> mutés	ASO modifiés avec de courtes séquences nucléotidiques (gapmers) (Reconnaissance des transcrits mutés par la voie de dégradation à la Rnase H) : dégradation des transcrits mutés, réduction du nombre de foci, correction d'épissages alternatifs, amélioration de la fatigue, des défauts cardiaques, de la myotonie et de la faiblesse musculaire		Khvorova et al., 2017 Yadava et al., 2020 Jauvin et al., 2017 Wheeler et al., 2012
Augmentation du niveau disponible de MBNL	Drogues anti-inflammatoires (phenylbutazone, ketoprofen), drogues anti-autophagiques (chloroquine), éponges miARN, antagomiRs, histone déacétylase, erythromycine, forme tronquée de MBNL	Ne vise que l'augmentation de MBNL, pas les autres pathomécanismes de la DM1	Bargiela et al., 2019. Chen et al., 2016 Cerro-Herreros et al., 2020 Zhang et al., 2017 Nakamori et al., 2016 Arrandel et al., 2022
Diminution de l'activité de CELF1	Inhibiteurs de la voie PKC, inhibiteur de GSK3β (amélioration de la faiblesse musculaire et de la myotonie) dont le Tideglusib (améliore la survie, la croissance et la fonction musculaire, améliore les symptômes neuromusculaires chez les patients), activateur de la voie AMPK (amélioration de la structure du muscle, de l'épissage, les foci, la myotonie)	Ne vise que la diminution de CELF1, pas les pathomécanismes majeurs de la DM1	Wang et al., 2009 Jones et al., 2012 Horrigan et al., 2020 Ravel-Chapuis et al., 2018
Génie génétique	TALEN, Cas9 désactivée (blacage transcription <i>DMPK</i>), Cas9 visant l'ARN (dégradation des transcrits mutés <i>DMPK</i>), CRISPR-Cas9 (insertion d'une séquence de polyadénylation en amont des répétitions ou excision des répétitions) : dégradation du transcrit muté, amélioration de l'épissage et diminution du nombre de foci	Nécessite une expression constante, pas d'effet au niveau génomique sauf pou l'excision des répétitions	Pinto et al., 2017 Batra et al., 2017 Wang et al., 2018 Dastidar et al., 2022 André et al., 2019

2 La famille de protéines MBNL

La protéine Muscleblind a d'abord été décrite chez la drosophile comme jouant un rôle central dans la différenciation des photorécepteurs et des cellules musculaires (Begemann et al., 1997). Les protéines Muscleblind ont été hautement conservées au cours de l'évolution depuis leur apparition il y a environ 800 millions d'années et sont spécifiques aux métazoaires. De manière générale les invertébrés ne présentent qu'un gène muscleblind alors que les vertébrés possèdent 3 gènes homologues Muscleblind-Like (*MBNL*). De plus, la forte similarité des paralogues *MBNL* suggère une duplication récente du gène ancestral (Begemann et al., 1997; Pascual et al., 2006). Les protéines *MBNL1*, *MBNL2* et *MBNL3* ont depuis conservé de nombreuses similarités mais aussi acquis des fonctions et caractéristiques uniques.

Ce deuxième chapitre décrira les protéines *MBNL*, centrales pour la pathologie de la DM. Ce chapitre comprendra 4 parties. Je présenterai d'abord les trois paralogues *MBNL* : *MBNL1*, *MBNL2* et *MBNL3* (1). Je décrirai ensuite les fonctions individuelles des différents domaines des protéines *MBNL* (2) puis les régulateurs de ces protéines (3). Enfin, je détaillerai les différentes fonctions associées aux protéines *MBNL* (4).

2.1 Trois paralogues : *MBNL1*, *MBNL2* et *MBNL3*

Chez les mammifères, *MBNL1*, *MBNL2* et *MBNL3* sont situés sur les chromosomes 3, 13 et X respectivement. Les 3 gènes ont un haut degré de similarité vis à vis de leur composition exonique, autant en termes de nombre que de taille (Fardaei et al., 2002). Ainsi *MBNL1*, *MBNL2* et *MBNL3* sont constitués de 10, 8 et 11 exons respectivement (Pascual et al., 2006). La composition nucléotidique est également proche entre les 3 paralogues (entre 65 et 73%), *MBNL1* et *MBNL2* étant les plus proches. Les 3 gènes sont soumis à l'épissage alternatif, produisant différentes isoformes qui diffèrent par leur localisation cellulaire, leur capacité de multimérisation, leur capacité de liaison aux ARNs ainsi que leur activité (Edge et al., 2013; Terenzi & Ladd, 2010; Tran et al., 2011) (Figure 12).

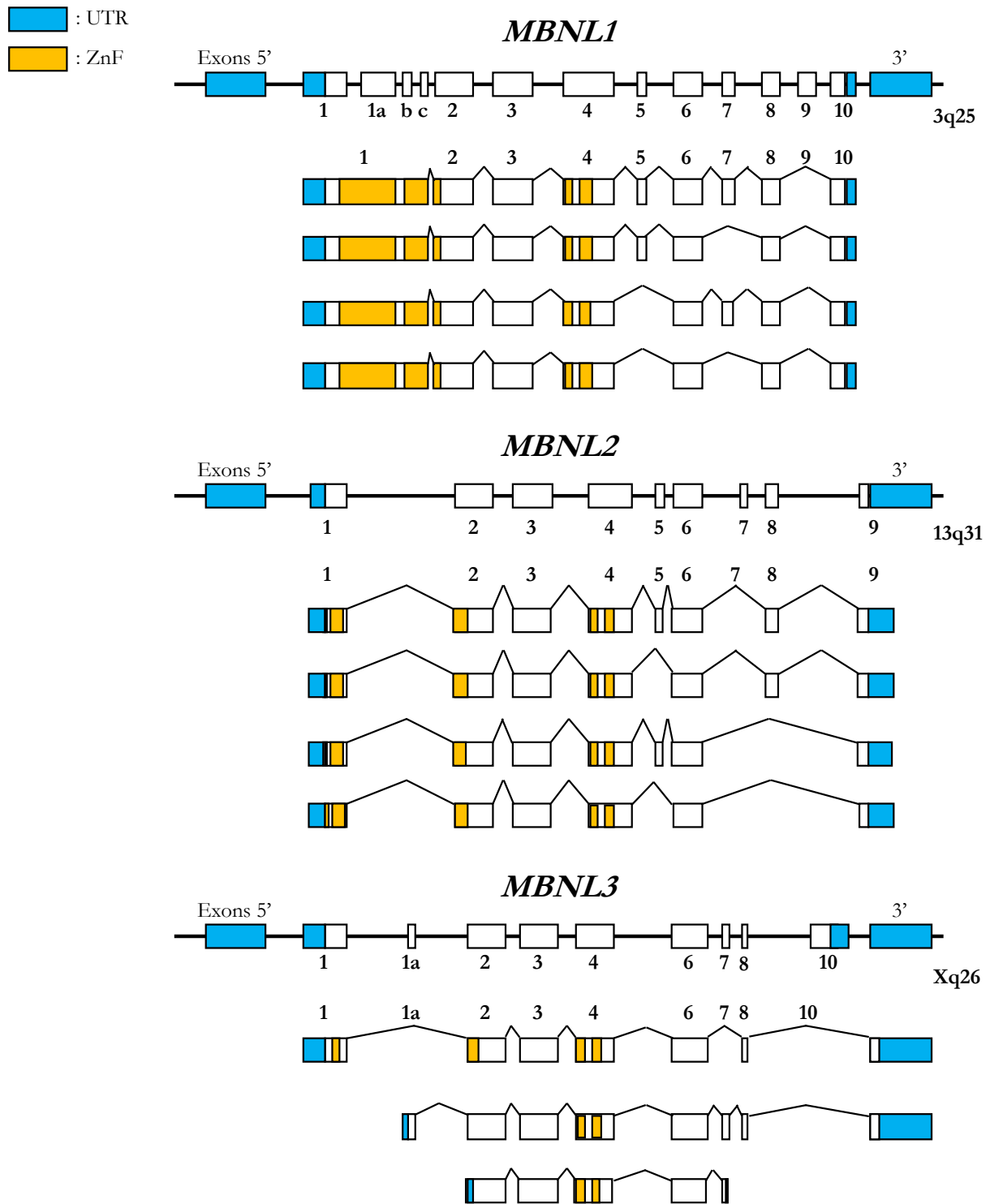


Figure 12 : Gènes *MBNL1*, *MBNL2* et *MBNL3* et transcrits associés chez les vertébrés.

Représentation schématique des gènes *MBNL1*, *MBNL2* et *MBNL3* aux locus 3q25, 13q31 et Xq26 respectivement. Plusieurs exons sont soumis à l'épissage alternatif, donnant différentes isoformes pour chaque gène (isoformes principales représentées) (basé sur Pascual et al., 2006).

MBNL1, *MBNL2* et *MBNL3* diffèrent cependant grandement dans leurs modalités d'expression, autant en termes de tissu que de temporalité (Figure 13).

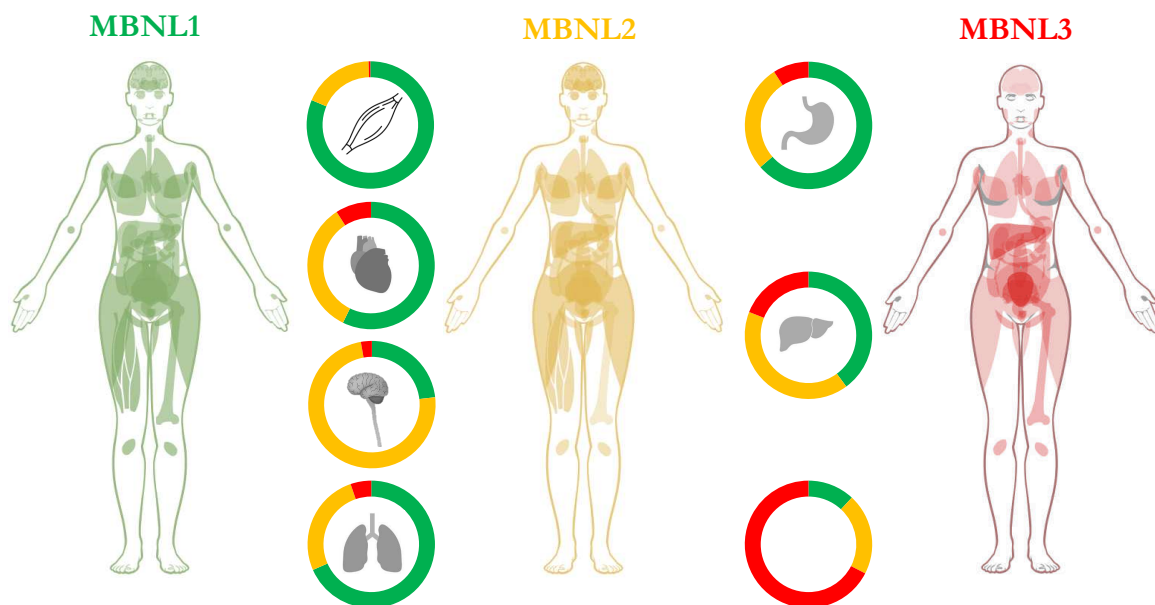


Figure 13 : Niveaux relatifs d'expression des ARNm des gènes MBNL1, MBNL2 et MBNL3 dans différents tissus.

Les couleurs représentent la proportion de chaque gène dans le tissu concerné (à partir de *Human protein atlas*).

Ainsi, *MBNL1* et *MBNL2* sont exprimés de manière ubiquitaire mais *MBNL1* est globalement plus exprimé que *MBNL2* et joue un rôle prépondérant par rapport aux autres paralogues, surtout dans le muscle squelettique et cardiaque. *MBNL2* est cependant prédominant dans le cerveau et la moelle épinière (Fardaei et al., 2002; Kanadia, Urbinati, et al., 2003). Là où l'expression de *MBNL1* et *MBNL2* augmente sensiblement au cours du développement dans la plupart des tissus, celle de *MBNL3* est davantage confinée au stade fœtal, mais elle est cependant détectée à l'âge adulte dans les poumons, la rate et le placenta (Konieczny et al., 2014). Cette dynamique est également retrouvée *in vitro* dans les myoblastes, cellules musculaires précurseurs, murins.

Chez l'homme, seuls *MBNL1* et *MBNL2* sont exprimés dans les cellules musculaires (Holt et al., 2009). L'expression majoritairement développementale de *MBNL3* est à considérer en regard de son rôle dans la régénération et la différenciation. En effet, c'est un régulateur négatif de la protéine *myoblast determination protein 1* (MyoD) et donc un inhibiteur de la différenciation des cellules musculaires. Les souris *Mbnl3-KO* présentent par ailleurs des défauts du processus de régénération à un âge tardif (Poulos et al., 2013).

Enfin, différents modèles murins montrent que la déplétion de *Mbnl1* ou *Mbnl2* entraîne l'augmentation de *Mbnl2* ou *Mbnl1* respectivement dans le muscle squelettique et cardiaque ainsi

que le cerveau (Lee et al., 2013, 2022; Sta Maria et al., 2021). Les deux protéines ayant des fonctions similaires, et la perte conjointe de ces deux protéines étant létale à l'état embryonnaire, il a été postulé que MBNL1 et MBNL2 peuvent se compenser. Le poids de cette hypothèse a été renforcé par l'aggravation du phénotype musculaire et neurologique ainsi que par l'extension des altérations de l'épissage alternatif, induite dans de nombreux modèles de souris par la perte conjointe de ces deux protéines par rapport à la perte de l'une ou l'autre (Goodwin et al., 2015; Lee et al., 2013, 2022; Tanner et al., 2021; Thomas et al., 2017).

Des résultats préliminaires de Nitschke et al. suggèrent que cette compensation se met en place par l'inclusion anormale de l'exon 8 (95 pb) de *MBNL2*. L'épissage alternatif de cet exon serait régulé par MBNL1 et la perte de MBNL1 conduirait donc à une augmentation de l'inclusion de celui-ci (Nitschke et al., IDMC13). L'inclusion de l'exon 8 de *MBNL2* conduit à un décalage de phase du cadre de lecture et à un C-terminal alternatif de la protéine qui la stabiliserait. On peut noter que l'inclusion aberrante de l'exon 8 de *MBNL2* avait déjà été observée dans le muscle squelettique et le thymus des souris *Mbnl1-KO* mais jamais associé au phénomène de compensation (Lee 2013, Sznajder 2020).

2.1.1 L'implication de MBNL dans le muscle squelettique

Le modèle de déplétion de *Mbnl1* a montré l'importance de cette protéine dans le muscle squelettique (Kanadia, Johnstone, et al., 2003). En effet, parmi les défauts d'épissage alternatif à la source des symptômes DM1 dans ce tissu (présentés tableau 1), la grande majorité est due à la perte de fonction de MBNL1 (Du et al., 2010). Comme mentionné précédemment, MBNL1 régule l'épissage alternatif de *CLCN1* dont le mauvais épissage conduit à l'apparition de la myotonie dans la DM (Charlet-B. et al., 2002). La perte de MBNL1 induit l'inclusion de l'exon 7a contenant un exon stop prématuré et la dégradation des ARN *CLCN1* (Charlet-B. et al., 2002; Mankodi et al., 2002). La restauration de cet épissage par libération ou surexpression de MBNL1 suffit à corriger la myotonie dans le modèle HSA^{LR} (Kanadia et al., 2006; Wheeler et al., 2009).

L'épissage alternatif altéré de nombreux ARN a été associé à la faiblesse musculaire, un symptôme central de la DM. MBNL1 régule ainsi l'expression de *SERCA1* et *RYR1* (Hino et al., 2007; Lee et al., 2013; Kimura et al., 2005), *CACNA1S* (Tang et al., 2012) et *BIN1* (Fugier et al., 2011) qui sont impliqués dans les voies de la signalisation calcique du couplage excitation/contraction. Leur dérégulation pourrait donc contribuer à l'apparition de la faiblesse musculaire chez les patients DM, laquelle est une maladie dégénérative dont le processus

dystrophique musculaire a été associé à l'exclusion pathogénique de l'exon 78 de la dystrophine causé par la perte de MBNL1 (Rau et al., 2015).

Enfin, MBNL1 régule l'inclusion de l'exon 11 du récepteur à l'insuline (*INSR*), tandis que son exclusion dans la DM provoque une insulino-résistance chez les patients (Savkur et al., 2001). Ce ne sont pas les seuls transcrits altérés par la perte de MBNL1 dans le muscle squelettique. En effet, il régule également l'épissage alternatif de plusieurs centaines de transcrits dans le muscle squelettique dont l'altération pourrait participer au mécanisme pathologique de la DM (Wang et al., 2012). Ce nombre est encore augmenté si l'on considère également MBNL2, capable de compenser pour la perte de MBNL1 (Lee et al., 2013). MBNL3 semble, quant à lui, impliqué dans le mécanisme de régénération chez les souris âgées, la faible expression de ce paralogue dans le muscle squelettique reflète donc son rôle mineur dans ce tissu (Poulos et al., 2013).

2.1.2 L'implication de MBNL dans le système nerveux central

Contrairement au muscle squelettique, *MBNL2* est plus exprimé que *MBNL1* dans le cerveau (Konieczny et al., 2014). Les défauts d'épissage de la souris délétée pour *Mbnl1* (Suenaga et al., 2012) sont d'ailleurs bien moins importants que ceux observés chez le modèle délété pour *Mbnl2* (Charizanis et al., 2012). L'épissage de *MAPT* est ainsi altéré dans le cerveau des patients DM1 (Sergeant et al., 2001), *MBNL2* étant responsable de l'épissage des exons 2, 3 et 10 (Charizanis et al., 2012; Goodwin et al., 2015). Ces défauts s'accompagnent d'enchevêtrements fibrillaires formés de protéines Tau hyperphosphorylées dans les cerveaux des patients DM (Kiuchi et al., 1991), permettant d'assimiler la DM au groupe des tauopathies (Fernandez-Gomez et al., 2019).

D'autres transcrits avec un épissage anormal dans la DM1 tels que l'exon 5 de *NMDAR1* (Jiang et al., 2004) et l'exon 5 de *GRIN1* (Jiang et al., 2004; Shimizu et al., 2000) ont été retrouvés dans les souris avec une perte de *Mbnl2*, imputant la régulation de leur épissage à ce paralogue dans le cerveau (Charizanis et al., 2012). L'étude de ce modèle a par ailleurs permis d'identifier plusieurs centaines d'exons différenciellement épissés par la perte de *Mbnl2* dont l'exon 23a de *Tanc2* (S. Han et al., 2010), l'exon 12a de *Cacna1d* (McKinney et al., 2009) et les exons 23a et b de *Clasp2* (Beffert et al., 2012), tous trois similairement dérégulés chez les patients DM1 (Charizanis et al., 2012). Globalement, les gènes dérégulés par la perte de *Mbnl2* sont impliqués dans la fonction synaptique, le développement neuronal et le guidage axonal. Ces souris présentant des troubles du sommeil et de la mémoire réminiscent des défauts des patients DM1, *MBNL2* apparaît comme un acteur majeur du mécanisme pathologique neurologique dans la pathologie (Charizanis et al., 2012).

De la même manière que dans le muscle squelettique, ces défauts sont décuplés par la perte simultanée des deux paralogues spécifiquement dans les neurones avec des altérations plus fortes de l'épissage alternatif associées à des défauts locomoteurs (Goodwin et al., 2015). MBNL1 et MBNL2 semblent cependant au moins aussi importants dans les cellules gliales. En effet, un modèle murin DM1 présente des astrocytes avec des anomalies structurales associées à des altérations de l'épissage alternatif encore plus sévères que dans les neurones (Dinca et al., 2022). Ces défauts sont récapitulés *in vitro* par la déplétion de Mbnl1 et Mbnl2, suggérant que c'est la séquestration de MBNL par les foci qui est à l'origine de ces défauts (Dinca et al., 2022). N'étant que peu exprimé dans le système nerveux central, le rôle de MBNL3 n'a jamais été étudié dans ce tissu.

2.2 Fonctions individuelles des différents domaines des protéines MBNL

MBNL1 étant la protéine la mieux étudiée parmi les paralogues MBNL, nous allons décrire les différents domaines de cette protéine, sachant que les exons de MBNL2 et MBNL3 sont très similaires à ceux de MBNL1 (Tran et al., 2011).

2.2.1 Propriétés de liaison à l'ARN de la partie N-terminale

Les protéines MBNL présentent dans leur partie N-terminale des domaines de doigt-de-zinc (ZnF) qui sont essentiels pour la reconnaissance des cibles ARN de MBNL. Le nombre de ces domaines passe de 2 à 4 des invertébrés aux vertébrés, sans indice sur le caractère ancestral. Chez les vertébrés, ces ZnF sont codés par les exons 1, 2 et 4. Plus précisément, les 4 domaines ZnF sont arrangés en 2 paires en tandem, la première paire étant codée par les exons 1 et 2 tandis que la seconde paire est codée par l'exon 4. Chaque motif ZnF comprend 3 cystéines suivies d'une histidine (CCCH) (Fardaei 2002) (Pascual et al., 2006). Les paires de ZnF ont des structures très proches, avec un espacement identique entre les résidus cystéine et histidine des ZnF 1 et 3 (Edge et al., 2013). Malgré leurs ressemblances, les deux paires de ZnF ont des propriétés de liaison différentes, chaque paire de ZnF étant indépendamment essentielle pour la liaison à différents ARNs cibles. Néanmoins, la première paire de ZnF reste prépondérante pour la liaison et l'activité de MBNL1 quant à la majorité des cibles de MBNL1 (Hale et al., 2018; Purcell et al., 2012).

Les paires de ZnF sont par ailleurs reliées par un domaine de liaison, codé par l'exon 3 de la protéine. Sa déplétion réduit considérablement la capacité de liaison de la protéine (Kino 2004). Il a été supposé que ce domaine assure la flexibilité conformationnelle de MBNL1, lui permettant d'interagir avec une variété d'ARNs (Cass et al., 2011; Kino et al., 2004). Ce domaine de liaison

n'est cependant pas essentiel à la liaison aux CUGexp de la DM1. De plus, sa séquence n'est qu'à moitié conservée entre les paralogues MBNL (Grammatikakis et al., 2011), contrairement aux ZnF qui sont quasi-identiques entre les vertébrés (Fardaei et al., 2002; Pascual et al., 2006). Ce polypeptide pourrait donc avoir un rôle légèrement différent suivant la protéine.

2.2.2 Modalités de liaison de MBNL à sa cible ARN

2.2.2.1 Séquence consensus

La séquence ARN consensus de liaison par MBNL1 a été identifiée comme un enchaînement de 4 nucléotides YGCY (un dinucléotide GpC flanqué de chaque côté par une pyrimidine, notée Y) (Ho et al., 2004). Plus particulièrement, la séquence majoritairement présente parmi les cibles de MBNL1 est un motif UGCU répété sur une courte région nucléotidique (Goers et al., 2010). Ce motif a été confirmé par des expériences de *cross-linking and immunoprecipitation* (CLIP-Seq), non seulement pour MBNL1 mais également pour MBNL2 et MBNL3 (Charizanis et al., 2012; Wang et al., 2012; Poulos et al., 2013). En effet, le ZnF3 de MBNL1 reconnaît préférentiellement les séquences GC alors que le ZnF4 se lie aux GCU (Teplova & Patel, 2008).

La liaison des ZnF à l'ARNm provoque le repliement antiparallèle de l'ARNm entre les deux séquences reconnues, les ZnF se retrouvant entre les deux chaînes de l'ARNm. Les séquences reconnues GC s'engouffrent alors dans des poches de résidus aromatiques avec les cystéines interagissant avec le zinc. De plus, au sein d'une paire, les ZnF semblent avoir des rôles séquentiels, ZnF2 et ZnF4 s'appariant d'abord avec la région CGCU d'une séquence GUCUCGUUUUCCCC de l'ARN de la troponine cardiaque humaine (*bcTnT*). Cette liaison nécessite en outre la présence d'environ 10 nucléotides autour de la séquence consensus (Park et al., 2017).

Que les protéines MBNL se lient aux régions introniques, exoniques, 5'UTR ou 3'UTR, la séquence consensus reste YGCY, ce qui suggère que le processus de liaison des protéines MBNL reste le même, quelle que soit la région liée (Wang et al., 2012).

2.2.2.2 Structure de l'ARN cible

MBNL1 semble préférer le motif YGCY avec les bases pyrimidiques simple-brin mais la liaison du dinucléotide central n'est pas discriminante comme c'est le cas pour CELF1 et RbFOX2 (un homologue de RbFOX1, impliqué dans la DM2) (Lambert et al., 2014). Cette conformation simple brin/double brin est notamment retrouvée dans les expansions de répétitions de la DM, les

répétitions formant des structures en épingles à cheveux avec des mésappariements périodiques U-U et A-A ne formant qu'une liaison hydrogène (Childs-Disney et al., 2014; Kiliszek et al., 2009). Ces mésappariements sont essentiels à la liaison de MBNL à sa cible. En effet, la liaison de MBNL1 avec les répétitions CUG est abolie lorsque les mésappariements sont remplacés par des liaisons fortes de Watson-Crick, tel qu'elles sont formées dans les répétitions CGG avec lesquelles MBNL1 ne peut interagir (Kiliszek et al., 2011; Warf & Berglund, 2007). Plusieurs études indiquent que MBNL favorise ensuite la séparation des deux brins par déstabilisation de la structure de l'ARN, permettant la liaison des ZnF avec les séquences GC dénaturées (Gates et al., 2011; Teplova & Patel, 2008; Fu et al., 2012).

2.2.2.3 Nombre et positions des motifs consensus

La liaison des protéines de liaison à l'ARN dépend de leur propre structure mais également de la variété de structures, motifs et position de ces motifs des ARNs cibles (Lewis et al., 2017; Lunde et al., 2007). Spécifiquement pour MBNL, dans un contexte structural constant, le nombre de répétitions de motifs consensus est proportionnel à la force de liaison de la protéine à l'ARN, corrélée avec la profondeur de la régulation de l'épissage alternatif par MBNL1. Même si deux motifs consensus répétés sont suffisants sur un ARNm simple brin pour une liaison avec MBNL1, l'affinité de la protéine est décuplée lorsque ce nombre est doublé (Taylor et al., 2018). D'ailleurs, les cibles confirmées de MBNL ont un grand nombre de motifs répétés : 15 pour l'exon 10 de la protéine à domaine de liaison LIM 3 (*LDB3*) (Cywoniuk et al., 2017), 9 pour l'exon 11 de *INSR* (Sen et al., 2010) et 12 pour l'exon 1 de *MBNL1* (Konieczny et al., 2017).

De plus, les positions relatives des motifs consensus sont également essentielles pour définir la capacité de liaison et d'activité de MBNL. En effet, l'activité de MBNL est la plus forte lorsque les motifs consensus se suivent de manière contiguë (5'...UGCUUGCU...3'), baisse lorsque les deux motifs sont superposés (5'...UGCUUGCU...3'). Alors que cette différence n'influence pas l'affinité de la protéine pour l'ARN, à la fois la capacité de liaison et l'activité de MBNL1 chutent considérablement lorsque la structure secondaire proche de ces motifs est trop stabilisée (Taylor et al., 2018).

Comme dit précédemment, les trois paralogues MBNL1, MBNL2 et MBNL3 et leurs isoformes ont des parties N-terminales quasi-identiques mais peuvent réguler l'épissage de cibles différentes, même lorsqu'exprimés dans le même tissu (Charizanis et al., 2012; Suenaga et al., 2012). Il est possible que ce choix soit influencé par les paramètres structuraux de l'ARN cible en regard

des parties C-terminales alternatives de ces paralogues et de leurs isoformes (Sznajder et al., 2016; Taylor et al., 2018).

2.2.3 Régulation de l'épissage alternatif par la partie C-terminale de la protéine

Les exons suivant l'exon 4 font partie de la partie dite C-terminale de MBNL. Bien qu'elle ne soit pas impliquée dans la liaison à l'ARN, cette partie de la protéine est essentielle pour son activité de régulation de l'épissage alternatif. L'exon 5 modifie la localisation cellulaire de MBNL, sa présence induisant une localisation majoritairement nucléaire de la protéine (Kino et al., 2004, 2015; Terenzi & Ladd, 2010). De manière notable, cette séquence exonique n'est pas présente dans le gène *MBNL3*, son expression en est cytoplasmique de manière prédominante (Gates et al., 2011).

Un motif KRPALE, également présent dans d'autres protéines, a été identifié dans l'exon 6 et est également impliqué dans la localisation cellulaire de la protéine. (Fernandez-Costa & Artero, 2010; Kino et al., 2015; Tran et al., 2011) Contrairement à l'exon 5, cette séquence est présente dans tous les paralogues, mais son rôle n'est applicable qu'en regard de l'exon 5. Le motif KRPALE et l'exon 5 forment donc un signal de localisation nucléaire en deux parties (Kino et al., 2015). De plus, l'exon 6 est décrit comme jouant un rôle dans l'activité de MBNL, sa déplétion diminuant la régulation qu'exerce la protéine sur l'épissage alternatif (Tran et al., 2011).

Dans la DM, l'inclusion de l'exon 5 est favorisée, entraînant une plus grande localisation nucléaire des protéines MBNL et donc une plus forte séquestration par les répétitions C(C)UG (Lin et al., 2006). L'exon 7 de la protéine influence la multimérisation de la protéine (Tran et al., 2011) et semble impliqué dans l'épissage de certains ARNm cibles (Sznajder et al., 2016). Tout comme l'exon 5, l'exon 7 est préférentiellement inclus dans la DM, mais sa contribution au développement de la pathologie n'a pas encore été élucidé (Tran et al., 2011).

2.3 Régulateurs des protéines MBNL

2.3.1 Autorégulation de MBNL

Les protéines MBNL étant centrales dans le mécanisme pathologique de la DM, des études récentes se sont focalisées sur la caractérisation des acteurs impliqués dans leur régulation. Il a été notamment montré que les protéines MBNL se lient à leur propre ARNm, régulant leur expression. En effet, MBNL1, MBNL2 et MBNL3 peuvent se lier à la partie 5' de l'exon 1 de *MBNL1* qui comprend des séquences consensus YCGY formant des structures lâches en épingles à cheveux.

MBNL induit ainsi l'exclusion de l'exon 1 et le début de la traduction dans l'exon 2. La perte de la première paire de ZnF induit une perte d'affinité de la protéine pour ses cibles ARNs ainsi qu'une diminution considérable de sa stabilité et de son activité régulatrice de l'épissage alternatif. Cet événement est majoritairement détecté dans les tissus avec un niveau d'expression élevé de MBNL1 et constitue une boucle autorégulatrice négative (Konieczny et al., 2017). Cet exon a également été étudié car il est utilisé comme matrice pour la formation d'un transcrit circularisé très abondant chez la drosophile, et également présent chez l'homme (Ashwal-Fluss et al., 2014; Houseley et al., 2006).

Chez la drosophile, la protéine Muscleblind est directement impliquée dans la circularisation de l'exon 2 (exon 1 chez les vertébrés), par liaison aux régions introniques adjacentes et excision de l'exon grâce au spliceosome. Cet ARN circulaire présente des sites de liaison de MBNL et induit la diminution de Muscleblind chez la drosophile, servant d'éponge en cas de surexpression de la protéine (Ashwal-Fluss et al., 2014). Par ailleurs, la déplétion de cet ARN circulaire chez la drosophile induit des défauts musculaires et du SNC, suggérant qu'il est impliqué dans l'homéostasie de ces tissus (Pamudurti et al., 2018). Cette boucle de régulation négative ne semble pourtant pas participer à la perte de fonction de MBNL dans la DM, la quantité de cet ARN circulaire étant identique chez les patients sains et DM (Konieczny et al., 2017). De manière intéressante, il semble qu'un ARN circulaire soit également produit à partir de l'exon 2 de MBNL2 chez la souris (Salzman et al., 2013).

2.3.2 Autres régulateurs de MBNL

Au cours du développement, dans le cerveau et le muscle squelettique, la localisation cytoplasmique ou nucléaire de MBNL1 n'est pas entièrement expliquée par l'exclusion ou l'inclusion de l'exon 5. En effet, MBNL1 est également polyubiquitiné via la lysine 63. Cette modification induit la localisation cytoplasmique de la protéine, importante notamment pour la croissance des neurites. Dans un modèle de souris DM1, MBNL1 est déubiquitiné, menant à sa translocation dans le noyau, où il est séquestré par les CUGexp. Ce processus pourrait donc contribuer à la perte de fonction de MBNL dans le mécanisme pathologique de la DM (Wang et al., 2018).

Une étude a démontré *in vitro* que dans des conditions neurodégénératives, retrouvées dans un modèle DM1 (Sicot et al., 2017), la translocation de la Calpain-2 (CAPN2) corrèle avec une diminution de MBNL2. Bien qu'il n'y ait pas de preuve de l'interaction directe entre les deux

protéines, une perte de fonction de la CAPN2 est suffisante pour préserver la quantité cellulaire de MBNL2, suggérant que la CAPN2 est capable de réguler MBNL2 (Wang et al., 2022).

2.4 Fonction des protéines MBNL

2.4.1 Régulation de l'épissage alternatif

La fonction la plus décrite des protéines MBNL est celle de la régulation de l'épissage alternatif, dont le mécanisme simplifié est présenté figure 14.

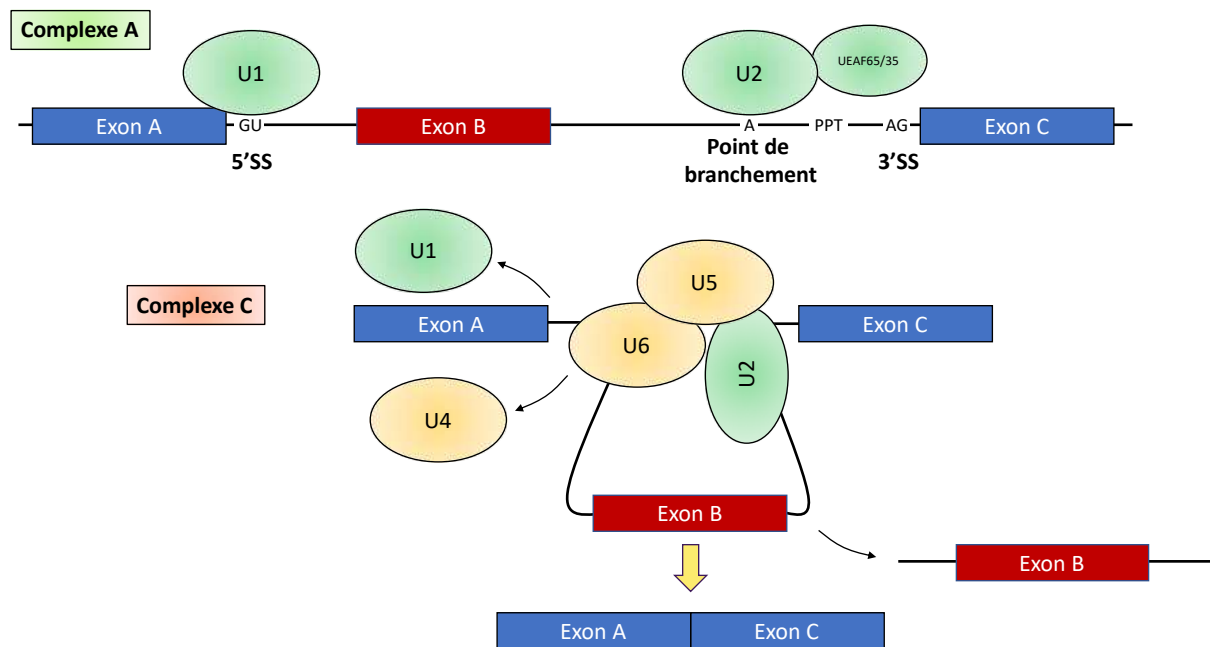


Figure 14 : Représentation schématique du mécanisme d'épissage alternatif.

Le spliceosome, formé des petites particules nucléaires ribonucléoprotéiques (snRNPs) (U1, U2, U4, U5 et U6), permet l'excision d'un exon alternatif (Exon B) et les introns adjacents. Complexe A : U1 se lie au site d'épissage 5' (5'SS) et U2, associé à U2AF65/35, au point de branchement, proche du site de polypyrimidines (PPT). Complexe C : Le tricomplexe U4-U5-U6 s'associe au spliceosome en formation, dissociant U1 et U4 et formant un lasso avec l'exon B et les introns adjacents. L'excision de ce lasso et la ligation des exons A et C forme un ARN pré-messager épissé (adapté de La Cognata et al., 2014).

MBNL peut promouvoir l'inclusion ou l'exclusion d'un exon, cette modalité étant souvent déterminée par la position relative de liaison par rapport à cet exon (Figure 15). MBNL régule de cette manière la transition développementale de centaines de transcrits dans différents tissus (Charizanis et al., 2012; Wang et al., 2012; Goers et al., 2010; Kalsotra et al., 2008).

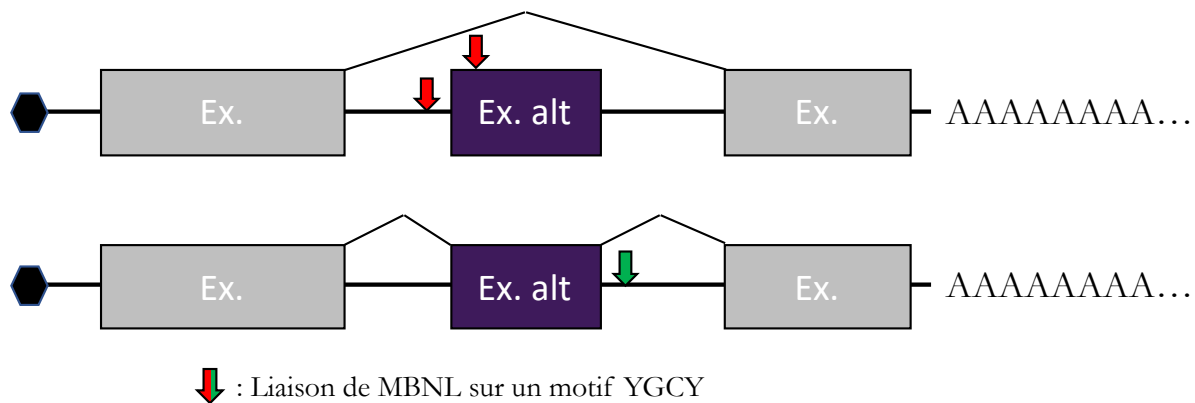


Figure 15 : Représentation schématique de l'effet de la liaison de MBNL sur l'épissage alternatif de ses cibles.

Généralement, la liaison de MBNL à un motif YGCY sur la flèche rouge induit l'exclusion de l'exon alternatif tandis que la liaison de MBNL à un motif YGCY sur la flèche verte induit l'exclusion de l'exon alternatif.

Cette modalité de régulation n'est pas spécifique à MBNL, d'autres protéines de liaison à l'ARN ayant un mode de fonctionnement identique (Witten & Ule, 2011). L'exclusion d'exon a été imputée à un blocage des facteurs promouvant l'exclusion, des sites d'épissage en 3', de séquences riches en polyrimidines ou de la jonction entre l'intron et l'exon par MBNL. MBNL pourrait induire l'inclusion de l'exon en améliorant la reconnaissance du site d'épissage en 5' par le spliceosome ou en étant en compétition avec les inactivateurs de l'épissage et les activateurs de l'épissage à partir de séquences introniques (Wang et al., 2012).

MBNL semble impliqué dans davantage d'exclusions que d'inclusions d'exons (Sznajder et al., 2016). C'est le cas notamment pour l'exon 7A de *CLCN1*, que MBNL exclut en stabilisant la structure en tige boucle dans l'intron 6, occultant une séquence polypyrimidique, le site d'épissage 3' et les activateurs exoniques de l'épissage (Kino et al., 2009). *tTNT* est également concerné par ce mode d'action, MBNL stabilisant les tiges boucles adjacentes au site d'épissage 3' de l'exon F

(Kanadia, Johnstone, et al., 2003) et celle dans l'intron 5' de l'exon 5, empêchant la liaison avec le facteur d'épissage U2AF65, facilitant l'exclusion de l'exon (Warf et al., 2009).

MBNL semble également pouvoir désorganiser la structure de son ARN cible, tel que cela a été décrit pour ses propres exons alternatifs. En effet, MBNL se lie dans l'intron 4 de son ARNm et empêche la reconnaissance, ou la liaison de manière indirecte, du site d'épissage 3', induisant l'exclusion de l'exon 5 (Gates et al., 2011).

MBNL peut également promouvoir l'inclusion d'exons alternatifs, comme pour l'exon 16 du récepteur aux lipoprotéines à très basse densité (*VLDLR*) (Du et al., 2010), l'exon 22 de l'ATPase 1 transporteuse de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique/endoplasmique (*ATP2A1*) (Kimura et al., 2005) et l'exon 11 de *INSR* (Sen et al., 2010). L'inclusion de ce dernier est due au phénomène inverse de l'exclusion de l'exon 5 de *cTNT*, MBNL induit l'activation de U2AF65 et l'assemblage du spliceosome (Echeverria & Cooper, 2014).

Parmi les paralogues, sur les transcrits majeurs régulés par MBNL, MBNL1 montre l'activité d'épissage la plus élevée et MBNL3 la plus faible. Cette différence peut provenir de l'exon 3, des parties C-terminales ou encore des profils d'expression de chaque paraglogue, différents entre MBNL1, MBNL2 et MBNL3 (Sznajder et al., 2016).

2.4.2 Régulation des processus 3'UTR-dépendants

Au-delà des régions introniques et exoniques, les sites de liaison de MBNL sont également présents en quantité équivalente ou supérieure dans la partie 3'UTR de ses cibles, en fonction du paraglogue et du tissu étudié (Charizanis et al., 2012; Wang et al., 2012). MBNL régule ainsi le choix du site de polyadénylation, la localisation du transcrit ainsi que sa stabilité et sa demi-vie.

2.4.2.1 Polyadénylation alternative

Les protéines MBNL contrôlent en effet le choix du site de polyadénylation (pA) de nombreux transcrits et surtout la transition du site caractéristique d'un 3'UTR fœtal à une forme adulte, de la même manière que pour l'épissage alternatif (Batra et al., 2014). Plus précisément, en se liant à une séquence consensus proximale, MBNL peut masquer un site de pA des facteurs 3' de pA, induisant le choix d'un site distal. Inversement, la liaison de MBNL en amont du site de pA corrèle avec le choix préférentiel de ce site (figure 16).

MBNL pourrait donc influencer à deux niveaux, soit la reconnaissance du site de pA par la machinerie de pA 3', soit la stabilité de structures propices au recrutement de ces facteurs. Par

exemple, l'ARNm de la protéine régulatrice associée au complexe mTORC1 (*RPTOR*) subit dans la DM un changement de son site de pA, au profit d'un site distal, associé à une diminution de la quantité de cet ARNm (Batra et al., 2014). La voie de la cible mammifère de la rapamycine (mTOR) est un processus clé impliqué dans la régulation de la croissance et les processus hypertrophiques et atrophiques musculaires (Laplante & Sabatini, 2012), dérégulés dans la DM.

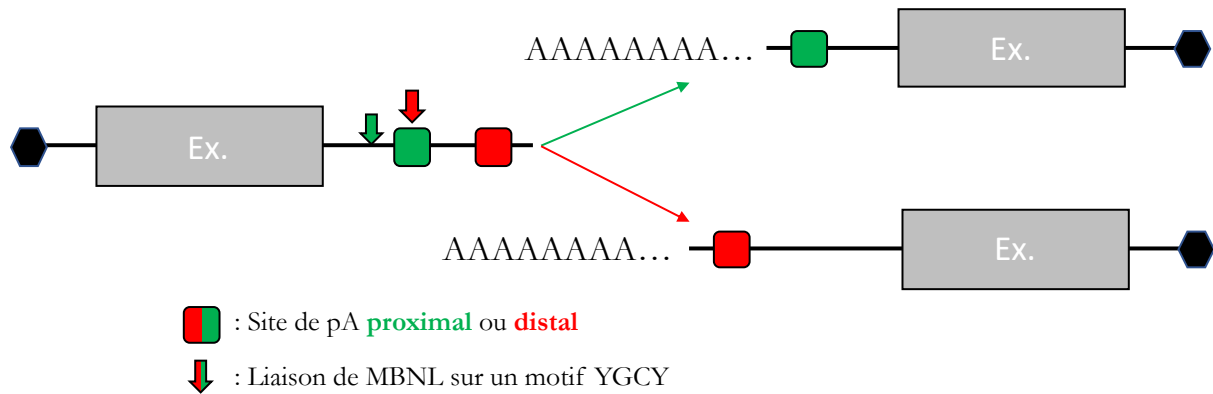


Figure 16 : Représentation schématique de l'effet de la liaison de MBNL sur le choix du site de polyadénylation de ses cibles.

La liaison de MBNL à un motif YGCY (flèche) masque (rouge) ou promeut (vert) le choix du site de pA proximal au profit (rouge) ou au détriment (vert) respectivement du site de pA distal.

2.4.2.2 Localisation des ARN

La localisation des ARNm étant majoritairement régulée par des interactions impliquant leur partie 3'UTR (Andreassi & Riccio, 2009), des études récentes se sont focalisées sur cet aspect de la régulation de MBNL. Ainsi, MBNL2 se lie à l'ARNm de l'intégrine α_3 dans sa partie 3'UTR et est responsable de sa localisation à la membrane plasmique (Adereth et al., 2005). La localisation des ARNm et la traduction locale qui en découlent sont d'une importance de premier ordre dans le SNC, les neurones élongeant leurs projections cytoplasmiques sur de grandes distances (Broix et al., 2021). En effet, une stratégie d'interférence ARN dans des cellules neuronales a révélé que les protéines Mbnl1 et Mbnl2 sont essentielles pour la localisation de centaines d'ARNm aux neurites. MBNL régule la localisation de ces transcrits en influençant l'épissage alternatif de leur dernier exon, modifiant leur 3'UTR (figure 17) (Taliaferro et al., 2016). Ce phénomène pourrait être à l'origine de défauts de la complexité et de la maturité des dendrites dans un modèle spécifique aux neurones de déplétion conjointe de *Mbnl1* et *Mbnl2* (Lee et al., 2019).

Par ailleurs, la localisation cytoplasmique de MBNL1 dans des myoblastes n'est pas uniforme mais majoritairement accolée à la membrane plasmique. *In vivo*, MBNL1 est localisé aux disques Z du sarcomère qui concentrent les membranes endoplasmiques et du réticulum sarcoplasmique (Denes et al., 2021). Cela corrèle avec le fait que les transcrits liés par MBNL1 dans leur 3'UTR sont particulièrement enrichis dans la catégorie de la *Gene Ontology* des composants cellulaires (Wang et al., 2012). 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).

Les protéines de liaison à l'ARN transportent les ARNm en formant des granules de ribonucléoprotéines (RNP) avec leur cible ARN (Ries et al., 2019). Dans les neurones, leur transport le long des neurites fait intervenir les protéines de la famille des kinésines et dynéines conjointement avec les microtubules (Czaplinski, 2014). Or, une analyse transcriptomique d'échantillons de cortex frontal de patients DM1 a révélé que MBNL régule l'épissage alternatif du domaine de liaison aux kinésines (KBD) de la protéine 1 interagissant avec le récepteur la protéine *glutamate Receptor Interacting Protein 1 (GRIP1)*. La séquestration de MBNL induit la diminution de l'affinité de GRIP1 avec la kinésine KIF5A, ce qui participe aux altérations synaptiques décrites dans cette étude (Otero et al., 2021).

Le transport de MBNL lui-même a été démontré très récemment, en 2022, *in vitro*. Cette prépublication identifie Kif1b α et Kif5c comme partenaires directs des ZnFs de Mbnl1 avec qui ils se déplacent dans des cellules neuronales (Hildebrandt et al., 2022). Le rôle de MBNL dans la localisation des ARNm peut donc être direct, par liaison au 3'UTR et aux moteurs moléculaires, ou indirect via une régulation de l'épissage alternatif ou des protéines impliquées dans ce transport.

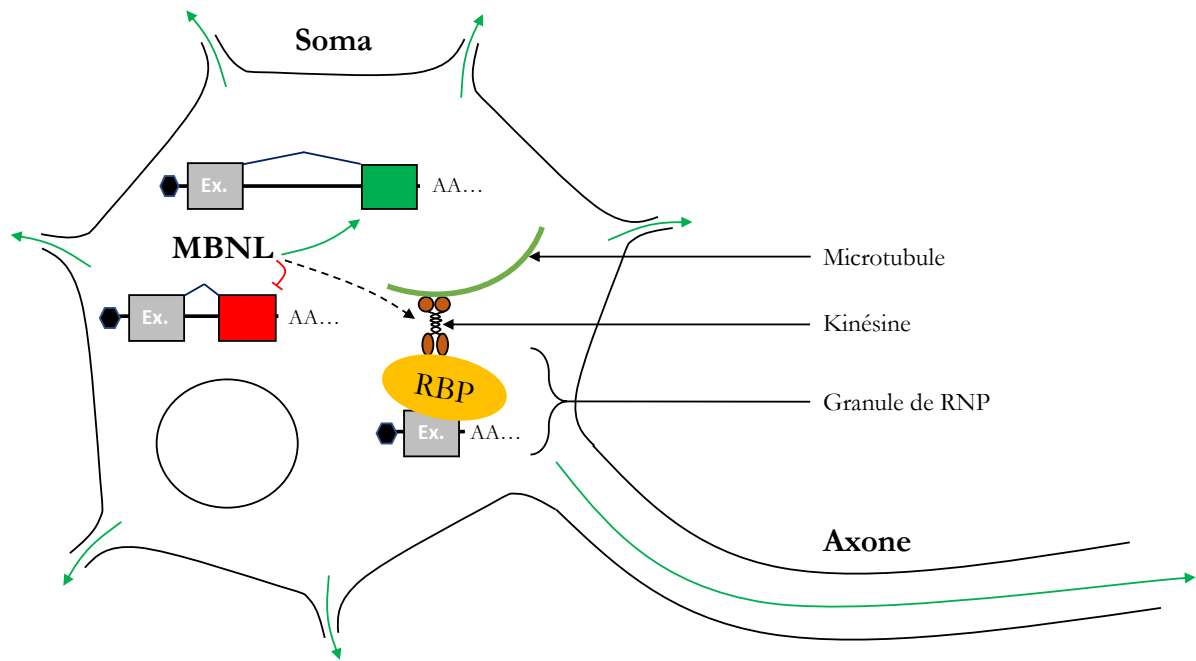


Figure 17 : Représentation schématique du rôle de MBNL sur la localisation des ARNm

Dans les neurones, MBNL régule directement la localisation d'ARNm en favorisant l'exclusion du dernier exon proximal (rouge) au profit du dernier exon distal (vert). Ces exons sont ensuite transportés vers les neurites (flèches vertes). MBNL intervient également dans le transport des ARNm par liaison et régulation de la machinerie de transport vésiculaire.

2.4.2.3 Stabilisation des ARN

La liaison au 3'UTR par MBNL peut, comme CELF1, induire une déstabilisation de l'ARNm et faciliter sa dégradation (Du et al., 2010; Masuda et al., 2012; Osborne & Thornton, 2008). En effet, *in vitro*, la liaison de MBNL1 à des cibles artificielles et endogènes provoque la diminution de la demi-vie de ces cibles. L'analyse transcriptomique a révélé que ces ARNm sont impliqués majoritairement dans la liaison à l'ARN, aux protéines du cytosquelette et à des facteurs de transcription. Parmi les cibles affectées par MBNL1, paired like homeodomain 2 (*PTIX2*), un facteur de transcription impliqué majoritairement dans la formation de l'œil et du cœur (Masuda et al., 2012). A noter, la perte de fonction de Mbnl n'a que modestement augmenté le taux de transcription générale des ARNm dans une autre étude, postulant que ce phénomène reste marginal (Wang et al., 2012).

2.4.3 Biosynthèse des miARN

MBNL1 est directement impliqué dans la maturation d'un microARN miR-1, par liaison à un motif UGC dans une région double brin en boucle terminale dans le miARN précurseur. Cette liaison empêche l'uridylation du précurseur et favorise sa maturation par Dicer (Rau et al., 2011). miR-1 est la seule cible connue de MBNL ne présentant qu'un seul exemplaire de sa séquence consensus.

2.4.4 Inhibition des gènes d'induction à la pluripotence

Les paralogues MBNL1 et MBNL2 ont été identifiés comme des régulateurs négatifs de la pluripotence cellulaire. Ensemble, ils contrôlent l'épissage alternatif d'un large panel de gènes différemment épissés entre des cellules souches embryonnaires (CSEs) et les autres types cellulaires. Parmi ces gènes, la famille de facteurs de transcriptions à tête de fourche (*FOXP1*) joue un rôle clé dans le contrôle de la pluripotence. De plus, la perte de fonction de MBNL1 et MBNL2 augmente significativement l'expression des gènes d'induction à la pluripotence ainsi que la formation de cellules souches pluripotentes induites durant la reprogrammation somatique (Han et al., 2013; Venables et al., 2013).

3 L'unité motrice

L'unité motrice est un élément clé de la contraction musculaire ; elle est décrite par Sherrington comme le pont entre le SNC, le SNP et le muscle squelettique (Liddell & Sherrington, 1925). L'information permettant tout mouvement volontaire, née dans le cortex prémoteur, doit ainsi être transmise jusqu'aux muscles depuis le cortex moteur à travers le faisceau pyramidal. Les prolongements cytoplasmiques, ou axones, des MNs supérieurs du cortex moteur du prosencéphale se rassemblent et parcourent la capsule interne, les pédoncules cérébraux du mésencéphale puis le pont en position ventrale, formant les pyramides dans la médulla.

La vaste majorité des axones décussent, c'est-à-dire qu'ils traversent la ligne médiane et cheminent le long du cordon latéral de la moelle épinière (faisceau corticospinal latéral) tandis que l'autre partie reste du côté ventral (faisceau corticospinal ventral) (figure 18). Les deux faisceaux innervent ensuite les différents MN inférieurs dont les axones forment les fibres nerveuses motrices qui innervent les fibres musculaires par l'intermédiaire de la JNM (Armand, 1982).

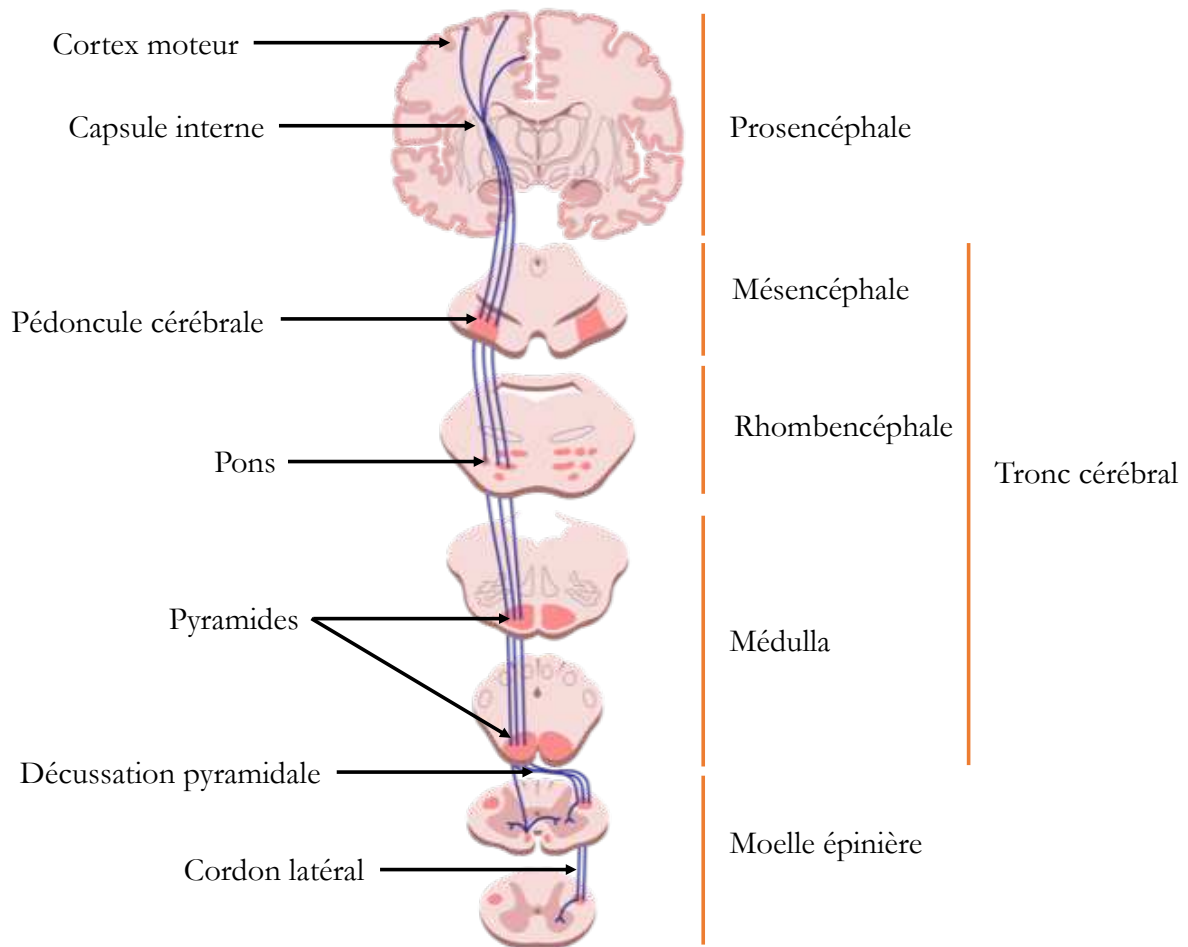


Figure 18 : Représentation schématique du faisceau corticospinal.

Les axones des MNs supérieurs du cortex moteur passent à travers la capsule interne du cortex puis à travers différentes parties du tronc cérébral, les pédoncules cérébraux et le pons, relais avec le cervelet, puis forment les pyramides. A l'intersection avec la moelle épinière, la majorité des axones décussent et suivent une position latérale (Armand, 1982).

Ce dernier chapitre comprendra 4 parties. Les 3 premières se concentreront sur les différentes parties de l'unité motrice, à savoir le motoneurone (1), la jonction neuromusculaire (2) et enfin le muscle squelettique et le couplage excitation-contraction (3). Je terminerai cette introduction par une description des altérations de l'unité motrice dans la DM1 (4).

3.1 Le motoneurone

Comme mentionné précédemment, les MNs supérieurs se trouvent dans le cortex cérébral. Ils innervent les MNs inférieurs, ou spinaux, du tronc cérébral et de la moelle épinière. En plus des MNs supérieurs, les MNs spinaux reçoivent des informations des neurones sensitifs, des fibres musculaires ainsi que des interneurons de la moelle épinière. Les MNs spinaux sont responsables de la transmission du signal des MN supérieurs aux muscles effecteurs afin de réaliser un mouvement. Ils innervent par la suite différents organes, qui permettent de définir 3 types de MN spinaux (Vaiserman & Lushchak, 2019).

On distingue ainsi les MNs branchiaux, viscéraux et somatiques (revu par Stifani, 2014). Les MNs brachiaux sont situés dans le tronc cérébral et innervent les muscles du cou et de la face (Chandrasekhar, 2004). Les MNs viscéraux innervent le système nerveux autonome (SNA), lui-même séparé en système sympathique et parasympathique. Le système sympathique assure l'activation du métabolisme global de l'organisme, il gère le muscle cardiaque, les poumons, les reins, les intestins et le côlon. Le système parasympathique contrôle notamment la sécrétion des glandes, la digestion, la croissance etc. (Vaiserman & Lushchak, 2019). Enfin, les MNs somatiques sont situés à la fois dans le tronc cérébral et la moelle épinière. Ils s'organisent en colonnes et innervent les muscles squelettiques, permettant leur contraction et le mouvement du corps (Rexed, 1954).

Les MNs sont, comme les autres neurones, composés d'un corps cellulaire, ou soma, duquel s'étendent les prolongements cytoplasmiques ramifiés, ou neurites, qui permettent la transmission synaptique. Les neurites comprennent l'axone et les dendrites. Pour les MNs somatiques, la terminaison axonale forme le bouton synaptique qui relaie le message synaptique du MN à la fibre musculaire. Les dendrites forment des synapses entre les neurones. Les MNs intègrent ainsi l'information nerveuse d'autres neurones, modulant la décharge efférente du MN vers sa cible musculaire. En effet, les MNs somatiques reçoivent des signaux du cortex moteur et des muscles, par les MNs supérieurs et les neurones sensitifs via les interneurons respectivement (Vaiserman & Lushchak, 2019) (figure 19).

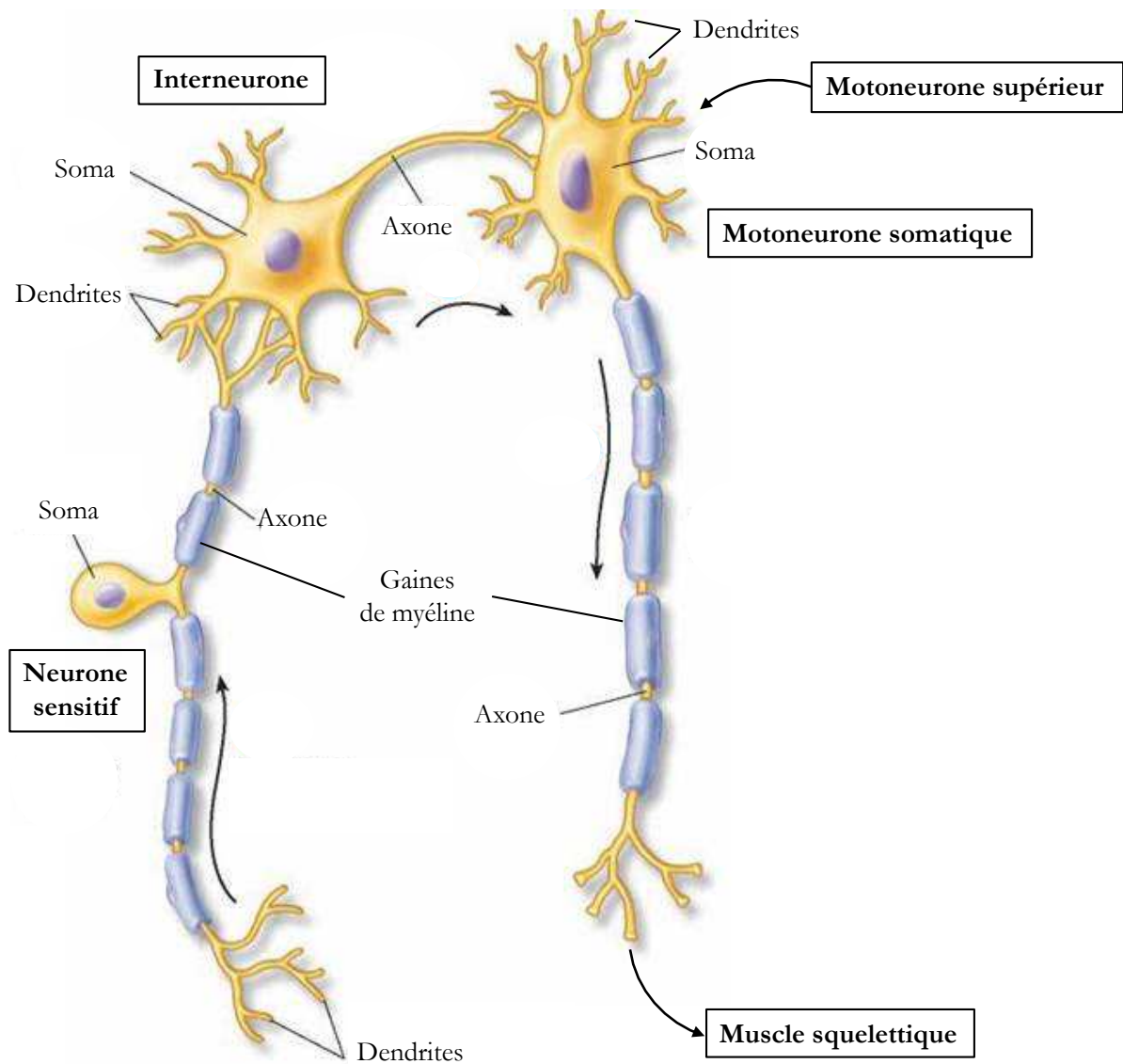


Figure 19 : Connexions synaptiques d'un MN somatique

Représentation schématique d'un MN recevant un signal afférent d'un neurone sensitif via un interneurone, ainsi que d'un MN supérieur. Le MN émet un signal nerveux efférent vers sa cible musculaire. Ces connexions sont représentées par des flèches. L'axone du neurone sensitif et du motoneurone sont entourés de myéline qui l'isole et améliore la conduction du signal.

3.1.1 Développement des MNs

Lors du développement du tube neural formant *in fine* le cerveau et la moelle épinière, les protéines sonic hedgehog morphogen (SHH) (Ericson et al., 1996; Roelink et al., 1994) et wingless-type MMTV integration site family (Wnt) (Alvarez-Medina et al., 2008)/bone morphogenetic protein family (BMP) (Mehler et al., 1997) sont exprimées selon un gradient dorso-ventral dans le

tube neural. Ce gradient est transduit en gradient d'activité des protéines GLI-Kruppel family (GLI). En effet, SHH se lie aux protéines patched homolog 1 receptor (PITCH1) (Stone et al., 1996) qui empêche la dégradation des protéines GLI (Niewiadomski et al., 2014) par smoothed homolog (SMO) (Quirk et al., 1997).

Inversement, l'absence de SHH induit une répression des protéines GLI (Wang et al., 2000). L'activité des protéines GLI induit ou réprime ensuite l'expression de protéines dites de Classe 1 ou 2, toujours selon un gradient dorso-ventral (Shirasaki & Pfaff, 2002). Les protéines de classe 1 et 2 ayant par ailleurs des interactions inter-répressives, 5 domaines progéniteurs se créent dans la partie ventro-médiane de la moelle épinière, dont le domaine progéniteur des MNs dont proviennent tous les MNs. Des 4 autres domaines (p0, p1, p2 et p3) naissent les différents interneurons (Briscoe et al., 2000) (figure 20).

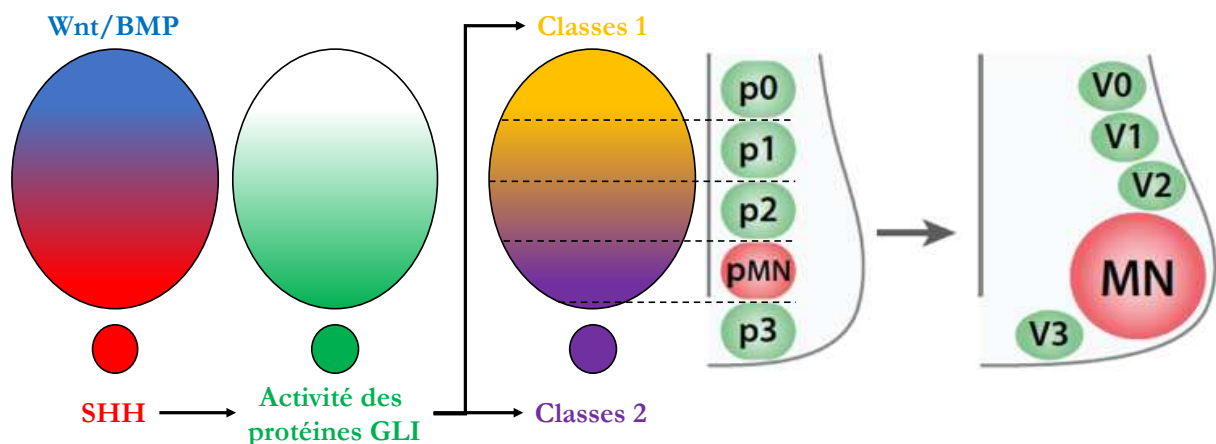


Figure 20 : Génération des domaines progéniteurs du tube neural

Le gradient SHH (rouge) s'oppose au gradient Wnt/BMP (bleu) le long de l'axe dorso-ventral. Ce gradient guide l'activité des protéines GLI (vert), qui influence l'expression des protéines de classes 1 (orange) et 2 (violet). Les profils d'expression de ces protéines guident la formation des 5 domaines progéniteurs (p0, p1, p2, pMN et p3). Tous les MNs viennent du domaine pMN (adapté de Ulloa & Martí, 2009).

Les progéniteurs MNs doivent ensuite sortir du cycle cellulaire et se différencier. D'une part, l'acide rétinoïque (RA) induit l'expression d'autres protéines nécessaires au programme de différenciation des MNs (Novitsch et al., 2003). D'autre part, les protéines 1 et 2 facteurs de transcription des oligodendrocytes (OLIG1&2) favorisent l'expression de la neurogénine 2 (*NEUROG2*) (Lu et al., 2002; Novitsch et al., 2001; Sommer et al., 1996) qui induit l'expression en aval d'autres gènes des MNs dont Homeobox 9 (Hb9) (Mizuguchi et al., 2001; Lee et al., 2009).

Hb9 étant par la suite capable de stimuler sa propre expression, il est très utilisé pour le marquage des MNs spinaux post-mitotiques (Tanabe et al., 1998).

Par la suite, la diminution de l'expression de NEUROG2 jumelée à la stabilité d'expression d'OLIG1&2 permet la différenciation d'autres cellules du domaine progéniteur MN en oligodendrocytes, des cellules avec un rôle de soutien pour les autres neurones de la moelle épinière (Lu et al., 2002; Zhou & Anderson, 2002). En sortant du cycle cellulaire, les MNs spinaux se détachent de l'épithélium neuronal et migrent latéralement (Rousso et al., 2012). Les MNs spinaux nouvellement formés doivent ensuite se spécialiser davantage, ils forment alors des colonnes le long de la moelle épinière.

3.1.1.1 Organisation des MNs en colonnes

L'expression de facteurs de croissance et de différenciation en gradient le long de l'axe rostro-caudal induit l'expression localisée des différents représentants de la famille homeobox (HOX) (Ensini et al., 1998; Liu et al., 2001). Le profil d'expression des protéines HOX est davantage raffiné par des interactions inter-répressives entre ces protéines (Dasen et al., 2003) ainsi que des modifications de la chromatine (Golden & Dasen, 2012). Ainsi, l'expression des protéines HOX dans les différents segments de la moelle épinière définit plusieurs colonnes motrices le long de l'axe rostro-caudal (Dasen et al., 2003). Chaque colonne motrice est définie par un profil d'expression génique unique et est impliquée dans l'innervation d'un système particulier (Francius & Clotman, 2014). Les différentes colonnes sont représentées dans la figure 21.

La moelle épinière est divisée en 4 parties : la moelle cervicale, thoracique, lombaire et sacrée. La colonne médiane motrice (MMC) innerve les muscles axiaux essentiels pour la posture du corps et s'étend donc sur toute la longueur de la moelle (Fetcho, 1987).

La colonne spinale accessoire (SAC), composée des MNs branchiaux qui innervent les muscles mastoïdiens et du cou, se trouve dans les 5 premiers segments de la moelle cervicale (Jacobson & Marcus, 2008).

La colonne phrénique motrice (PMC) se trouve entre les segments 3 et 5 de la moelle cervicale, elle innerve le diaphragme (Allan & Greer, 1997; Webber & Pleschka, 1976).

La colonne préganglionique motrice (PGC) s'étend sur toute la moelle thoracique ainsi que les 2 premiers segments de la moelle lombaire et les segments 2 à 4 de la moelle sacrée, les MNs viscéraux sont impliqués dans la stimulation des muscles lisses et la sécrétion des glandes. On

distingue les MNs viscéraux thoraciques qui innervent le SNA sympathique des MNs viscéraux sacrés qui innervent le SNA parasympathique.

La colonne hypaxiale motrice (HMC) s'étend sur toute la moelle thoracique et innerve les muscles intercostaux et abdominaux du thorax.

Enfin, la colonne latérale motrice (LMC) se trouve entre le 5^{ème} segment de la moelle cervicale et le 1^{er} segment thoracique ainsi que sur toute la partie lombaire, elle innerve les muscles des membres, ce qui explique sa séparation en deux au niveau des bras et des jambes (Furness, 2006; Gutman et al., 1993; Landmesser, 2001).

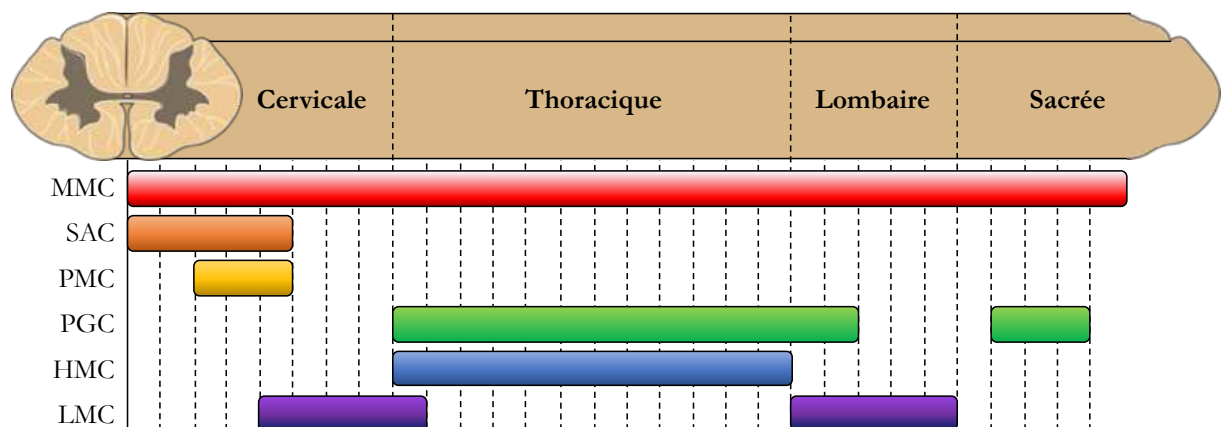


Figure 21 : Segmentation en colonnes des domaines motoneuronaux de la moelle épinière
La moelle épinière est divisée en 4 parties : la moelle cervicale, thoracique, lombaire et sacrée. MMC = c1-s5 ; SAC = c1-c5 ; PMC = c3-c5 ; PGC = t1-l2 et s2-s4 ; HMC = t1-t12 ; LMC = c5-t1 et l1-15 (adapté de Dasen & Jessell, 2009).

Au sein de chaque colonne, les MNs somatiques sont organisés en groupes, chaque groupe étant responsable de l'innervation d'un muscle spécifique. Cette spécification supplémentaire précise permet l'exécution de mouvements complexes (Romanes, 1941; Sullivan, 1962).

3.1.1.2 Organisation en groupes de MNs

Les groupes de MNs suivent une organisation topographique : plus un groupe est rostral, plus le muscle innervé est antérieur et proximal (Kania, 2014). L'appartenance d'un MN à un groupe particulier est guidée par des facteurs intrinsèques et extrinsèques (Dasen & Jessell, 2009). Les protéines Hox jouent là encore un rôle prépondérant. Associés à l'expression de facteurs de transcription spécifiques à chaque groupe, l'expression combinatoire des protéines Hox assure la spécification pour chaque groupe de MNs (Dasen et al., 2005; Philippidou & Dasen, 2013).

De plus, le facteur extrinsèque neurotrophique des cellules gliales (GDNF) est également impliqué dans ce processus (Haase et al., 2002). GDNF est un facteur physiologique trophique nécessaire à la survie des MNs (Henderson et al., 1994). Par un transport rétrograde depuis le muscle squelettique jusqu'aux MNs, GDNF assure le maintien et la spécialisation des MNs (Haase et al., 2002; Ito & Enomoto, 2016). Au sein de chaque groupe, les MNs acquièrent des spécificités propres à chacun qui découlent d'un code de facteurs de transcription influant sur la morphologie dendritique et axonale (Enriquez et al., 2015). Enfin, les MNs somatiques sont séparés en trois types aux propriétés morphologiques et fonctionnelles distinctes.

3.1.1.3 Types de MNs somatiques

3.1.1.3.1 MNs α

Les MNs α innervent exclusivement les fibres musculaires productrices de force, ou extrafusales. Le message efférent des MNs α , impliqués dans différentes unités motrices, est la principale source de la contraction musculaire et du mouvement corporel (Eccles et al., 1960). Il existe plusieurs types de fibres extrafusales : les fibres de type I, dites lentes et résistantes à la fatigue ; les fibres de type IIa, dites rapides et résistantes à la fatigue ; les fibres de type IIb, dites rapides et fatigables ; les fibres de type IIx, dites rapides et avec une résistance à la fatigue moyenne entre les deux autres types de fibres II (Schiaffino & Reggiani, 2011).

Au sein des MNs α , les MNs ont des morphologies variées adaptées à l'innervation et au recrutement des différents types de fibres selon le mouvement musculaire requis, chaque MN n'innervant qu'un unique type de fibres (Burke et al., 1973). Les MNs α sont par ailleurs innervés par les neurones sensitifs des fibres musculaires. Le message afférent des neurones sensitifs vers les MNs α permet la vitesse de contraction caractéristique du réflexe musculaire (Eccles et al., 1960).

3.1.1.3.2 MNs β et γ

Les MNs β innervent les fibres extrafusales et intrafusales, qui composent le fuseau musculaire portant les neurones sensitifs. Les MNs β sont cependant bien moins nombreux que les MNs α et sont donc assez peu décrits (Bessou et al., 1965). Les MNs γ innervent exclusivement les fibres intrafusales, ils n'ont donc aucun rôle direct dans la fonction motrice. En revanche,

comme les MNs β , ils augmentent la tension des fibres intrafusales et les rendent plus sensibles à la contraction des fibres extrafusales. Ainsi, les MNs β et γ confèrent au fuseau musculaire son rôle sensitif nécessaire à la proprioception (Eccles et al., 1960).

3.1.2 La transmission synaptique dans les MNs

La synapse est le contact fonctionnel entre deux neurones : l'axone du neurone émetteur, représentant la partie présynaptique, et la dendrite du neurone recevant l'information, représentant la partie postsynaptique.

De manière globale, il existe des synapses électriques et chimiques, différenciées par la nature des molécules transmises entre la partie présynaptique et postsynaptique. Dans les synapses électriques, le transfert d'ions entre les deux parties de la synapse est assuré par des jonctions serrées. Dans les synapses chimiques, des vésicules synaptiques produites par la partie présynaptique fusionnent avec la membrane présynaptique, relâchant dans la commissure entre les deux parties de la synapse les neurotransmetteurs qu'elles contenaient. Ces neurotransmetteurs se lient à des récepteurs spécifiques sur la membrane postsynaptique, induisant l'ouverture, ou la fermeture, de canaux ioniques à la membrane postsynaptique.

Pour les deux types de synapses, le flux ionique modifie la conductance et souvent le potentiel de membrane du neurone postsynaptique, favorisant ou enrayant la décharge d'un potentiel d'action par le neurone postsynaptique (Vaiserman & Lushchak, 2019). Les MNs supérieurs sont glutamatergiques, ce qui signifie que l'information qu'ils partagent avec les MNs spinaux passe par la libération de glutamate, un neurotransmetteur (Ivanhoe & Reistetter, 2004). Les récepteurs postsynaptiques au glutamate des MNs spinaux sont ionotropiques, c'est-à-dire qu'ils sont directement liés à des canaux ioniques, ou métabotropiques couplés à la protéine G, c'est-à-dire non couplés à des canaux ioniques mais qui provoquent leur ouverture par l'intermédiaire d'autres protéines.

Les MNs spinaux portent 3 récepteurs ionotropiques au glutamate : AMPA (acide propionique α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole), NMDA (N-méthyl-D-aspartate) et KA (kainate) (Seeburg, 1993). Les récepteurs AMPA sont les plus importants et relaient une information rapide et excitatrice au MN spinal, tandis que les récepteurs NMDA relaient l'aspect tardif de la transmission excitatrice (Collingridge & Lester, 1989) (figure 22).

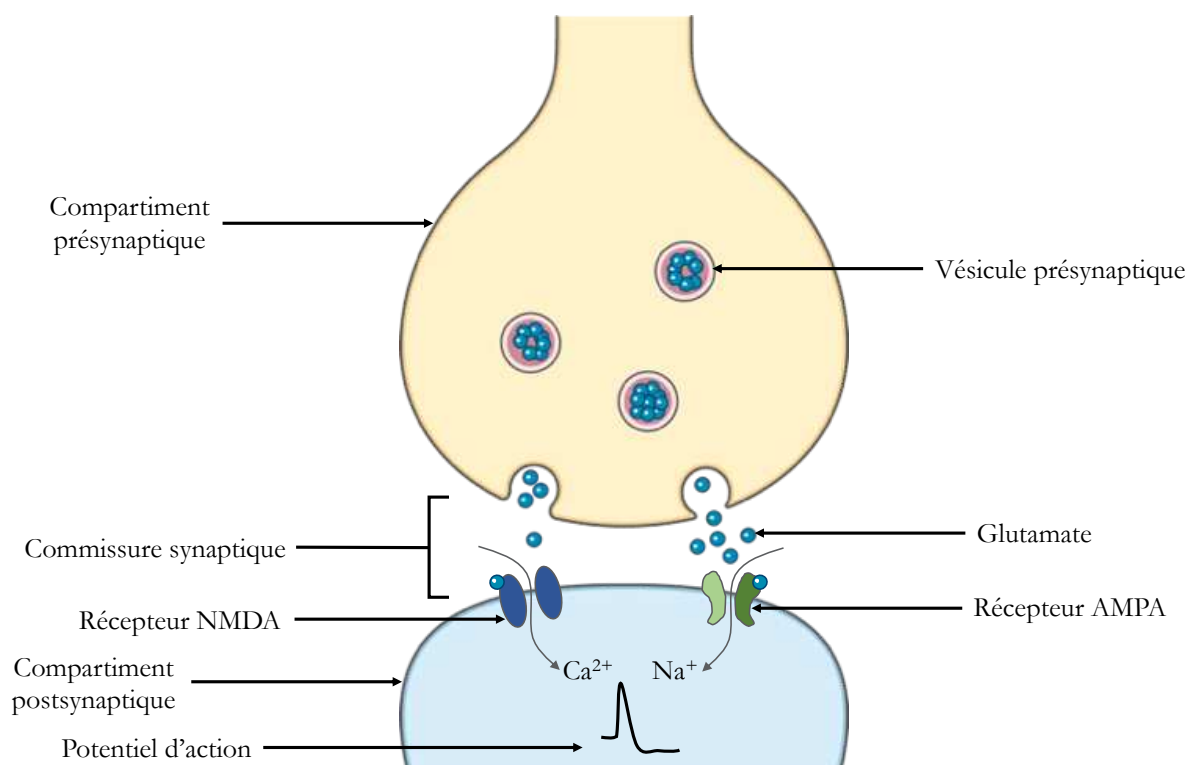


Figure 22 : Représentation schématique de la transmission synaptique entre un MN supérieur et un MN spinal

La synapse entre un MN supérieur et un MN spinal est chimique et glutamatergique. Les vésicules présynaptiques fusionnent avec la membrane présynaptique, relâchant le glutamate dans la commissure synaptique. Celui-ci provoque notamment l'ouverture des récepteurs NMDA et AMPA, induisant l'entrée d'ions Ca^{2+} et Na^{+} respectivement dans la synapse postsynaptique. L'influx d'ions participe à la génération d'un potentiel d'action par le MN spinal (adapté de Van Den Bosch, Van Damme, Bogaert, & Robberecht, 2006).

3.1.2.1 Cellules gliales, soutien des cellules neuronales

De la même manière que les neurones, les cellules gliales représentent environ la moitié des cellules du SNC (von Bartheld et al., 2016). Cela comprend notamment les astrocytes, les progéniteurs d'oligodendrocytes (OPCs), les oligodendrocytes et les microglies (Allen & Lyons, 2018). Les cellules gliales interviennent dans le développement du SNC, les microglies régulent ainsi la survie des cellules neuronales et phagocytent les neurones en excès produits au début du développement (Kierdorf & Prinz, 2017).

L'axone des MNs est recouvert de myéline (figure 19), la myélinisation dans le SNC par les oligodendrocytes augmente la vitesse de conduction du potentiel d'action et favorise la rapidité

d'exécution de la contraction musculaire (Almeida & Lyons, 2017). La synapse est le lieu de transit de l'information neuronale, sa formation est donc strictement régulée. Les astrocytes rendent d'abord les neurones immatures aptes à la synaptogenèse puis guident la formation de synapses immatures (Allen & Eroglu, 2017). Leur maturation passe par la réception de signaux gliaux, les microglies ayant également été associées à ce processus. (Reemst et al., 2016). Les synapses immatures ou en excès sont ensuite élaguées par les astrocytes et microglies, donnant aux neurones leur connectivité adulte (Filipello et al., 2018; Vainchtein et al., 2018).

Chaque astrocyte est également impliqué dans la communication et la plasticité de milliers de synapses, contrôlant la quantité de neurotransmetteurs disponible (Allen, 2014) ou empêchant les fuites vers d'autres synapses (Khakh & McCarthy, 2015).

Des modèles transgéniques altérant les microglies et les OPCs ont révélé qu'ils étaient également nécessaires pour la mise en place de la transmission synaptique (Almeida & Lyons, 2017; Salter & Stevens, 2017). Les cellules gliales interviennent aussi dans la transmission synaptique directement, les astrocytes par exemple éliminant les ions potassium de l'espace extracellulaire, accélérant la repolarisation des larges MNs spinaux α après un potentiel d'action, ce qui confère aux MNs le débit élevé de décharges nécessaire pour atteindre le pic de force musculaire (Kelley et al., 2018).

Les astrocytes assurent également la maintenance de la connexion synaptique motoneuronale en approvisionnant les MNs en facteurs de survie (Ekestern, 2004) mais aussi en éliminant l'excès de glutamate de la fente synaptique (figure 22) (Novelli et al., 1988). Enfin, les microglies, astrocytes et OPCs sont également impliqués dans le guidage axonal, étape clé de la mise en place de la transmission synaptique (Ginhoux & Prinz, 2015; Minocha et al., 2015). Dans le SNP, les cellules de Schwann (SC) font office de supports aux axones motoneuronaux, assurant leur survie et leur fonction en sécrétant des facteurs de survie et en les entourant de myéline (revu dans Sherman & Brophy, 2005).

3.1.2.2 Guidage axonal des MNs

Le guidage axonal est essentiel au développement des MNs somatiques car il permet la mise en place de la connexion synaptique entre le SNC et le muscle squelettique. Les axones des MNs émergent de la moelle épinière, transitent à travers différents tissus et se connectent à leur cible. Les différentes étapes du développement mettent en place une organisation hiérarchique des MNs qui influence directement leur innervation (Stifani, 2014). En effet, les colonnes motrices

destinent les MNs qui les composent vers une première catégorie de cibles possibles (cf. 3.1.1.1). Les cibles des MNs se précisent encore davantage avec leur appartenance à un groupe de MNs, puis avec leur type et enfin avec leurs caractéristiques morphologiques individuelles et des facteurs extrinsèques (cf. 3.1.1.2).

Le guidage axonal repose sur les capacités sensibles du cône de croissance, au bout de l'axone. Ce cône de croissance peut détecter des protéines de guidance axonale, exprimées selon des trajectoires et des temporalités prédéfinies afin de guider l'axone jusqu'à sa cible. Ces protéines se lient aux différents récepteurs protéiques sur le cône de croissance, influant sur sa trajectoire au travers du cytosquelette (Kolodkin & Tessier-Lavigne, 2011). Pour les MNs somatiques, 4 familles de protéines de guidance axonale ont été identifiées : les Nétrines, les Slits, les Sémaphorines et les Ephrines (Kolodkin & Pasterkamp, 2013).

Une fois qu'elles ont été captées sur un récepteur membranaire, elles doivent être intégrées par la cellule par endocytose. Une fois endocytées, les protéines de guidance axonale peuvent être recyclées, dégradées. Alternativement, elles peuvent être exocytées, ou sécrétées dans des exosomes, dérivées des corps multivésiculaires de la voie des endosomes tardifs. La traduction locale dépendant du transport des ARNm est un mécanisme centrale pour assurer la fonction du cône de croissance (Bashaw & Klein, 2010; Pasterkamp & Burk, 2021).

3.1.2.3 Transport des ARNm et traduction locale

Les MNs projettent leur axone sur de très longues distances, ce qui représente une difficulté pour maintenir l'homéostasie dans toute la cellule. Pour y pallier, la cellule possède des mécanismes de transport à direction antérograde et rétrograde des ARNm, permettant une traduction locale des protéines à leur lieu d'intérêt. Ce transport s'appuie sur la répartition globale du cytosquelette, composé majoritairement par les filaments d'actine et les microtubules (MT), formant une toile sur laquelle naviguent les structures portant les ARNm (Hirokawa et al., 2010). Les ARNm, dans des granules avec des protéines de liaison à l'ARN (RBP), majoritairement les ribonucléoprotéines hétérogènes nucléaires (hnRNP) et les hélicases DEAD-box (Kanai et al., 2004), sont ainsi transportés par les kinésines (Vale et al., 1985) et les dynéines (Lye et al., 1987), des moteurs moléculaires assurant le transport le long des MT à direction antérograde et rétrograde respectivement (Hirokawa et al., 1990). Le transport de ces granules repose également sur l'activité des myosines, qui se déplacent, elles, sur les filaments d'actine (Hammer & Sellers, 2012).

De plus, il a été montré que les granules peuvent profiter de la mobilité d'autres organelles en s'y liant pour se déplacer dans la cellule (Liao et al., 2019). Le transport associé aux MT des

ARNm, relié à la traduction locale, est un mécanisme central lorsque les maladies neurodégénératives sont souvent dues à des mutations dans les protéines associées aux MT (Deniston et al., 2020; Dubey et al., 2015), aux protéines motrices (Hirokawa et al., 2010), aux RBP (Ramaswami et al., 2013) et aux régulateurs de la traduction (Banerjee et al., 2018). De même, cette importance semble partagée au niveau musculaire, les MT étant essentiels pour le transport des ARN *in vivo* (Denes et al., 2021).

3.2 La jonction neuromusculaire

Les MNs somatiques interviennent dans des synapses chimiques particulières puisqu'elles relient le MN somatique, partie présynaptique, avec le muscle strié, partie postsynaptique. Cette synapse hautement spécialisée porte le nom de jonction neuromusculaire (JNM), ou plaque motrice (figure 23). Le MN somatique produit de l'acétylcholine (ACh) par l'activité de la choline acétyltransférase (ChAT) (Nachmansohn & Machado, 1943). L'ACh est ensuite empaquetée dans des vésicules présynaptiques qui s'accumulent près de la membrane, dans des zones actives (Südhof, 2012).

L'arrivée d'un potentiel d'action entraîne l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants dans la synapse présynaptique, qui induisent l'entrée de calcium dans la cellule. Ce flux entrant calcique entraîne la fusion, ou exocytose, des vésicules présynaptiques avec la membrane présynaptique par le complexe protéique Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptor (SNARE) des vésicules présynaptiques, relâchant l'ACh dans la commissure synaptique (Baker & Hughson, 2016).

L'ACh se fixe ensuite aux sous-unités α et δ ou ϵ des récepteurs à l'ACh (RACH) sur la partie postsynaptique musculaire, ce qui entraîne un changement de conformation des RACH et leur ouverture (Miyazawa et al., 2003). L'ouverture des RACH entraîne l'entrée de cations dans la partie postsynaptique, et l'ouverture de canaux sodiques voltage-dépendants à la membrane. L'effet groupé de ces canaux dépolarise la membrane et produit un potentiel de plaque. Lorsque le potentiel de plaque dépasse un certain seuil, il se propage à la fibre musculaire de manière bidirectionnelle, donnant naissance à un potentiel d'action de fibre musculaire.

Dans un contexte normal, le potentiel de plaque dépasse largement la valeur nécessaire pour produire un potentiel de fibre. Ce ratio est appelé facteur de sécurité et protège la transmission neuromusculaire des faibles altérations (Wood & R. Slater, 2001). Cette dépolarisation globale de la fibre entraîne la libération de calcium par le réticulum sarcoplasmique, première étape de la contraction musculaire. L'ACh est ensuite recyclée par l'acétylcholinestérase dans la commissure

synaptique afin d'éviter une dépolarisation trop longue et pour repolariser la membrane (Engel et al., 2015).

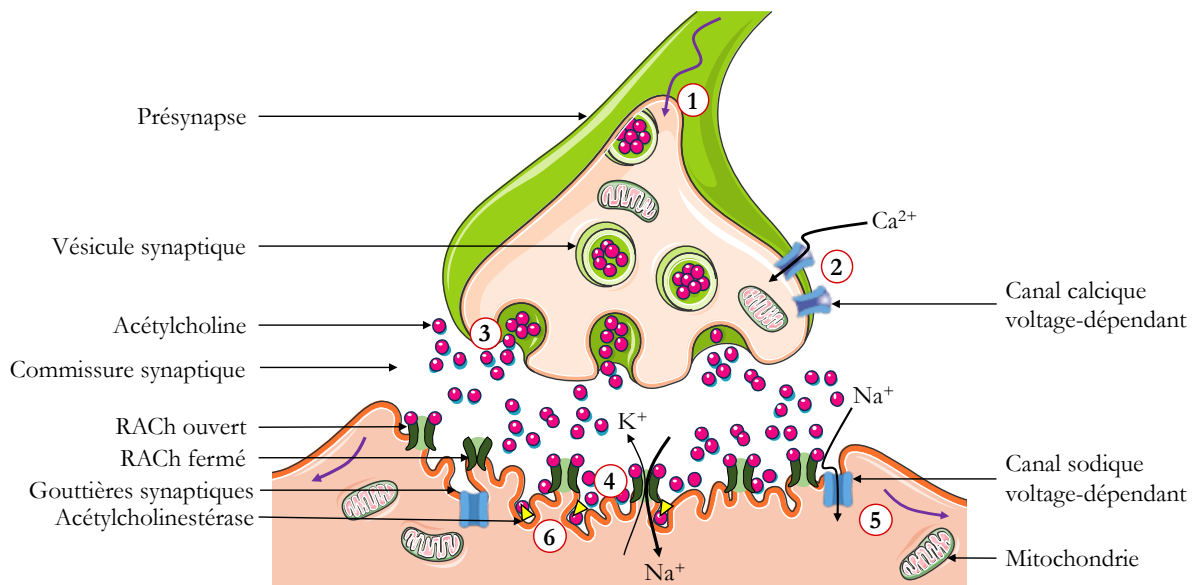


Figure 23 : Représentation schématique de la génération du potentiel de plaque à la JNM

Un potentiel d'action parcourt le MN somatique et atteint la terminaison axonale (1). Le potentiel d'action provoque l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants (2) qui induisent l'exocytose des vésicules synaptiques à la membrane, relâchant l'acétylcholine (ACh) dans la commissure synaptique (3). L'ACh se lie aux récepteurs aux RACH au niveau postsynaptique, provoquant leur ouverture. Les RACH ouverts permettent l'entrée dans la postsynapse d'ions Na^+ qui produisent un potentiel de plaque (4). Le potentiel de plaque entraîne l'ouverture de canaux sodiques voltage-dépendants qui dépolarisent encore plus la membrane par entrée d'ions Na^+ . Le potentiel d'action résultant se propage à toute la fibre musculaire, créant un potentiel de fibre musculaire (5). Après une courte latence, l'ACh rémanente est recyclée par l'acétylcholinestérase (6). Les potentiels électriques sont représentés par des flèches violettes.

3.2.1 Structure tripartite de la JNM

Par rapport à la taille des fibres musculaires, les JNMs sont de petites structures (environ $30\mu\text{m}$ de diamètre), chaque fibre de chaque muscle n'en portant qu'une seule. Classiquement, la JNM est divisée en trois parties majoritaires : l'axone terminal constituant la partie présynaptique, la partie postsynaptique au niveau de la fibre musculaire et la cellule de Schwann terminale (tSC) (Figure 24) (Omar & Bollu, 2019). Entre les parties présynaptique et postsynaptique, la commissure

synaptique est remplie d'une matrice extracellulaire spécialisée, nommée lamina synaptique basale, cruciale pour l'intégrité de la JNM. Elle représente en effet un soutien mécanique pour la synapse mais présente également des protéines impliquées dans des voies de signalisation impliquées dans le développement et le maintien de la JNM (Sanes, 2003). Par exemple, l'AChE s'attache à cette matrice grâce au Collagène Q (ColQ), spécifique de la lamina synaptique basale (Ohno et al., 1998).

3.2.1.1 La présynapse axonale

Les axones des MNs sont projetés depuis la moelle épinière vers chaque muscle squelettique cible. Chaque axone se ramifie dans sa partie terminale, innervant ainsi plusieurs fibres musculaires. A chaque synapse, l'extrémité de l'axone est dépourvue de gaine de myéline et forme le bouton synaptique, une petite protubérance qui constitue la partie présynaptique de la JNM (Desaki & Uehara, 1981). Le bouton synaptique est rempli de vésicules synaptiques qui contiennent l'ACh, produite dans le cytoplasme du bouton terminal à partir d'acétyl-COA et de choline par l'action de la ChAT (Nachmansohn & Machado, 1943).

3.2.1.2 La postsynapse

La partie postsynaptique de la JNM est formée par une portion épaissie de la membrane plasmique musculaire, le sarcolemme, qui se replie de façon à augmenter la surface de contact synaptique, formant les gouttières synaptiques. A leur crête, les gouttières synaptiques portent les RACH qui permettent la 1^{ère} dépolarisation de la membrane. Les canaux sodiques voltage-dépendants nichent au fond des gouttières synaptiques, l'influx sodique causé par leur ouverture induit la propagation du potentiel de plaque au reste de la fibre musculaire. séparée du bouton synaptique par la commissure synaptique (Ratliff et al., 2018).

Un RACH est formé de 5 sous-unités polypeptidiques : 2 sous-unités α (α_2), β , δ et ϵ chez l'adulte ou γ au cours du développement. Lors d'une dénervation de la JNM, on peut observer une réversion de la composition en sous-unités des RACH vers un profil fœtal (Gu & Hall, 1988). 2 molécules d'ACh se fixent sur le RACH, une entre les sous-unités α et ϵ/γ et l'autre entre les sous-unités α et δ , ce qui provoque un changement conformationnel du récepteur et l'ouverture du canal cationique (Popot & Changeux, 1984).

3.2.1.3 La cellule de Schwann

Différents types de cellules de Schwann (SC) enveloppent l'axone et, en tant que cellules gliales, elles sont impliquées dans le développement, le maintien et le fonctionnement de la JNM. Toutes les SC dérivent des cellules souches de la crête neurale, les SC myélinisantes et non myélinisantes se trouvent le long de l'axone et l'enveloppent avec et sans myéline respectivement. Les SC terminales (tSC) enveloppent le bouton synaptique, à proximité de la synapse (Darabid et al., 2014). Les tSC ne sont pas excitables électriquement mais peuvent détecter et intégrer des informations sous forme de neurotransmetteurs, l'ACh via des RACH muscariniques métabotropiques, ou de gliotransmetteurs, l'adénosine triphosphate (ATP) et le glutamate par exemple. La liaison de ces molécules induit l'augmentation de la concentration en calcium de la tSC qui transmet en réponse un signal rétrograde vers le MN (Darabid et al., 2014).

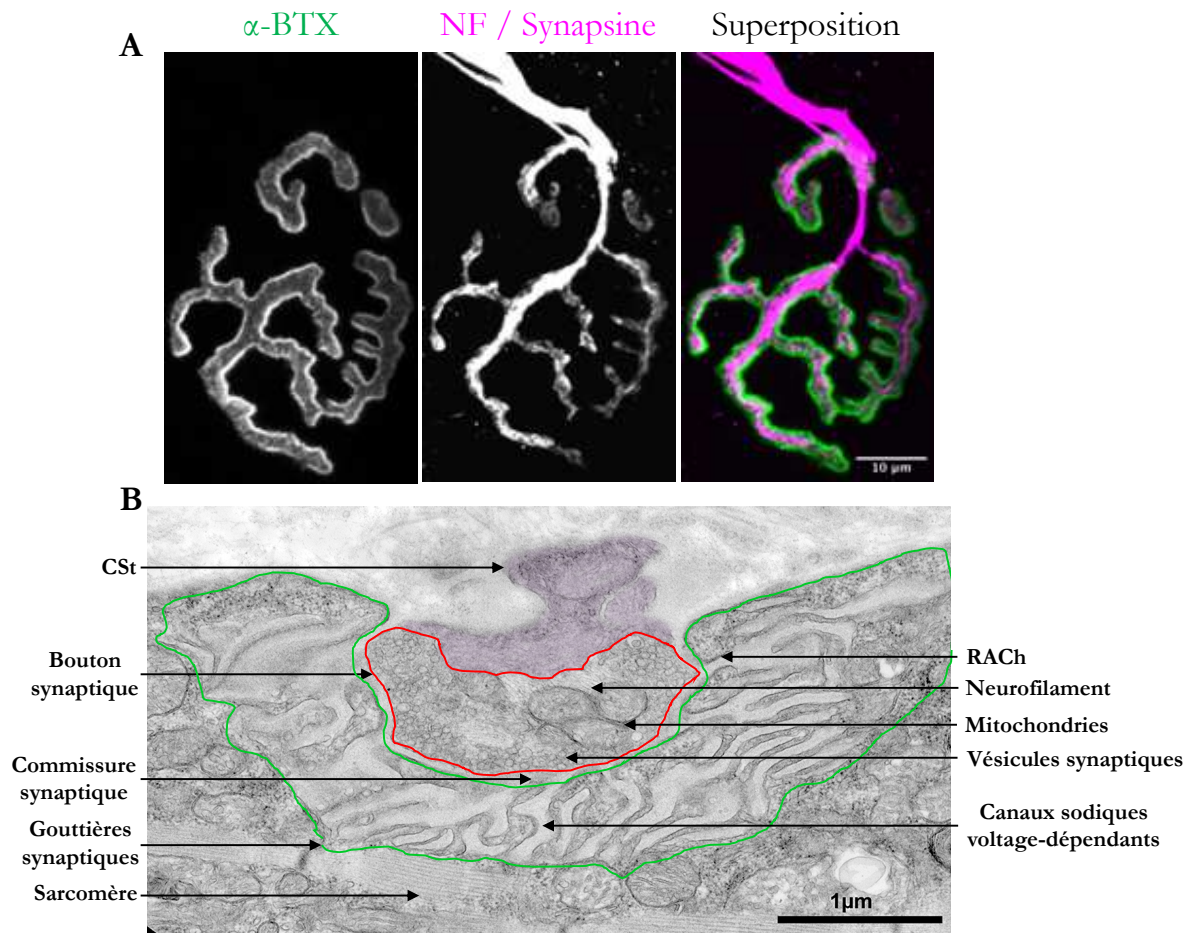


Figure 24 : Marquages de la JNM de la souris

La JNM est classiquement observée en microscopie optique par des marquages fluorescents (A) et par microscopie électronique à transmission (MET) (B). (A) Visualisation d'une JNM mature en « bretzel » par immunomarquage des RACH (vert) par la toxine botulique (α -bungarotoxine / α -BTX) et du neurofilament (NF) axonal ainsi que des vésicules synaptiques (Synapsine) (magenta). Les RACH forment des « clusters » sans zone de contact. L'axone innervant la JNM a un marquage d'intensité très prononcée par rapport à la synapsine. Les parties présynaptique et postsynaptique se superposent. (B) Visualisation d'une JNM mature par MET. La tSC est colorée en violet, le bouton synaptique et les gouttières synaptiques sont détournés en rouge et en vert respectivement. Entre ces deux zones se trouve la commissure synaptique. Les RACH sont repérables au sommet des crêtes synaptiques par une zone dense en électrons.

3.2.2 Développement de la JNM chez la souris

La grande majorité des études sur le développement de la JNM ont été effectuées chez la souris et la drosophile. Même si elles présentent de fortes similitudes avec les JNM humaines, les JNM murines sont plus grandes que les JNM humaines qui sont par ailleurs naturellement plus fragmentées (Jones et al., 2017). En outre, les gouttières synaptiques des JNM humaines sont caractérisées par le plus haut degré de repliement parmi les espèces étudiées jusqu'à présent (Slater, 2017).

3.2.2.1 Formation

La formation de la JNM commence au niveau musculaire au 11^{ème} jour du développement, avant l'innervation des muscles par les MNs. En effet, les fibres musculaires forment des versions primitives de « clusters » de RACH, majoritairement au milieu de la fibre musculaire (Kummer et al., 2006). Ce « pre patterning » musculaire implique les protéines musculaires de la kinase spécifique au muscle (MuSK) et la rapsyne, de manière indépendante au MN (Lin et al., 2001). Dans les jours suivants, les axones des MNs atteignent les fibres musculaires par guidage axonal, innervant les « clusters » de RACH précédemment formés et permettant leur développement. Les tSC co-migrent avec les cônes de croissance des MNs et sont impliqués dans le guidage axonal (Thompson & Buettner, 2006).

L'innervation axonale provoque également l'apparition de nouveaux « clusters », tandis que ceux non innervés disparaissent, entraînant une répartition médiane des JNM sur chaque fibre (McMahan, 1990). Cette répartition est permise par la sécrétion d'agrine neurale et d'ACh par le bouton synaptique qui stimulent et répriment respectivement le « clustering » des RACH (Lin et al., 2005). L'expression des gènes codant pour les composants de la JNM augmente dans les noyaux sous-synaptiques par rapport aux autres noyaux de la fibre musculaire (Schaeffer et al., 2001). La voie majeure impliquée dans la formation de la JNM et de « clustering » des RACH est la voie de signalisation Agrine-Lrp4-MuSK.

3.2.2.1.1 « Clustering » des RACH et voie de signalisation Agrine-Lrp4-MuSK

L'agrine est une protéine de plus de 200 kDa produite selon différentes isoformes associées à sa localisation. L'agrine neurale est exclusivement exprimée par les MNs et sécrétée dans la commissure synaptique où elle interagit notamment avec la protéine low-density lipoprotein

receptor-related protein 4 (Lrp4). Le domaine globulaire laminin-like 3 que porte l'agrine neurale est suffisant pour activer MuSK. Ce domaine n'est pas présent sur l'agrine musculaire et l'agrine neurale est 5000 fois plus efficace que sa version musculaire pour induire le « clustering » des RACH (Ruegg & Bixby, 1998). Ainsi, par la suite, l'agrine neurale sera simplement dénommée « agrine ».

L'agrine se lie au récepteur transmembranaire Lrp4, formant un complexe tétramérique qui promeut l'activation et la transphosphorylation de MuSK, (Zhang et al., 2008; Zong et al., 2012). L'activation par ce complexe nécessite par ailleurs l'intervention de la kinase-7 en aval (Dok7), une protéine ligand adaptor-like. En effet, Dok7 se lie, par l'intermédiaire de son domaine de liaison aux phosphotyrosines (PTB), à la Tyrosine 553 phosphorylée de MuSK (Okada et al., 2006). Le domaine d'homologie aux pleckstrines (PH) de Dok7 induit sa dimérisation et celle de MuSK, facilitant sa transautophosphorylation (l'autophosphorylation d'autres résidus tyrosine de MuSK) (Bergamin et al., 2010).

Le mécanisme de phosphorylation de la tyrosine 553 n'est cependant pas connu. Les acteurs principaux de la voie de signalisation Agrine-Lrp4-MuSK sont schématisés dans la figure 25.

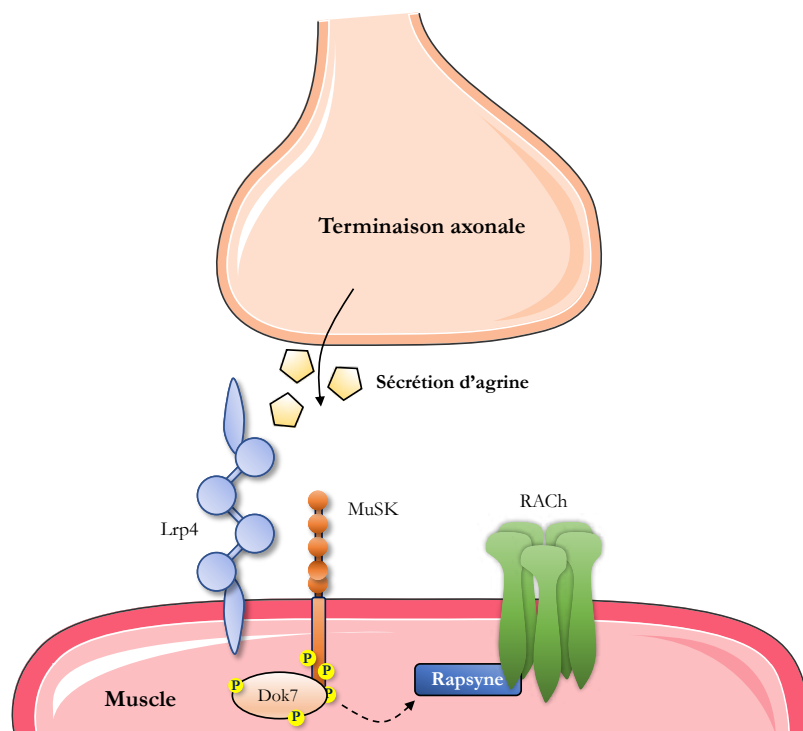


Figure 25 : Représentation schématique du déclenchement de la voie de signalisation Agrine-Lrp4-MuSK

L'agrine sécrétée par la terminaison axonale se lie à Lrp4 et, avec Dok7 phosphorylé, permet l'activation de MuSK. MuSK phosphorylé active une multitude de protéines en aval, comme la rapsyne, qui induisent le « clustering » des RACH (Adapté de Ohkawara et al., 2020).

3.2.2.1.2 Acteurs en aval de MuSK

L'activation de MuSK induit ensuite le « clustering » des RACH et la formation de la jonction par des voies de signalisation en aval. Comme MuSK, Dok7 est lui aussi phosphorylé, ce qui lui permet de recruter les protéines adaptatrices Crk et Crk-L (Hallock et al., 2010). De plus, les protéines Sorbs1 et Sorbs2 interagissent avec cette dernière, leur activité étant nécessaire au « clustering » des RACH (Hallock et al., 2016).

La rapsyne est une protéine clé du « clustering » des RACH en tant que lien entre les RACH et le cytosquelette par l'intermédiaire du complexe glycoprotéique associé à la dystrophine (DGC) (Apel et al., 1995; Moransard et al., 2003). La rapsyne possède une activité de ligase E3, essentielle pour le « clustering » des RACH. Ce domaine peut lui conférer des activités de neddylation ainsi que d'ubiquitination et de sumoylation par la lysine 63, mais l'activité précise *in vivo* de ce domaine n'est pas encore claire (Li et al., 2016). Une autre protéine, *Dishevelled-1* (Dvl1), interagit avec MuSK et régule le « clustering » des RACH. Dvl1 étant impliqué dans la voie Wnt, son rôle dans le développement de la JNM a été étudié (Luo et al., 2002).

3.2.2.1.3 Voie de signalisation Wnt

Comme mentionné plus haut, la voie Wnt est impliquée dans une quantité phénoménale de processus biologiques. La régulation par les protéines Wnt commence par une liaison aux protéines Frizzled, recrutant la protéine Dvl1. Plusieurs Wnt semblent impliqués dans le « pre patterning » musculaire et le « clustering » des RACH (notamment Wnt3, Wnt4 et Wnt11) (Zhang et al., 2012; Henriquez et al., 2008; Strohlic et al., 2012). Cette régulation semble nécessiter le domaine riche en cystéine (CRD) de MuSK, homologue au domaine des protéines Frizzled (Messéant et al., 2015).

Au niveau présynaptique, Wnt7A et Wnt7B, exprimés dans les MNs, sont essentiels au développement de la partie présynaptique de la JNM (Shen et al., 2018). La voie canonique inclut l'augmentation de l'expression de la β -Caténine, un activateur transcriptionnel (Komiya & Habas, 2008). Pour le développement de la JNM, elle semble posséder, comme d'autres acteurs de la JNM, un mode d'action rétrograde (M. Li et al., 2008).

3.2.2.1.4 Voies de signalisation rétrogrades

Le développement des parties pré- et postsynaptiques de la JNM est strictement coordonné, ce qui indique une réciprocité des signaux entre ces deux compartiments. La β -Caténine est un activateur transcriptionnel clé de la voie canonique Wnt (Cadigan & Nusse, 1997). Sa déplétion muscle-spécifique induit des défauts morphologiques dans le bouton synaptique (Li et al., 2008), possiblement par la dérégulation de Slit2, une protéine du guidage axonal (Jaworski & Tessier-Lavigne, 2012).

Au-delà de son rôle dans la voie Agrine-Lrp4-MuSK, Lrp4 est également nécessaire en tant que signal rétrograde pour la différenciation du bouton synaptique (Yumoto et al., 2012). La laminine β 2, une protéine de la lamina synaptique basale, intervient dans la maturation des canaux calciques voltage-dépendants présynaptiques (Chand et al., 2015) et sa déplétion induit des défauts présynaptiques (Noakes et al., 1995). Enfin, GDNF, mentionné précédemment (cf. 3.1.1.2), est un facteur neurotrophique impliqué également dans le développement de la JNM (Keller-Peck et al., 2001) et dont la sécrétion rétrograde semble dépendre des protéines précurseurs de l'amyloïde (APP) exprimées dans le muscle (Stanga et al., 2016).

3.2.2.1.5 Elimination des RACH aneuxaux

L'innervation axonale des fibres musculaires induit non seulement la formation des JNM mais également la dispersion des « clusters » primitifs de RACH qui ne sont pas innervés. Cette inhibition est médiée par l'activité musculaire et plus précisément par la sécrétion d'ACh (An et al., 2010). L'ACh se lie aux RACH, induisant une entrée de calcium dans le compartiment postsynaptique, activant la protéine Calpain. Celle-ci clive p35, le ligand de la Cycline 5 dépendante d'une kinase (Cdk5) en p25, stimulant son activité (Chen et al., 2007; Patrick et al., 1999). Ce mécanisme induit le remodelage du cytosquelette et induit la dispersion des RACH aneuxaux (Xie et al., 2006). L'influx calcique provoqué par la liaison de l'ACh aux RACH semble également réprimer le « clustering » des RACH par activation de la voie de la protéine kinase C (PKC) et de la kinase II dépendant de Ca^{2+} /calmoduline (CAMKII) (Li et al., 1992; Macpherson et al., 2002). Enfin, l'activité musculaire peut également induire le clivage de Dvl1 mentionné précédemment, ce qui pourrait contribuer à l'élimination des RACH aneuxaux (Wang et al., 2014).

3.2.2.2 Maturation de la JNM

Une fois formée, la synapse musculaire doit mûrir afin d'adopter sa structure définitive. Au cours de cette période, la plaque motrice s'élargit et le sarcolemme s'invagine, augmentant la surface de contact avec la lame basale synaptique, formant les gouttières synaptiques (Lichtman & Colman, 2000). Au cours de son développement, lorsqu'observée par des immunomarquages, la JNM passe d'un aspect rond et plein à une forme perforée en bretzel (figure 26) (Slater, 1982).

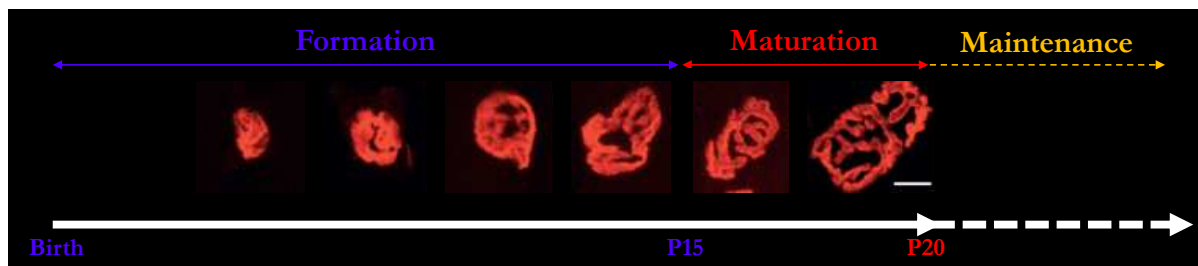


Figure 26 : Evolution morphologique de la JNM au cours du développement

La JNM se développe et s'étend au cours du développement. Les RCh adoptent, au cours de leur maturation, une forme perforée en bretzel (Adapté de Shi, Fu, & Ip, 2012).

Au stade développemental, à la suite de l'innervation axonale des fibres musculaires, plusieurs axones peuvent innerver la même plaque motrice. Ces innervations surnuméraires sont graduellement perdues au cours de la maturation de la JNM, ne laissant au final qu'un axone par plaque motrice (Brown et al., 1976). Le choix de la synapse semble basé sur l'activité synaptique, l'axone du MN le plus actif étant conservé. Les activités asynchrones des différents MNs à la même plaque stimulent le déroulement de l'élagage synaptique. Ce processus semble prendre forme au niveau postsynaptique, le blocage des RCh de manière localisée entraînant la résorption de l'axone à ce niveau (Balice-Gordon & Lichtman, 1994; Favero et al., 2012).

Les tSC jouent un rôle important dans ce mécanisme, engloutissant les débris laissés par l'axone retiré (Bishop et al., 2004). Puis, le bouton synaptique restant s'étend, occupant toute la plaque motrice (Turney & Lichtman, 2012). Au niveau moléculaire, la neuréguline 1 (Nrg1) axonale promeut l'action des tSC pour l'élagage synaptique (Lee et al., 2016). Le cytosquelette et le transport par les MTs semble impliqué dans l'élagage synaptique, des acteurs moléculaires impliqués dans ces processus ayant été identifiés (Brill et al., 2016; Roche et al., 2014).

Au cours de la première semaine après la naissance, les RACH nicotiques composés jusqu'alors des sous-unités $\alpha 2$, β , δ et γ acquièrent leur forme adulte, composée des sous-unités $\alpha 2$, β , δ et ϵ . Cette transition depuis la forme fœtale augmente la conductance au calcium des RACH (Missias et al., 1996).

3.2.3 Maintien, régénération et vieillissement de la JNM

3.2.3.1 Maintien de la JNM

Le fonctionnement de la JNM est assuré par la coordination des trois parties qui la composent. Le dysfonctionnement d'un composant de la synapse peut donc en altérer le maintien (Couesnon et al., 2013). La concentration importante des RACH est assurée par leur « clustering » et le recyclage continu des RACH (Bruneau et al., 2005). De nombreuses protéines sont impliquées dans le maintien de cet état. L' α -syntrophine, via l'action de l' α -dystrobrevine 1 phosphorylée et des protéines du DGC sont essentielles pour ce processus (Martinez-Pena y Valenzuela et al., 2011; Schmidt et al., 2011).

La protéine α kap, encodée dans le gène CaMKII, semble protéger les RACH face à une dégradation par le système ubiquitine/protéasome (Mousslim et al., 2012). Les voies des protéines kinases A et C ont des effets antagonistes sur la concentration des RACH à la JNM. La première assure une forte densité de RACH aux crêtes synaptiques tandis que la seconde stimule leur dispersion (Martinez-Pena & Valenzuela et al., 2013).

La perte de fonction des RACH muscariniques induit des altérations de la maintenance de la JNM (Wright et al., 2009).

Les MNs viscéraux, impliqués dans l'innervation du SNA sympathique, établissent des contacts avec la JNM et semblent participer à son maintien par activation des $\beta 2$ -adréno-récepteurs musculaires (Khan et al., 2016).

La voie de signalisation Agrine-Lrp4-MuSK n'est pas impliquée que dans la formation de la JNM. En effet, des modèles ou expériences de déplétion de l'agrine (Samuel et al., 2012), de Lrp4 (Barik et al., 2014), de Dok7 (Eguchi et al., 2016) et de MuSK, directement (Kong et al., 2004) ou par l'intermédiaire de la protéine ligand biglycan (Amenta et al., 2012), ont montré que l'action de ces protéines était essentiel au maintien de la JNM. Enfin, une étude a montré que l'ablation, après maturation de la JNM, des tSC chez des souris induit des défauts globaux de la plaque motrice (Barik et al., 2016).

3.2.3.2 Régénération de la JNM après une blessure nerveuse

Les tSC ont également un rôle pivot dans le processus de régénération de la JNM. Des expériences d'écrasement de nerfs ont révélé que les axones des MNs se régénèrent selon leur trajectoire d'origine le long des tubes des tSC (Kang et al., 2014; Nguyen et al., 2002). Lorsqu'un nerf est sectionné, les tSC s'activent et s'étendent au sein de la commissure synaptique, encerclant le reliquat du bouton synaptique.

Par ailleurs, les tSC des JNMs dénervées mettent en place des ponts synaptiques avec d'autres JNMs. De l'axone intact émergent des excroissances synaptiques qui sont guidées par le pont synaptique vers la plaque motrice dénervée pour rétablir la transmission synaptique, démontrant la plasticité axonale (Son & Thompson, 1995). Le processus de dénervation provoque la production par les tSC de facteurs de survie motoneuronale et de régénération axonale comme GDNF, le facteur neurotrophique issu du cerveau (BDNF) et le facteur de croissance nerveux (NGF) (Heumann et al., 1987; Meyer et al., 1992; Naveilhan et al., 1997).

3.2.3.3 L'évolution de la JNM avec l'âge

Le vieillissement s'accompagne d'une diminution progressive de la masse et de la force musculaires, selon un processus appelé sarcopénie. L'altération de nombreux mécanismes interdépendants ont été associés à la sarcopénie : l'activité physique, la résistance aux processus anaboliques, l'inflammation ou encore la transmission neuromusculaire (Tournadre et al., 2019). Chez la souris, le vieillissement s'accompagne d'une déficience globale des JNM avec de la dénervation totale ou partielle selon les fibres (Chai et al., 2011), une fragmentation des *clusters* de RACH accompagnée d'une diminution de la densité de ces récepteurs, de l'apparition d'excroissances synaptiques et de gonflements axonaux (Valdez et al., 2010).

Les causes de ces altérations ne sont pas bien identifiées. Chez la souris, la perte de MN avec l'âge est controversée et n'a pas été impliquée de manière univoque. L'autophagie décline au cours du vieillissement et son inhibition a été reliée à des défauts structurels et fonctionnels de la JNM (Carnio et al., 2014). Il est donc difficile de déterminer si la dégradation de la JNM au cours du vieillissement est causée par la sarcopénie ou si elle joue un rôle dans l'établissement de cette pathologie. De plus, les JNMs humaines sont très stables au cours du vieillissement, contrairement aux JNMs murines (Jones et al., 2017), montrant que les conclusions faites chez la souris, concernant la sarcopénie, doivent être considérées avec précaution.

3.3 Muscle squelettique et couplage excitation-contraction

La génération du potentiel d'action musculaire provoque la contraction musculaire via un processus nommé couplage excitation-contraction (Kahn & Sandow, 1950; Sandow, 1952). Celui-ci repose sur des variations rapides dans la cellule musculaire de la concentration en calcium (Niedergerke, 1955). En effet, le potentiel d'action induit une libération rapide de calcium par le réticulum sarcoplasmique (RS) dans le sarcoplasme, qui provoque la contraction musculaire (Caputo & Gimenez, 1967; Ebashi et al., 1969). Ensuite, le calcium est réintégré dans le RS (Winegrad, 1968). Pour décrire plus précisément les étapes conduisant à la production de la force musculaire au niveau d'une fibre, le potentiel d'action se propage de manière longitudinale dans la fibre et de manière radiale le long des tubules transverses (tubules T) (Huxley, 1964). Le potentiel d'action atteint ainsi l'intérieure de la fibre où le tubule T est entouré par le RS, ou citernes terminales qui forment la triade (Peachey, 1965).

La dépolarisation de la membrane sarcoplasmique provoque un changement conformationnel des récepteurs à la dihydropyridine (DHPR) et l'ouverture des récepteurs à la ryanodine (RyR) avec lesquels ils forment des tétrades (Protasi, 2002). L'ouverture des RyR entraîne la libération de calcium par le RS (Smith et al., 1988). Le Ca^{2+} interagit ensuite avec la troponine C, éliminant l'inhibition de de la troponine I et de la tropomyosine sur l'interaction entre les filaments d'actine et de myosine. Les filaments d'actine glissent alors sur les filaments de myosine, produisant la tension musculaire (Huxley, 1969). Le Ca^{2+} est ensuite réintégré dans le RS par la protéine pompe ATPase calcique du RS (SERCA) avec l'aide notamment de la parvalbumine (Baylor & Hollingworth, 2011). Le mécanisme du couplage d'excitation-contraction est schématisé par la figure 27.

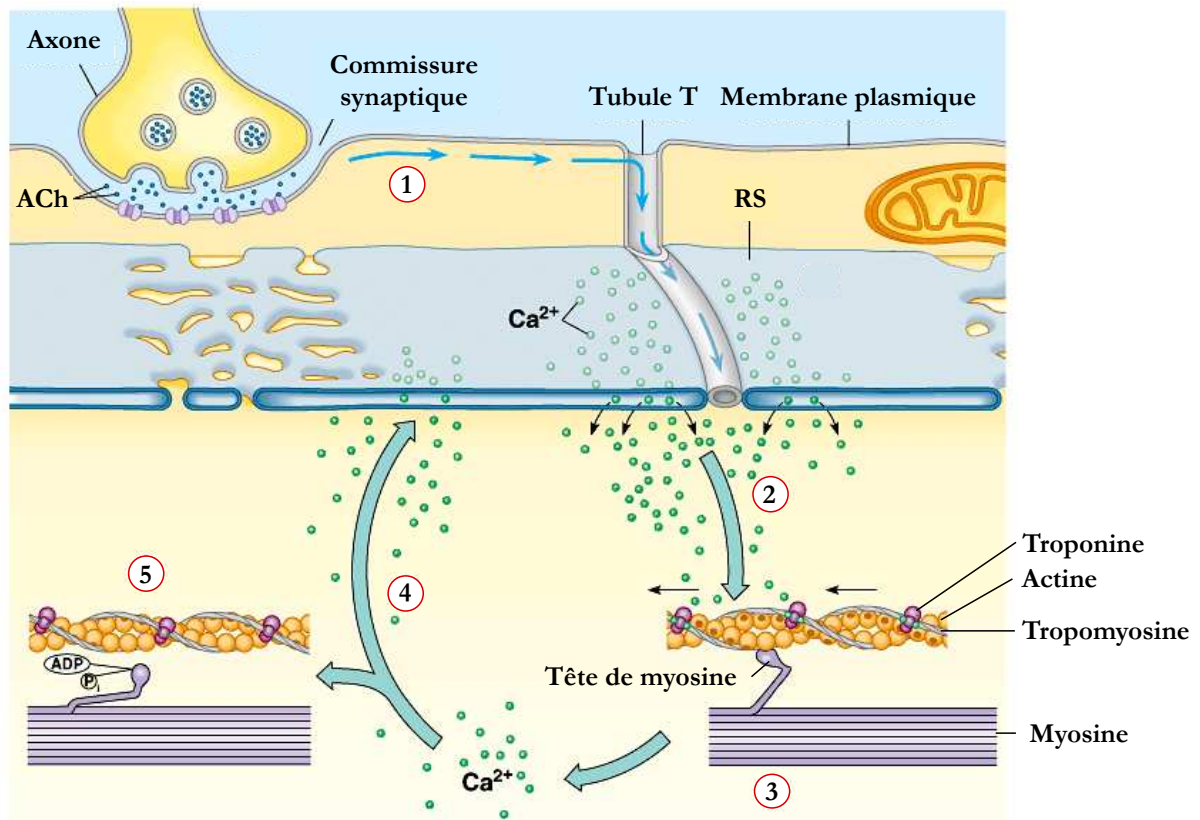


Figure 27 : Représentation schématique du couplage excitation-contraction

Le potentiel d'action généré par la JNM parcourt la fibre de manière longitudinale et radiale au travers des tubules T (1). Le potentiel d'action induit la libération de Ca^{2+} par le RS (2). Le Ca^{2+} libère les filaments d'actine de l'inhibition de la troponine et de la tropomyosine, induisant le glissement des filaments d'actine sur les têtes de myosine (3). Le Ca^{2+} est réintégré dans le RS (4), rétablissant l'inhibition sur les filaments d'actine (5) (adapté de Campbell, Mitchell, & Reece, 2000).

3.4 Altération du MN et de la JNM dans la DM1

La DM1 étant une pathologie neuromusculaire, les atteintes du muscle, et plus récemment du cerveau, ont été étudiées de manière extensive, comme décrit précédemment. Cependant, les défauts des autres composants de l'unité motrice, à savoir le MN et la JNM, restent assez peu caractérisés dans le cadre de cette maladie. Pourtant, les études faites chez les patients DM1, mais aussi sur des modèles *in vivo* et *in vitro* de la maladie, suggèrent des défauts de communication au sein de l'unité motrice, lesquels pourraient participer au mécanisme physiopathologie de la DM1 (Bombelli et al., 2016).

De très rares études ont été menées au niveau de la moelle épinière et du système nerveux périphérique chez les patients DM1. Une étude menée sur 5 patients DM1 a montré qu'il n'existait pas de perte de motoneurones spinaux suggérant ainsi que la pathologie musculaire de la DM1 n'est pas le résultat d'une perte massive de ces neurones comme observé dans d'autres pathologies comme la sclérose latérale amyotrophique (SLA) (Walton et al., 1977). Cependant, la présence de foci CUG a été identifiée post-mortem dans les MNs spinaux de patients DM1. Ces foci CUG colocalisent avec les protéines MBNL1, suggérant la séquestration et la perte de fonction de MBNL dans ce type cellulaire (Wheeler, Krym, et al., 2007).

Des altérations fonctionnelles et morphologiques des axones des MNs chez les patients ont également été observées (Cros et al., 1988; Krishnan & Kiernan, 2006). *In vitro*, des défauts de formation des axones ont été décrits dans des cellules souches pluripotentes reprogrammées en MN, associés avec des défauts de formation de la JNM (Marteyn et al., 2011). Enfin, une étude cellule-spécifique a récemment révélé des altérations de l'épissage alternatif dans des MNs spinaux de patients DM1, lesquelles sont associées à des défauts morphologiques des neurites (Nakamori et al., 2022).

Au niveau de la JNM, les études morphologiques de ces structures chez les patients DM1 datent d'il y a plus de 40 ans. Elles ont mis en évidence des anomalies d'arborisation, une réduction de la densité des vésicules présynaptiques et un élargissement des plaques motrices (Coers et al., 1973; Allen et al., 1969; Fardeau & Tomé, 1980; Macdermot, 1961). Ces défauts semblent être reliés à la présence de longues répétitions CTG. En effet, des défauts de la JNM ont été montrés dans le diaphragme du modèle murin DMSXL, exprimant le gène *DMPK* humain avec plus de 1000 répétitions CTG (Panaite et al., 2013).

De telles observations ont également été décrites au niveau du muscle tibial antérieur (TA) dans un modèle de souris invalidées de manière ubiquitaire pour *Mbnl1* et *Mbnl2* (MBNL1^{-/-} ; MBNL2^{+/-}) (Lee et al., 2013), suggérant que les défauts de la JNM dans la DM1 sont attribuables à la perte de fonction de MBNL1 et MBNL2 . Enfin, la déplétion de *mbn-1*, homologue de MBNL1, dans un modèle *C.elegans* perturbe la formation des JNMs et celle-ci n'est restaurée qu'avec une surexpression de la protéine au niveau présynaptique, alors que la surexpression dans le muscle n'a aucun effet (Spilker et al., 2012).

En revanche, des défauts de l'épissage alternatif de l'exon 6 de MuSK et de la sous-unité gamma du RACH ont été décrits dans des cellules musculaires dérivées de fœtus avec plus de 1000 répétitions CTG et de patients DM1 respectivement (Klinck et al., 2014). Ces altérations suggèrent que les répétitions dans le muscle squelettique peuvent contribuer aux défauts de la JNM dans la DM1. L'ensemble de ces études suggère donc que la perte des protéines MBNL pourrait participer aux défauts de communication neuromusculaire décrits chez les patients. Incidemment, le MN et la JNM pourraient être impliqués dans la mise en place du mécanisme pathologique de la DM1.

Problématique et objectifs

La DM1 est due à des expansions de répétitions CTG dans le 3'UTR du gène *DMPK* (Brook et al., 1992). Cette anomalie a été reproduite chez la souris, donnant lieu à des modèles qui récapitulent une grande partie des défauts caractéristiques de la pathologie (Wang et al., 2007; Gomes-Pereira et al., 2007; Mankodi et al., 2000; Orenge et al., 2008). Parmi les mécanismes dérégulés par les foci générés par l'agrégation des ARN *DMPK* mutés, la séquestration et perte de fonction des protéines de liaison à l'ARN *MBNL* provoque des défauts globaux du métabolisme des ARNs, comme ont pu le démontrer de nombreux modèles de déplétion de ces protéines (Charizanis et al., 2012; Goodwin et al., 2015; Lee et al., 2013; Kanadia, Johnstone, et al., 2003). Ces études ont ainsi pu identifier des cibles ARN de la régulation des protéines *MBNL* dont l'altération conduit à l'émergence de défauts similaires aux symptômes développés par les patients DM1.

En effet, la DM1 est une maladie neuromusculaire dégénérative dont les composantes musculaires, et plus récemment cognitives, ont été étudiées de manière extensive (Harper, 2001). En revanche, le mécanisme pathologique à l'origine des défauts dans la DM1 (cf. partie 3.3) du lien entre le SNC et le muscle squelettique que représente l'unité motrice, formée du MN et de la JNM, n'a pas été clairement défini. L'identification de foci colocalisant avec *MBNL* dans des MNs issus de biopsies post-mortem de moelle épinière de patients DM1 et au niveau des noyaux sous-synaptiques de la JNM chez des patients DM1 (Wheeler, Krym, et al., 2007) suggère que *MBNL* pourrait être séquestré dans les MNs, provoquant sa perte de fonction et conduisant à des défauts de communication neuromusculaire décrits dans la pathologie. Cette hypothèse soulève la question suivante : quel est le rôle de *MBNL* dans les MNs sur l'homéostasie et la fonction musculaire ?

Afin d'y répondre nous avons appliqué une démarche similaire aux études mentionnées précédemment en générant un modèle murin de déplétion des protéines *MBNL1* de manière ubiquitaire et *MBNL2* spécifiquement dans le MN (*MBNL3* n'étant que très peu exprimé dans le SNC) (Goodwin et al., 2015; Lee et al., 2013; Lee et al., 2022). Pour cela, nous avons délété l'exon 2 de *MBNL2* contenant l'ATG de traduction par expression de la Cre recombinase sous contrôle du promoteur Hb9 MN-spécifique dans des souris. La caractérisation de ces souris avait 2 objectifs principaux : 1) déterminer les conséquences physiologiques de la perte de fonction de *Mbnl1* et *Mbnl2* dans les MNs sur les différents composants de l'unité motrice, c'est-à-dire le MN, la JNM et le muscle squelettique ; et 2) identifier les cibles ARN régulées par les protéines *MBNL* dans les MNs. Notre démarche vise à montrer l'importance de *MBNL* dans les MNs et son rôle potentiel

dans la physiopathologie de la DM1 mais aussi donner des pistes sur l'origine moléculaire des altérations de l'unité motrice dans la DM1. Les résultats obtenus au cours de cette étude fait l'objet d'un article en cours de préparation (cf. p89)

Résultats

Article en préparation

MBNL deficiency in spinal motor neurons compromises neuromuscular junction maintenance and walking coordination: involvement for Myotonic Dystrophy

Charles Frison-Roche¹, Steve Cottin¹, Jeanne Lainè¹, Ludovic Arandel¹, Marius Halliez¹, Mégane Lemaître², Xavière Lornage¹, Laure Stochlic¹, Maurice S. Swanson³, Julien Messéant¹, Denis Furling^{1*}, Frédérique Rau^{1*}

¹Sorbonne Université, Inserm, Institut de Myologie, Centre de Recherche en Myologie, Paris, France;

²Sorbonne Université, UMS28, Phénotypage du Petit Animal, Paris, France

³Department of Molecular Genetics and Microbiology, Center for NeuroGenetics and the Genetics Institute, University of Florida, College of Medicine, Gainesville, FL 32610, USA

*Correspondence should be addressed to D.F. (denis.furling@sorbonne-universite.fr) or F.R. (frederique.rau@sorbonne-universite.fr)

Keywords: DM1, Myotonic Dystrophy, MBNL, Neuromuscular junction, motor neurons, RNA splicing

Abstract

Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is a neuromuscular disease caused by the expression of CTG repeat expansions in the 3'UTR of the *DMPK* gene. Subsequent mutant transcripts, containing expanded CUG repeats, aggregate as ribonuclear inclusions that sequester Muscleblind-like (MBNL) RNA-binding proteins, impairing their functions in various tissues. RNA metabolism abnormalities observed in affected DM1 tissues are mainly attributable to MBNL family loss-of-function, however, MBNL proteins involvement in the spinal cord and the connected peripheral nervous system is poorly investigated. To address this question, we generated a conditional mouse model invalidated for *Mbnl1* and *Mbnl2* in MN (dKO). dKO mice develop progressive motor abnormalities and exhibit neuromuscular junction (NMJ) maintenance deficiencies. Transcriptome analysis reveals numerous RNA splicing alterations in the spinal cord, indicative of MBNL1 and MBNL2 involvement in synaptic transmission at the NMJ. Our findings highlight the contribution of the motor unit to DM1 pathogenesis.

Introduction

Myotonic Dystrophy type 1 (DM1) is a multisystemic disorder characterized by progressive muscle weakness and wasting, myotonia, arrhythmia and cardiac conduction defects, endocrine deficiencies, cataracts as well as cognitive impairments (Harper, 2001). DM1 disease is inherited in an autosomal dominant manner and caused by an unstable expansion of CTG repeats located in the 3'UTR of the *DMPK* gene (Brook et al., 1992). These pathogenic CTG expansions are transcribed to mutant RNAs containing expanded CUG repeats (CUGexp-RNAs) that accumulate in the nucleus and form ribonucleoprotein aggregates.

Among the multiple molecular consequences associated to expanded CTG repeats, expression of CUGexp-RNAs alters the function of RNA binding proteins of the MBNL family leading to global RNA metabolism alterations including alternative splicing, mRNA stability, alternative polyadenylation and miRNA processing (Batra et al., 2014; Klein et al., 2011; Rau et al., 2011; E. T. Wang et al., 2012).

Notably, MBNL protein functional loss, due to their sequestration by CUGexp-RNAs, reverts specific pre-mRNA processing events to a foetal regulatory pattern in DM1. Thus, several splicing mis-regulations have been associated with DM1 symptoms such as myotonia, muscle weakness, dystrophic process and cardiac conduction defects (Charlet-B. et al., 2002; Freyermuth et al., 2016; Fugier et al., 2011; Rau et al., 2015; Tang et al., 2012). Further considerable evidences for MBNL functional loss in DM1 pathology were supported by single or combined *Mbnl* knockout mice models that developed symptoms observed in DM1 patients (Charizanis et al., 2012; Goodwin et al., 2015; Kanadia et al., 2003; Lee-Hsin et al., 2020; K.-Y. Lee et al., 2022; K. Y. Lee et al., 2013; Poulos et al., 2013).

In mammals, besides their structural resemblance, MBNL proteins differ in their expression pattern. MBNL1 and MBNL2 are ubiquitously expressed, however the highest MBNL1 expression level has been reported in heart and skeletal muscles, while MBNL2 is predominantly present in the central nervous system (CNS) (Konieczny et al., 2014). Remarkably, MBNL1 and MBNL2 could have compensatory roles as the deletion of either MBNL1 or MBNL2 results in a significant increase of the other paralog, associated with partial functional compensation. Indeed, mice invalidated for both *Mbnl1* and *Mbnl2* (dKO) are embryonic lethal and cardiac as well as skeletal muscle-specific MBNL2-Knockout (KO) in MBNL1-KO background causes robust splicing alterations, mimicking the spliceopathy observed in DM1 patients (K.-Y. Lee et al., 2022; K. Y. Lee et al., 2013). Additionally, neuron-specific conditional *Mbnl2*-KO in the *Mbnl1* KO background

leads to cortical neurons defects with significantly enhanced mis-splicing of alternative exons in the CNS resembling the ones observed in DM1 when compared to single KO (Goodwin et al., 2015; K. Y. Lee et al., 2019).

While MBNL1 and MBNL2 functions in skeletal muscles and CNS, particularly in the brain, are extensively reviewed, their involvement in the spinal cord and the connected peripheral nervous system remain poorly investigated. Peripheral nerves involvement in DM1 pathophysiology has been open to debate in the last century with the observations of several abnormalities including abnormal endplate size and arborization in DM1 muscle biopsies (Allen et al., 1969; Fardeau & Tomé, 1980; Macdermot, 1961). More recent observations of neuromuscular transmission abnormalities reconsidered their implication suggesting defective axonal transmission (Bombelli et al., 2016; Krishnan & Kiernan, 2006).

Interestingly, spinal cord biopsies obtained from DM1 patients have shown that CUGexp-RNA colocalize with MBNL proteins in motor neurons (MN), possibly causing MBNL loss-of-function in this cell type and subsequent peripheral nerves deficiency (Wheeler et al., 2007). Furthermore, abnormalities of diaphragm neuromuscular junctions (NMJs), including changes in motor endplate size and shape, have been documented in DMSXL mice (Panaite et al., 2008). Similarly, defective NMJs structures were observed in tibialis anterior (TA) muscles of MBNL1^{-/-}; MBNL2^{+/-} mice together with an increase in fragmented endplates (K. Y. Lee et al., 2013).

All these observations emphasize the importance of the motor unit communication in DM1 muscle dysfunction but also raise the question of the function of MBNL proteins in MN and their role in the motor unit. To assess the role of MBNL1 and MBNL2 in MN and their importance for muscle homeostasis via NMJs, we generated MN-specific Mbnl2-KO mice in which Mbnl2 expression is selectively ablated from MN with Mbnl1 being constitutively null (Hb9Cre-dKO, dKO mice : *Mbnl1*^{Δ3/Δ3}, *Mbnl2*^{cond/cond}, *Hb9Cre*^{+/-}). Adult dKO mice develop coordination deficiencies when compared to Mbnl1-KO mice, associated with progressive NMJs structural and ultrastructural defects indicating that MBNL proteins in MN play a role in NMJs maintenance. In addition, identification of mis-splicing events in the spinal cord of dKO mice of genes involved in neurotransmission suggests that MBNL proteins could regulate nerve-muscle communication. Overall, our data propose that MBNL loss of function in MN may contribute to DM1 pathogenesis.

Results

MBNL depletion affects locomotion

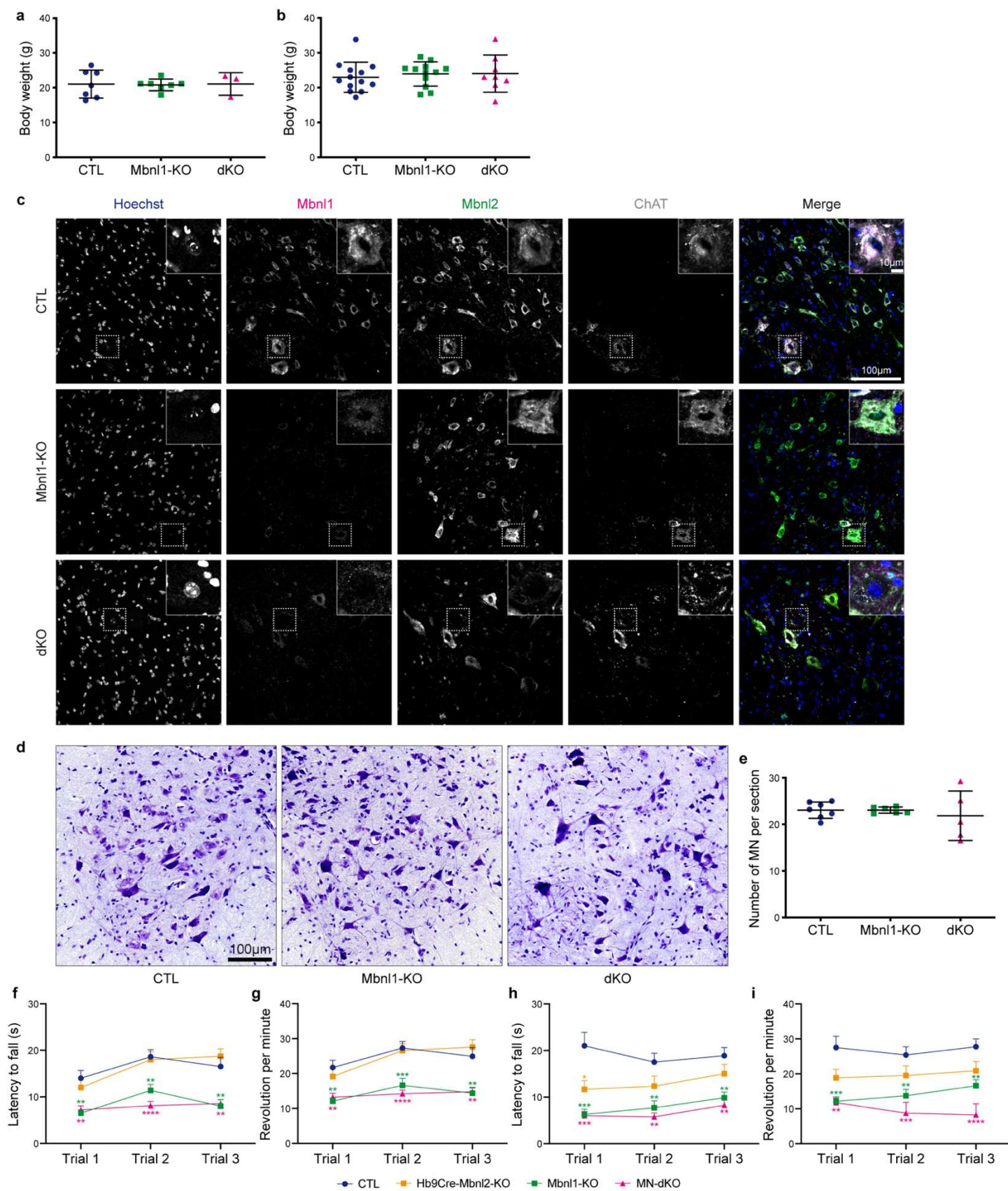
To investigate the role of MBNL1 and MBNL2 in MN and their importance for muscle homeostasis via NMJs, we generated conditional MN-specific Mbnl2-KO mice in which Mbnl2 expression is selectively ablated from motor neurons (MN), using homeobox gene 9 (Hb9) promoter to drive the expression of the Cre recombinase in spinal motor neurons (Bolis et al., 2005; Cheever et al., 2011; Chipman et al., 2010; Hess et al., 2007; Li et al., 2008; Luria & Laufer, 2007; Mende et al., 2010). We analyzed the consequence of Mbnl2 specific depletion in MN with or without Mbnl1 being constitutively null (Hb9-dKO, dKO: Mbnl1^{-/-}: Hb9Cre-Mbnl2^{-/-} and Hb9Cre-MBNL2-KO: Mbnl1^{+/+}; Hb9Cre-Mbnl2^{-/-} mice, respectively) (Fig. 1a).

First, dKO mice are developmentally viable and do not display early post-natal overt phenotype. Also, adult dKO mice show comparable body weight to adult Mbnl1-KO and CTL mice (Mbnl1-KO: Mbnl1^{-/-}) (Supp fig. 1a, b). We evaluated the Cre recombinase efficiency in MN by examining MBNL2 protein expression in mice spinal cord. As expected, MBNL1 protein was not observed in any cells of the spinal cord in Mbnl1-KO and dKO mice, while the presence of MBNL2 protein colocalizing with choline acetyltransferase (ChAT)-positive cells is heterogeneous with MBNL2-negative MN and some MBNL2-positive MN in dKO mice suggesting an incomplete Cre recombination (Supp fig. 1c). However, RNAseq analysis from dKO spinal cord confirmed splicing alterations of MBNL2 specific targets (St3gal3, Csnk1d, Dgl2, Tanc2, Cacna1d) identified initially in the brain of MBNL2-KO mice (Charizanis et al., 2012) suggesting an acceptable MBNL2 depletion in MN (Supp table S1).

Quantification of motor neuron viability in 4 months old Mbnl1-KO and dKO mice by Nissl staining in the ventral horn of spinal cord sections do not reveal a significant difference in the number of MN from Mbnl1-KO nor dKO mice compared to CTL mice, indicating that MBNL1 and MBNL2 are not required for MN viability *in vivo* (Supp fig. 1d, e).

While, adult Hb9Cre-Mbnl2-KO mice do not develop overt phenotype and are indistinguishable from CTL mice, Mbnl1-KO and dKO mice develop progressive abnormal motor behavior. As spinal motor neurons are known to handle the coordination of walking muscles, we further characterized motricity and coordination defects and observed impaired rotarod

performances in Mbnl1-KO and dKO mice at 2 and 4 months of age compared to CTL mice (Supp fig. 1f, g, h, i).



Supplementary figure 1: Characterization of Mbnl-KO mice

(a,b) Body weight of 2 months old and 4 months old CTL, Mbnl1-KO and dKO mice, respectively. (c) Immunostainings of spinal cord ventral horns from 4 months old CTL, Mbnl1-KO and dKO mice with anti- MBNL1 (red), anti-MBNL2 (green) antibodies and antibody for marker of MN (anti-ChaT, grey). Nuclei are labelled with Hoechst (blue), white squares indicate MN magnify on the upper right corner, Scale bars 100 μ m and 10 μ m. (d) Nissl staining of MN in the ventral horn of lumbar spinal cord cryosections from 4 months old CTL, Mbnl1-KO and dKO mice, scale bar 100 μ m. (e) Quantification of MN per cryosection. At least 200 MN per mouse: $n_{CTL} = 7$; $n_{Mbnl1-KO} = 6$; $n_{dKO} = 5$. (f, h) Rotarod assay represented by latency to fall (second; sec) and (g, i) rotational velocity at the time of falling in 2 months and 4 months old CTL, Hb9Cre-Mbnl2-KO, Mbnl1-KO and dKO mice respectively. Data are means \pm SEM from 2 months old $n_{CTL} = 10$; $n_{Mbnl1-KO} = 8$; $n_{Hb9Cre-Mbnl2-KO} = 7$; $n_{dKO} = 9$ mice and from 4 months old $n_{CTL} = 8$; $n_{Mbnl1-KO} = 7$; $n_{Hb9Cre-Mbnl2-KO} = 6$; $n_{dKO} = 4$ mice. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. One way ANOVA Tukey's test.

Additional gait analysis confirmed that 2 months and 4 months-old Mbnl1-KO and dKO mice exhibit a reduced mobility with a comparable average speed reduction for both genotypes compared to CTL mice (Fig. 1b, c and fig. 1h, i). Of interest, the coordination pattern of walking was different in 2 months-old dKO mice compared to Mbnl1-KO and CTL mice with a reduced percentage of classical diagonal limbs walking pattern and an increased percentage of other types of walking (three, four limbs and alternative walking patterns) (Fig. 1d and supp videos 1 to 3). Additionally, modifications of footprints are observed with a reduced stride length of the hind legs and front legs in Mbnl1-KO and dKO mice compared to CTL mice, as well as an increase of the distance between the position of the hind paw and the position of the previously placed front paw on the same side of the body (Fig. 1e, f, g). At 4 months of age, motor activity and coordination are aggravated in Mbnl1-KO and dKO mice with comparable deficiencies between the two genotypes compared to CTL mice (Fig. 1h, i, j, k, l, m and supp videos 4 to 6). Thus, MBNL1 loss lead to progressive motor coordination deficiencies with earlier manifestation with additional loss of MBNL2 in MN suggesting that MBNL1 and MBNL2 may regulate processes in spinal MN important for motor coordination.

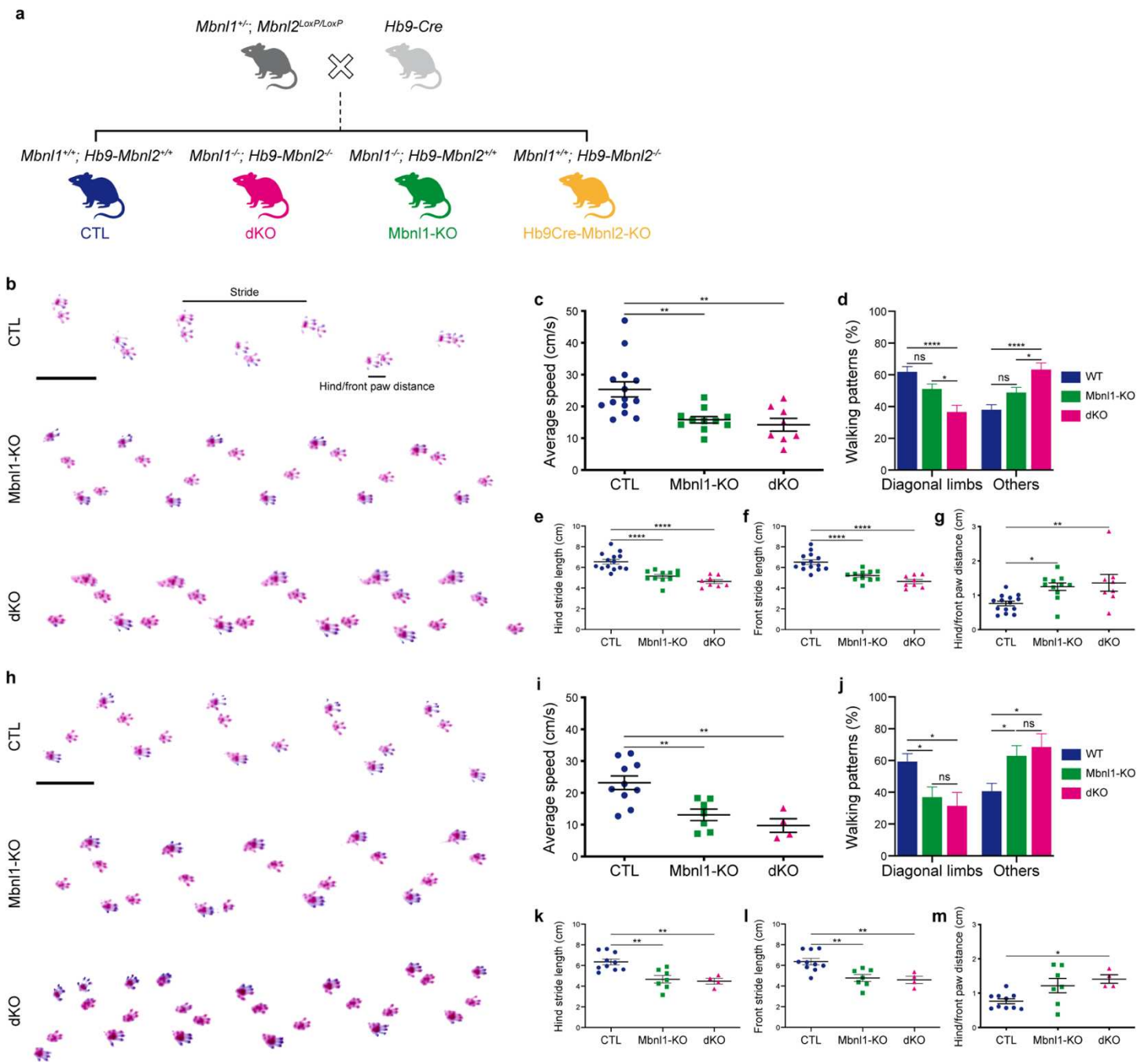


Figure 1: Mbn1 and Mbn2 simultaneous depletion in MN affects mice locomotion.

(a) Schematic representation of breeding strategy used to deplete specifically Mbn2 in MN in transgenic mice. $Mbn1^{+/-}; Mbn2^{LoxP/LoxP}$ mice were crossed with $Mbn1^{+/-}; Hb9-Cre$ mice (also known as $Hb9Cre$ mice) to generate: $Mbn1^{+/-}; Hb9-Mbn2^{+/-}$ control mice (CTL); $Mbn1^{-/-}; Hb9-Mbn2^{-/-}$ dKO mice; $Mbn1^{-/-}; Hb9-Mbn2^{+/-}$ Mbn1-KO mice and $Mbn1^{+/-}; Hb9-Mbn2^{-/-}$ Hb9Cre-Mbn2-KO mice.

(b-h) Representative trace of footprint analysis for testing gait abnormalities in CTL, Mbn1-KO and dKO mice at 2 and 4 months of age. (c-g) Quantifications from the gait analyses for 2 months old CTL, Mbn1-KO and dKO mice. (i-m) Quantifications from the gait analyses for 4 months old CTL, Mbn1-KO and dKO mice. (c- i) Quantification of average speed in centimeter per

second (cm/sec) (**d-j**) Proportions of walking patterns, defined by the limbs mice are standing on at the same time during walking. “Others” refers to standing on 3 or 4 limbs, and alternative walking patterns. (**e-k**) Quantification of stride length of the hindlegs. (**f-l**) Quantification Stride length of the front legs. (**g-m**) Quantification of Hind/front paw distance of either ipsilateral combination of paws. Bars indicate Data are means \pm SEM from 2 months old $n_{CTL} = 14$; $n_{Mbn1-KO} = 11$; $n_{dKO} = 8$ mice and from 4 months old $n_{CTL} = 10$; $n_{Mbn1-KO} = 7$; $n_{dKO} = 4$ mice. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. One-way ANOVA Tukey’s test.

MBNL proteins are involved in NMJs maintenance

To assess the role of MBNL1 and MBNL2 in MN and their importance for NMJs homeostasis, we analyzed the NMJs morphology of isolated TA muscle fibers from 2 and 4 months old Mbn1-KO, Hb9Cre-Mbnl2-KO and dKO mice and compared with TA from CTL mice. At 2 months of age, NMJs from Hb9Cre-Mbnl2-KO and Mbn1-KO are innervated and exhibit a typical mature “pretzel-like” shape (Fig. 2a and supp fig. 2a). Quantitative analyses show that acetylcholine receptor (AChR) clusters area, endplate perimeter and post-synaptic fragmentation of NMJs of Hb9Cre-Mbnl2-KO and Mbn1-KO are similar to CTL mice (Fig. 2b-e, supp fig. 2b-e). Interestingly, NMJs of 2 months-old dKO mice adopt a characteristic “pretzel-like” shape with enlarged AChR clusters area, motor endplate perimeter compared to CTL and Mbn1-KO mice (Fig. 2b, 2c).

In addition, NMJs post-synaptic structures in TA from dKO mice were discontinuous. Quantitative analysis shows an increase of AChR fragmentation in NMJs of dKO mice compared to CTL and Mbn1-KO mice (Fig. 2d) with a decrease of 30% of NMJs containing 1 to 3 AChR clusters and an increase of NMJs containing 4 to 6 fragments (Fig. 2e). Despite this deficit, the overlap ratio between presynaptic and post-synaptic markers, connotative of NMJs innervation, remain unchanged in Hb9Cre-Mbnl2-KO, Mbn1-KO and dKO mice compared to CTL mice (Fig. 2f and supp fig. 2f). Indeed, the increased size of the postsynaptic compartment is accompanied by a nerve terminal area enlargement in dKO mice compared to CTL, Hb9Cre-Mbnl2-KO and Mbn1-KO (supp fig. 2g). These observations suggest that loss of MBNL1 and loss of MBNL2 specifically in MN do not impair NMJs innervation nor development (formation and maturation) but additional loss of MBNL2 in MN alters NMJs morphological features.

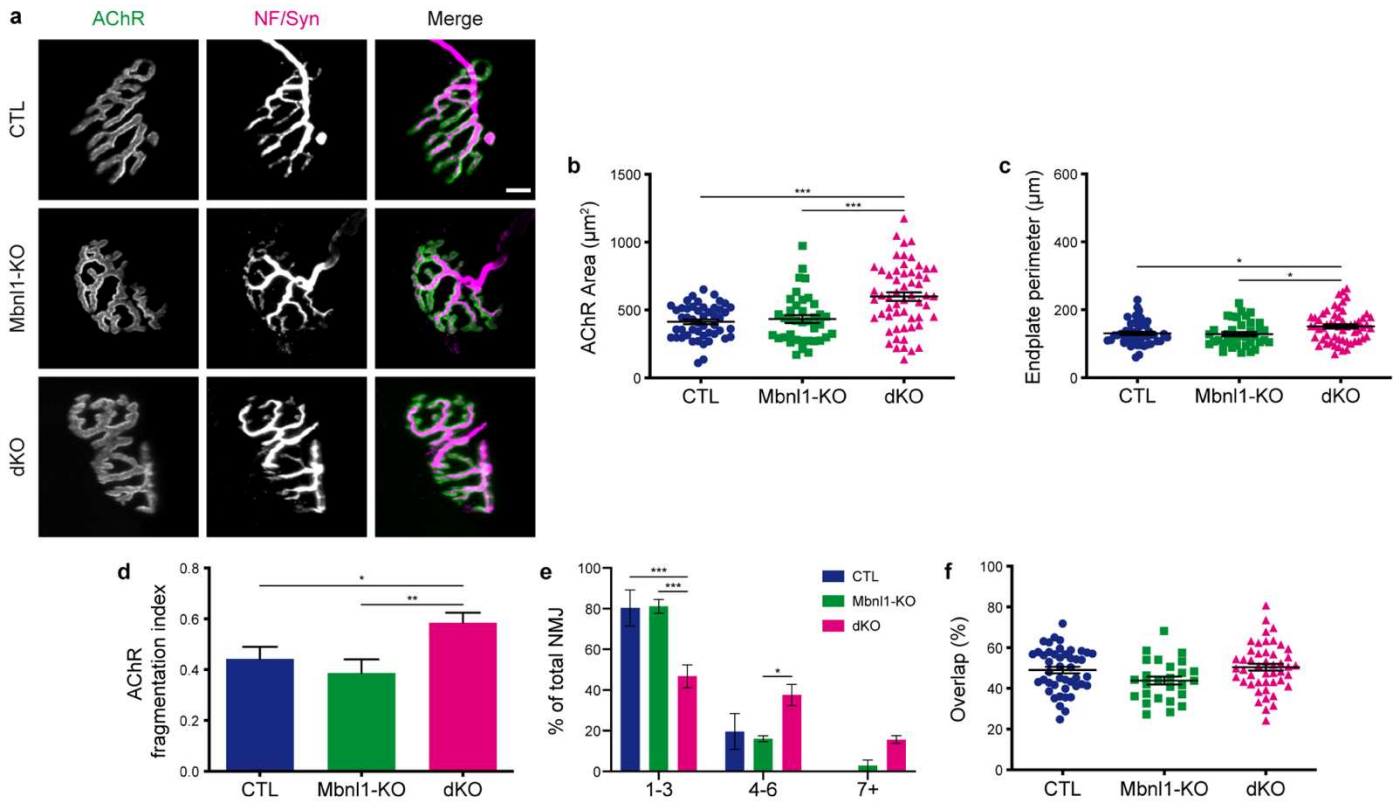
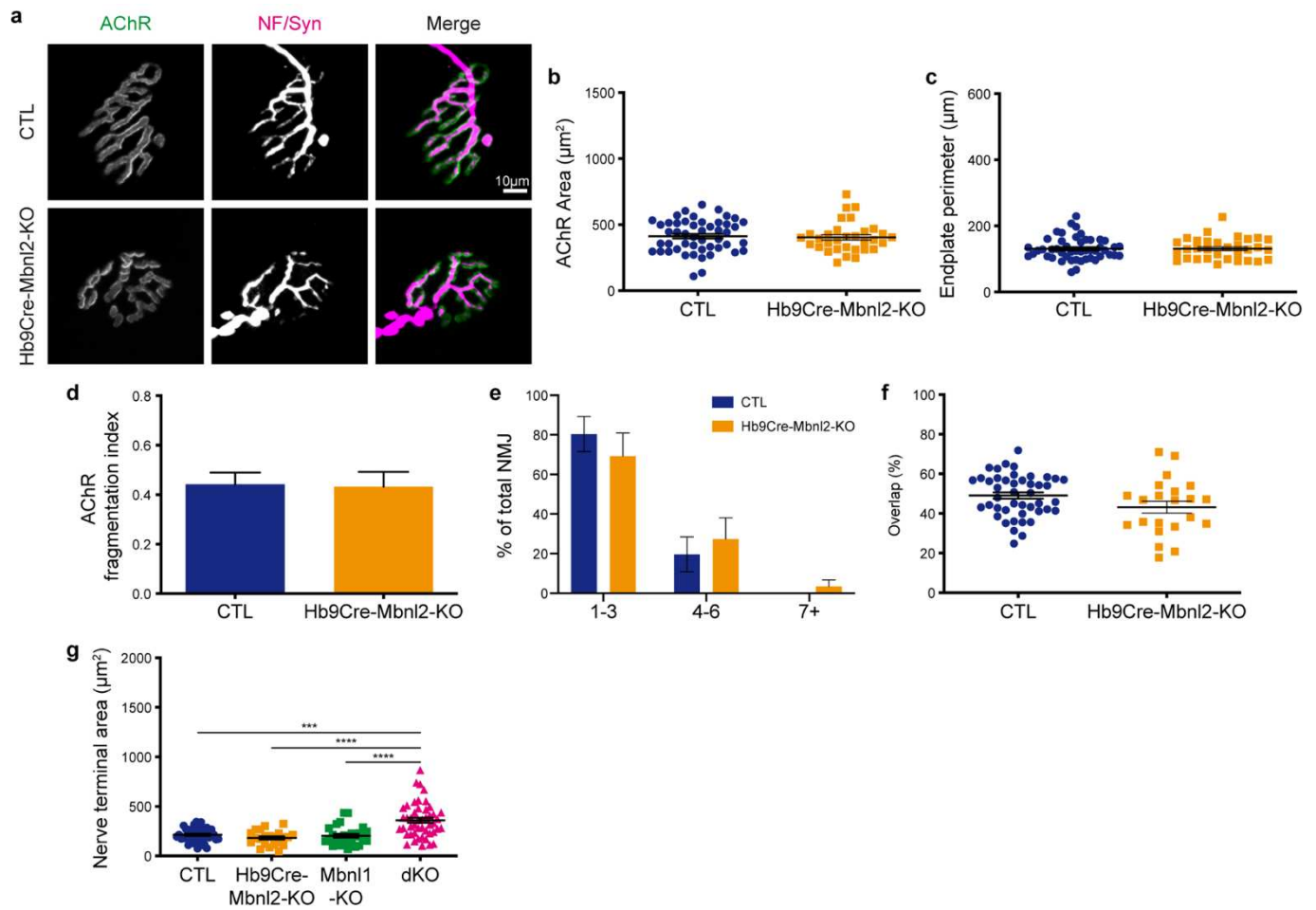


Figure 2: dKO mice exhibit NMJs structural alterations at 2 months of age.

(a) Representative confocal images of isolated muscle fibers from 2 months aged CTL, Mbnl1-KO and dKO TA muscle stained with antibodies to Neurofilament (NF, magenta and Synaptophysin (Syn, magenta) together with α -bungarotoxin (α -BTX, AChR, green), with quantitative analysis (b-f). (b) AChR cluster area. (c) Endplate perimeter. (d) Index of AChR fragmentation. (e) Percentages of NMJs that contain indicated numbers of AChR fragments. (f) Overlap ratio of pre- and post-synaptic AChR clusters area staining. Scale bar, 10 μ m, data are means \pm SEM from $n_{CTL} = 4$, at least 10 NMJs per mouse; $n_{Mbnl1-KO} = 3$, at least 11 NMJs per mouse; $n_{dKO} = 4$, at least 10 NMJs per mouse. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ by One-way ANOVA Dunn's test (b-d); one-way ANOVA Turkey's test (f) Two-way ANOVA Sidak's test (e).

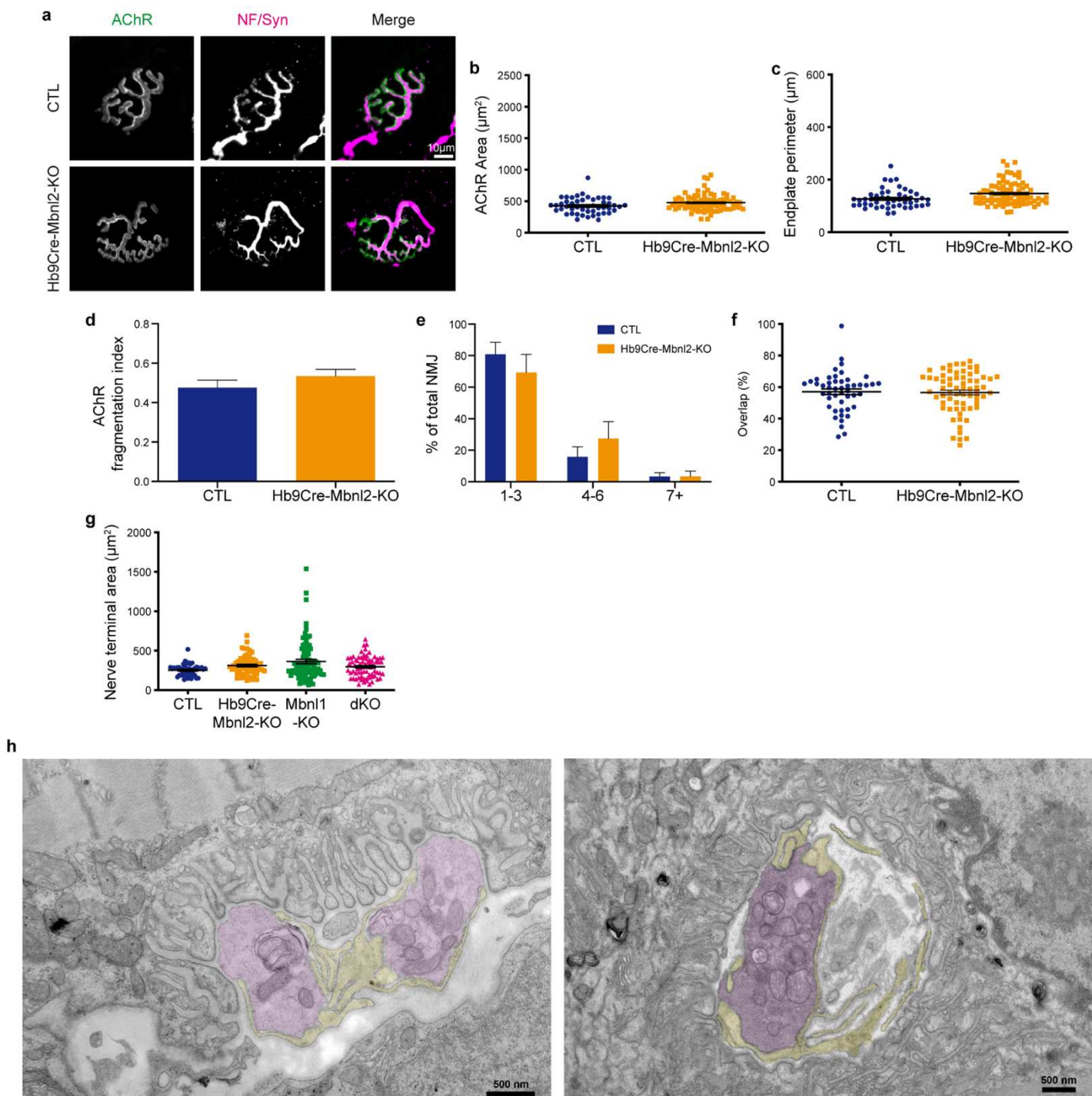


Supplementary figure 2: NMJS structure from 2 months old Mbnl mice.

(a) Representative confocal images of TA NMJS from 2 months old CTL and Hb9Cre-Mbnl2-KO mice. Neurofilament (NF, magenta) and Synapsin (SYN, magenta) together with α -BTX (AChR, green), scale bar 10 μ m. (b-e) Quantification of NMJS structural characteristics of TA from 2 months old CTL and Hb9Cre-Mbnl2-KO mice. (b) AChR area. (c) Endplate perimeter. (d) Index of AchR fragmentation. (e) Percentages of NMJs that contain indicated numbers of AchR fragments. (f) Overlap ratio of pre- and post-synaptic AchR clusters area staining (e) Overlap ratio of pre- and post-synaptic AchR area (%). (f) NMJS nerve terminal area from TA of 2 months old CTL, Hb9Cre-Mbnl2-KO, Mbnl1-KO and dKO mice. (g) NMJS nerve terminal area from TA of 2 months old CTL, Hb9Cre-Mbnl2-KO, Mbnl1-KO and dKO mice.

Data are means \pm SEM from $n_{CTL} = 4$, at least 10 NMJs per mouse; $n_{Mbnl1-KO} = 3$, at least 11 NMJs per mouse; $n_{Hb9Cre-Mbnl2-KO} = 3$, at least 8 NMJs per mouse; $n_{dKO} = 4$, at least 10 NMJs per mouse. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. One way ANOVA Dunn's test (b-d), one-way ANOVA Tukey's test (f,g), two-way ANOVA Sidak's test (e).

To test whether loss of MBNL proteins is critical for NMJs maintenance, we analyzed NMJs of TA from 4 months old CTL and Mbnl-KO mice. As observed at 2 months of age, NMJs of Hb9Cre-Mbnl2-KO mice resemble NMJs of CTL mice (Supp fig. 3a-f).



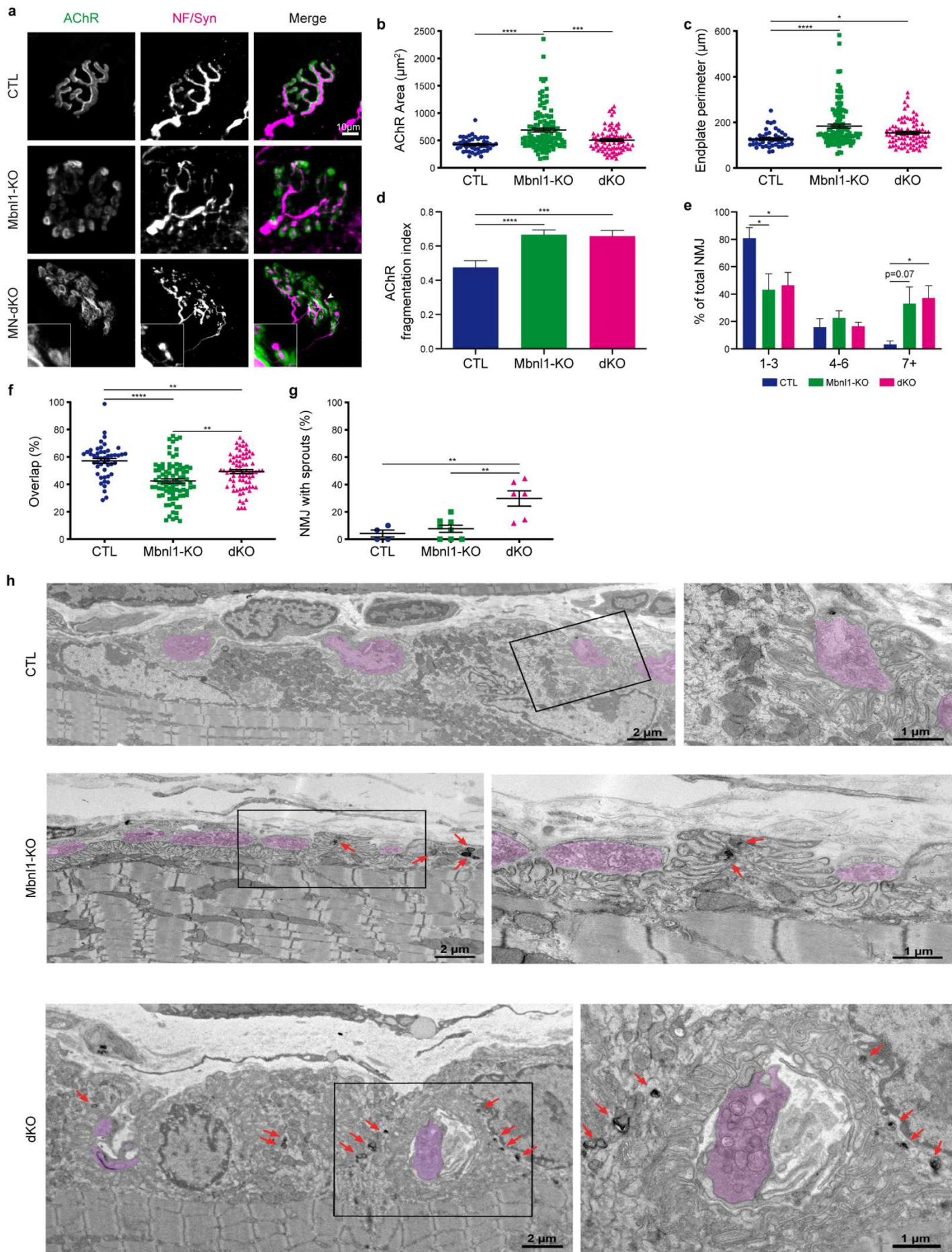
Supplementary figure 3: NMJS structure from 4 months old Mbnl mice,

(a) Representative confocal images of TA NMJS from 4 months old CTL and Hb9Cre-Mbnl2-KO mice. Neurofilament (NF, magenta) and Synapsin (SYN, magenta) together with α -BTX (AChR, green), scale bar 10 μ m. **b-e**) Quantification of NMJS structural characteristics of TA from 4 months old CTL and Hb9Cre-Mbnl2-KO mice. **(b)** AChR area. **(c)** Endplate perimeter. **(d)** Index of AchR fragmentation. **(e)** Percentages of NMJs that contain indicated numbers of AchR fragments. **(f)** Overlap ratio of pre- and post-synaptic AchR clusters area staining **(f)** Overlap ratio of pre- and post-synaptic AchR area (%). **(g)** NMJS nerve terminal area from TA of 4 months old CTL, Hb9Cre-Mbnl2-KO, Mbnl1-KO and dKO mice. **(h)** Transmission electron microscopy of

TA NMJs from 4 months old dKO mouse. The synaptic button is colored in purple and terminal schwann cells in yellow. Data are means \pm SEM from $n_{CTL} = 4$, at least 9 NMJs per mouse; $n_{Hb9Cre-Mbnl2-KO} = 7$, at least 9 NMJs per mouse; $n_{Mbnl1-KO} = 7$, at least 13 NMJs per mouse; $n_{dKO} = 6$, at least 9 NMJs per mouse. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. One-way ANOVA Dunn's test (b-d,g) and two-way ANOVA Sidak's test (e).

However, AChR clusters of Mbnl1-KO and dKO mice are larger with increased AChR clusters area and endplate perimeter (Fig. 3a, b, c). In addition, TA muscle NMJs of Mbnl1-KO and dKO mice exhibit AChR fragmentations with a decrease of 40% of NMJs containing 1 to 3 fragments and appearance of more than 30% of NMJs containing 7 fragments and more compared to CTL mice (Fig. 3d, e). These deficits are associated with reduced pre- and post-synaptic overlap ratio in Mbnl1-KO and dKO mice without any modification of the nerve terminal area compared to CTL mice (Fig. 3f and supp fig. 3g). Of interest, solely NMJs of dKO mice exhibit abnormal nerve terminal sprouts without any colocalization with AChR clusters (Fig. 3a arrow, g) suggesting the occurrence of synaptic plasticity changes that might come from MN.

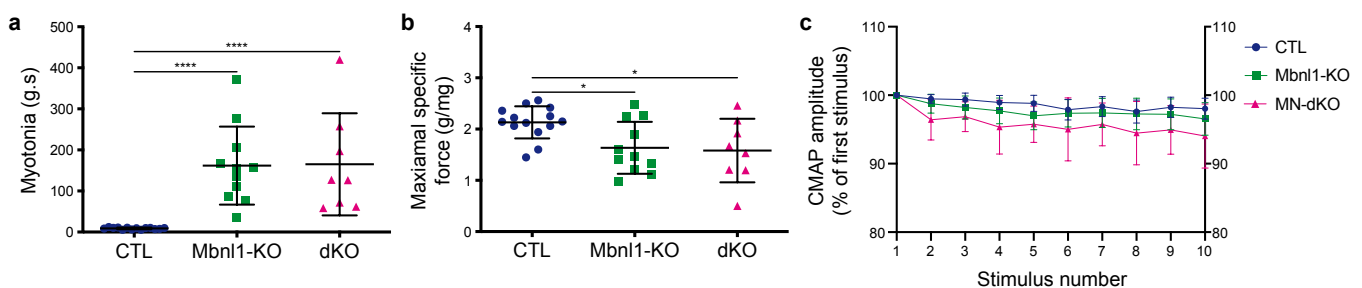
Transmission electron microscopy (TEM) of NMJs of 4 months old mice further support these hypotheses. Indeed, in Mbnl1-KO mice, ultra-structural abnormalities are restricted to the post-synaptic area of NMJs with enlarged synaptic gutters, irregularly shaped crests and presence of degenerative structures while NMJs of dKO mice do not only reproduce post-synaptic alterations seen in Mbnl1-KO mice but also develop presynaptic defects as the presence of degenerative structures inside the presynaptic button and partial denervation (Fig. 3h). The occurrence of synaptic remodeling is also suggested by the presence of non-myelinating terminal Schwann cells (tSC) at the synaptic cleft of dKO mice NMJs (Supp fig. 3h). Thus, the global aggravation of NMJs structure between 2 and 4 months of age in Mbnl1-KO and dKO mice indicates a role of MBNL1 and MBNL2 in NMJs maintenance.



Synaptic buttons are colored in purple, black squares focus on a synapse magnify on the right. Degenerative structures (arrows). Scale bars 2 and 1 μm .

data are means \pm SEM from $n_{\text{CTL}} = 4$, at least 9 NMJs per mouse; $n_{\text{Mbnl1-KO}} = 7$, at least 13 NMJs per mouse; $n_{\text{dKO}} = 6$, at least 9 NMJs per mouse. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. One way ANOVA Dunn's test (b, c, d); Two-way Anova, Sidak's test (e); one way ANOVA Tukey's test (f,g).

The specific presynaptic modifications of NMJs detected in dKO mice suggest that combined loss of MBNL1 and MBNL2 in MN may be deleterious to signals transmission from nerve to muscle. As 4 months-old Mbnl1-KO and dKO mice exhibit severe NMJs structure abnormalities, we next examined TA muscle function. *In situ* force measurements confirmed the presence of myotonia and reduced specific maximal tetanic muscle force in Mbnl1-KO mice compared to CTL as previously reported (Choi et al., 2015; Kanadia et al., 2003), but additional loss of MBNL2 in MN do not worsen specific maximal tetanic muscle strength neither modify myotonia (Supp fig. 4a, b). To study neuromuscular transmission, we performed repetitive nerve stimulation of the sciatic nerve and recorded the compound muscle action potential (CMAP) of TA muscle, representative of muscle electrical response to stimuli. CMAP amplitude from CTL and Mbnl1-KO mice do not decrement with stimuli, and dKO mice show a high variability of response but no statistically significant compared to Mbnl1-KO and CTL mice (Supp Fig. 4c). These data, suggest that additional loss of MBNL2 in MN and subsequent NMJ structures modifications, is not sufficient to worsen Mbnl1-KO muscle pathology. However, the presence of pre-synaptic structural and ultrastructural abnormalities solely in NMJs of dKO mice suggest that MBNL proteins in MN may regulate fine processes involved in nerve to muscle communication.



Supplementary figure 4: Absence of nerve-evoked tetanic force and CMAP modifications in the TA muscle of Mbnl1-KO and dKO mice.

(a) *in situ* measurement of myotonia (g.s). (b) Quantitative analysis of nerve-evoked absolute specific muscle forces (g/mg of muscle). (c) Quantification of amplitude of 10 CMAPs, expressed

as percentage of the first, at 5Hz. Data are means \pm SEM from (a, b) $n_{CTL} = 14$; $n_{Mbnl1-KO} = 12$; $n_{dKO} = 8$. (b-c) $n_{CTL} = 14$; $n_{Mbnl1-KO} = 11$; $n_{dKO} = 8$. (c) $n_{CTL} = 8$; $n_{Mbnl1-KO} = 6$; $n_{dKO} = 3$ mice. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. One-way ANOVA Tukey's test (a, b) and Two-way ANOVA Dunnett's test (c).

MBNL proteins in MN regulate the alternative splicing of RNA involved in synaptic neurotransmission

To explore the molecular consequences of MBNL1 and MBNL2 loss in MN and the impact of MBNL deficiency on spinal cord pre-mRNA processing, we performed high-throughput RNA sequencing using total RNA isolated from lumbar spinal cord from Mbnl-KO and CTL 4 months old mice ($n=4$ per condition) (Supp table S2-4). Comparison of RNA from spinal cord of dKO and CTL mice revealed 1017 differential alternative splicing events (DSE), affecting 815 unique genes (FDR corrected $p < 0.05$, $\Delta PSI > 10\%$), with a majority of skipped exons (SE) events (68,9%) (Fig. 4a). As expected for cell-type conditional KO model, a majority of DSE (65%) are comprised between 10 and 20% with a median 17% ΔPSI value.

Hierarchical clustering revealed that spinal cord of dKO mice have a distinct RNA splicing profile compared to CTL, Mbnl1-KO and HB9Cre-Mbnl2-KO mice (Supp fig. 5a). Unbiased gene ontology (GO) biological process analysis of these 1017 differentially alternative spliced RNA showed top categories involved in microtubule cytoskeleton organization, NMJs development and neurotransmitter exocytosis suggesting the role of MBNL proteins in these processes (Fig. 4b).

To determine the contribution of MBNL1 and MBNL2 loss to DSE observed in dKO mice, we compared them to DSE in Mbnl1-KO and Hb9Cre-MBNL2 KO (compared to CTL) mice followed by GO biological process analysis (Fig. 4c). Interestingly, GO top categories from DSE common to Mbnl1-KO and dKO mice refer to synaptic vesicle budding, and endocytosis while GO analysis from DSE common to Hb9Cre-Mbnl2-KO and dKO mice show enriched pathways in neurotransmitter transport and secretion, and protein localization to synapse. DSE and GO analysis outlined already documented MBNL1 RNA targets in the CNS, including Clasp1 exon 26, Clasp2 ex16, Dnm2 exon 10, Mapt exon 2/3, as well as MBNL2 RNA targets including Tanc2 ex23a, st3gal3 ex3, Csnk1d ex9 and Dlg2 ex17b (Fig. 4d). To support computational analysis, we performed RT-PCR assay on CTL and dKO lumbar spinal cord RNA and confirmed significant changes of Clasp1, Cacna1d and others (Supp fig. 5b).

Among splicing defects relative to MN synaptic neurotransmission and associated to NMJs, we noticed an aberrant inclusion of Dvl1 39 bp exon 14b only in spinal cord from dKO mice (Fig. 4e). We validated this observation by RT-PCR and confirmed a significant increased inclusion of this 39 bp exon only in dKO mice (Fig. 4f). To determine if alternative splicing of Dvl1 exon 14b is regulated by MBNL2, we verified its inclusion rate in publicly available RNAseq data from brains of WT and Mbnl2-KO mice (Charizanis et al., 2012).

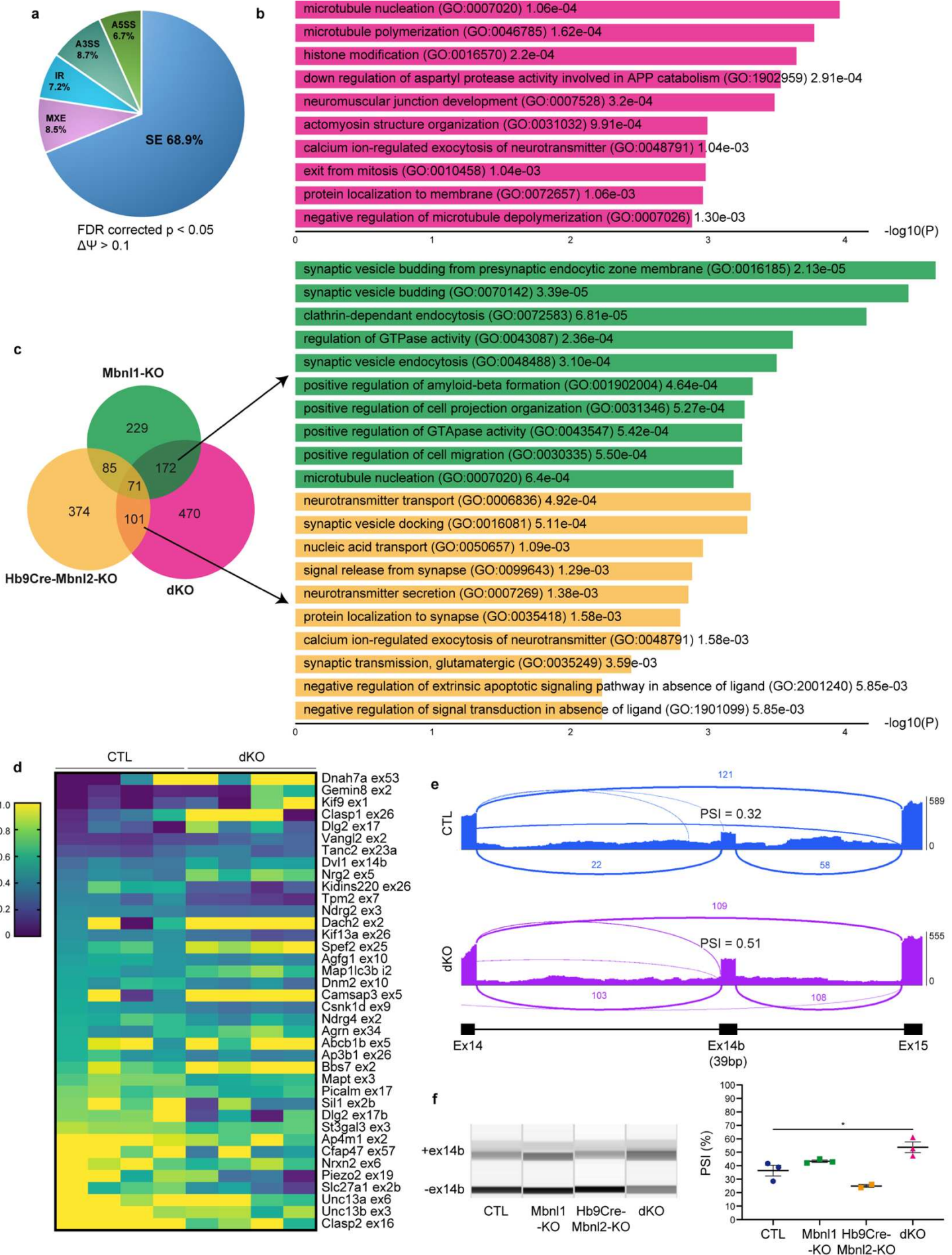
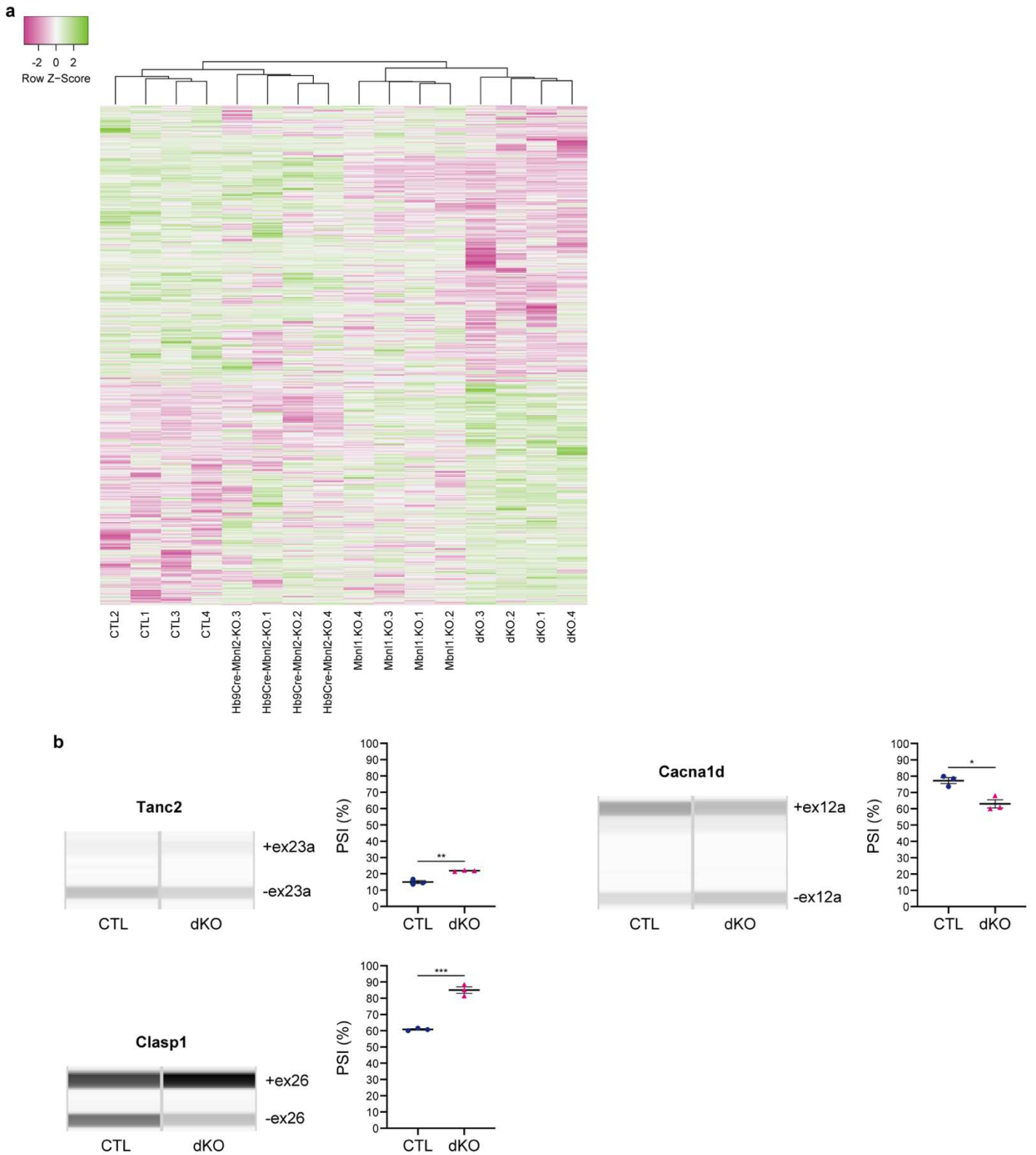


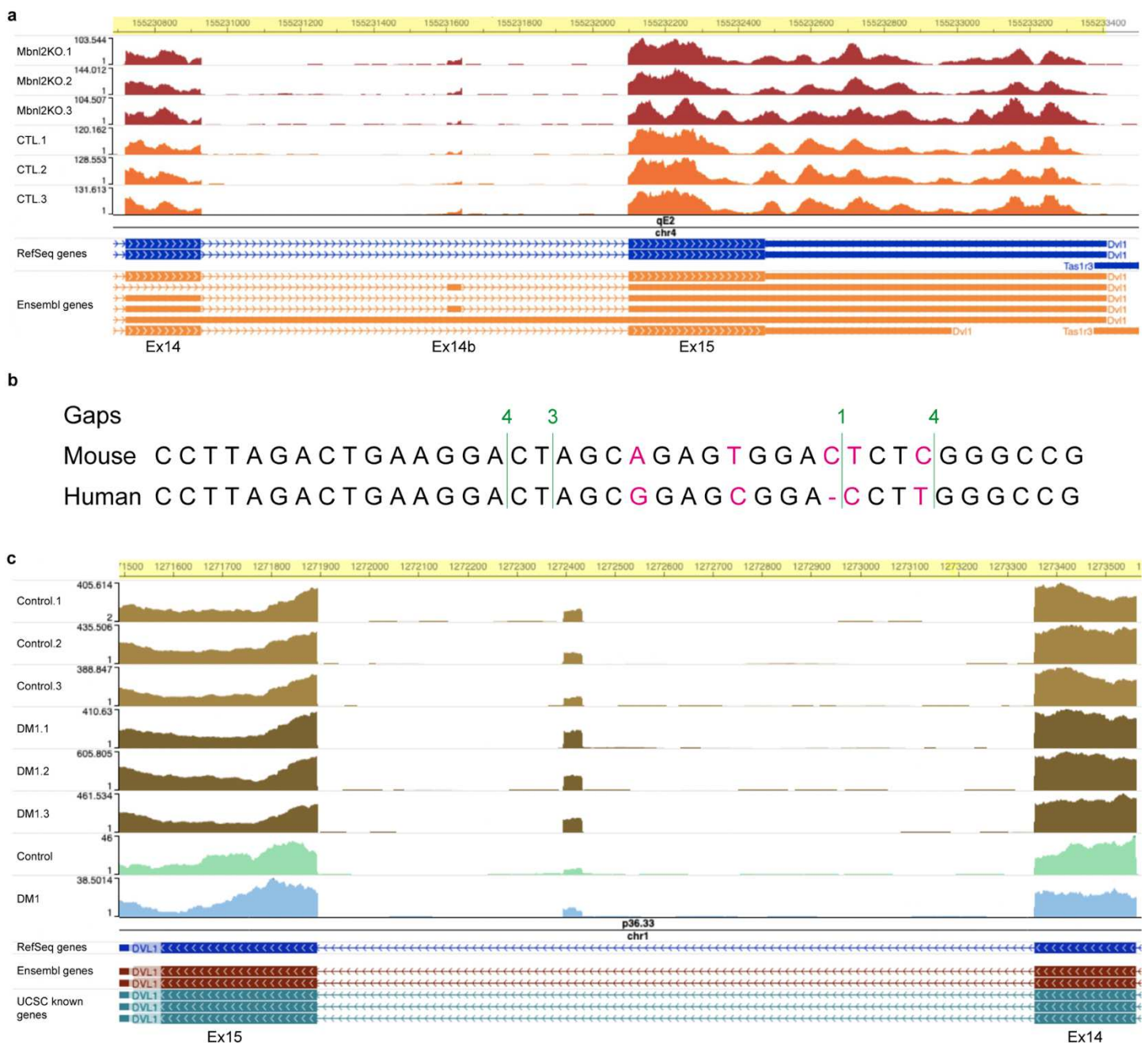
Figure 4: Alternative splicing changes in spinal cord from 4 months old dKO mice

(a) Pie chart represents the proportion of significant differential alternative splicing (DSE) ($\Delta\Psi > 10\%$ - FDR $< 0,05$) in 4 months old dKO mice compared to CTL mice and categorized as as skipped exons (SE), alternative 5' and 3' splice sites (A5SS and A3SS), mutually exclusive exons (MXE) and retained introns (RI). (b) Unbiased gene ontology (GO) top biological processes involved by the DSE identified in dKO mice when compared to CTL mice. (c) Venn diagram of the number of unique genes affected in Hb9Cre-Mbnl2-KO, Mbnl1-KO and dKO mice when compared to CTL mice (left). The top 10 unbiased GO biological processes of genes common between dKO and Mbnl1-KO mice or Hb9Cre-Mbnl2-KO mice are shown on the right with their corresponding p-values. (d) Heatmap show selected DSE changed in dKO mice compared to CTL mice. (e) Sashimi plot for Dvl1 ex14b in CTL and dKO mice. (f) Representative RT-PCR splicing analysis of Dvl1 ex14b from CTL (n=3), Mbnl1-KO (n=3), Hb9Cre-Mbnl2-KO (n=2) and dKO mice (n=3) with PSI quantification.



Supplementary figure 5: Spinal cord DSE characterization from 4 months-old Mbnl mice
(a) Heatmap representing Pearson's tau rank correlation from all differential splicing events (DSE) observed in 4 months-old dKO compared to CTL mice ($\Delta\Psi >10\%$; $FDR < 0,05$), and compared to Mbnl1-KO and Hb9Cre-MBNL2 profile for the same DSE. **(b)** RT-PCR analysis validation of DSE found by RNAseq in spinal cord from Mbnl mice.

As observed in lumbar spinal cord from dKO mouse, Dvl1 exon 14b is aberrantly included in brain hippocampi from Mbnl2-KO mice indicating its possible regulation by MBNL2 in mouse CNS (Supp Fig. 6a). Of interest, the sequence corresponding to Dvl1 exon 14b in mouse is highly conserved among species: 92,4% of homology between mouse and human (where it is not annotated as an exon but present in intron 14) (Supp fig. 6b). As MBNL loss of function is a major contributor to DM1 pathology, we asked whether DVL1 mis-splicing occurs in DM1 CNS. For this purpose, we verified its inclusion rate in publicly available RNAseq data from brain cortex samples from Control and DM1 patients (Goodwin et al., 2015) and confirmed the aberrant inclusion of Dvl1 exon 14b (39bp) in DM1 CNS (Supp fig. 6c) suggesting that Dvl1 mis-splicing showed in spinal cord from dKO mice could also be involved in CNS from DM1 patients.



Supplementary figure 6: Computational analysis of Dvl1 ex 14b alternative splicing in brains from Mbnl2-KO and DM1 patients

(a,c) Genome browser view of RNA-seq generated from brains from Mbnl2-KO mice and DM1 patients brain samples, publicly available from Charizanis et al., 2012, Goodwin et al., 2015 and from Dr. Nicolas Sergeant. **(b)** DVL1 exon 14b conservation across species.

Altogether, our data show that MBNL1 and MBNL2 regulate alternative RNA splicing in mouse spinal cord and may regulate different process in MN to fine-tune synaptic transmission through the NMJs to the skeletal muscle.

Discussion

Our data reveal the implication of MBNL1 and MBNL2 proteins in the maintenance of NMJs and suggest a role for these two proteins in regulating the synaptic transmission from MN to skeletal muscle. MBNL proteins function in the CNS has been extensively studied, with a major role of MBNL2 in neuronal cells (Charizanis et al., 2012; Goodwin et al., 2015). Our RNA splicing analysis performed on spinal cord from dKO mice have shown that MBNL1 and MBNL2 act as regulators in MN for neurotransmission by targeting transcripts involved in synaptic vesicle homeostasis (budding, recycling), neurotransmitter release and protein localization to synapse confirming the importance of MBNL proteins for NMJs function. Among DSE identified in spinal cord from dKO mice, we noticed a number of mis-splicing events already reported in the CNS of MBNL KO mice (Charizanis et al., 2012; Goodwin et al., 2015; Suenaga et al., 2012) suggesting that CNS pre-mRNA regulation of MBNL1 and MBNL2 demonstrated in the brain also occurs in the spinal cord and that similar neuronal regulating pathways could be transposed from brain neurons to MN.

We also reported new transcripts differentially spliced with the loss of MBNL proteins and identified Dvl1 39 bp ex14b mis-splicing in spinal cord from dKO mice. Dvl1 is coding for dishvelled segment polarity protein 1, key player in Wnt/PCP signaling participating to NMJs maintenance through MN (Shafer et al., 2011; Shen et al., 2018; W. Wang et al., 2015). The molecular and physiological consequences of Dvl1 ex14b aberrant inclusion in spinal cord remain to be determined. However, as its inclusion produces a premature stop codon, it might lead to the degradation of the transcript through nonsense-mediated mRNA decay (NMD) leading to a

decreased expression of DVL1 protein, as previously reported in DM1 pathology for Clcn1 (Charlet-B. et al., 2002).

While MBNL proteins in MN seem to regulate numbers of RNA splicings, we showed that combined loss of MBNL1 and MBNL2 do not impact MN cells survival and muscle innervation but alter NMJs maintenance rather than development. However, appearance of moderate NMJs fragmentation at 2 months of age in dKO mice may indicate premature impairment during early maintenance. Additionally, NMJs from Mbnl1-KO and dKO mice showed progressive and severe AChR clusters fragmentation in 4 months old Mbnl1-KO and dKO mice. Origins of these NMJs fragmentations remain unclear as MBNL1 is depleted from MN and muscle in Mbnl1-KO and dKO mice. NMJs fragmentation has been associated with massive skeletal muscle degeneration and regeneration as observed in dystrophin-deficient *mdx* mice (Pratt et al., 2013, 2014, 2015). However, despite the presence of a subset of muscle fibres with centronuclei, Mbnl1-KO mice do not exhibit overt muscle regeneration (Kanadia et al., 2003; K. Y. Lee et al., 2013).

MBNL1 is highly expressed in muscle tissues and colocalizes with CUGexp in the nuclei of DM1 muscle cells, including subsynaptic nuclei (Wheeler et al., 2007). Of interest, alternative splicing changes of transcripts coding for post-synaptic NMJs proteins such as CHRNG and MUSK have been reported in myoblastic primary culture from human embryonic muscle tissues carrying large CTG repeats (Klinck et al., 2014) indicating the possible contribution of CUGexp and MBNL1 loss in skeletal muscle to NMJ homeostasis defects. Observations of ultrastructural abnormalities in the post-synaptic compartment of 4 months old Mbnl1-KO and dKO mice further support MBNL1 muscle contribution to NMJs defects. However, the presence of nerve terminal sprouts and degenerative structures in the synaptic button has only been observed in dKO mice indicating that additional loss of MBNL2 in MN has an impact at the presynaptic level. This hypothesis is strengthened by *mbl-1* deficient *C. elegans* (MBNL orthologue) which exhibit NMJs defects rescued by *mbl*-transgene expression in presynaptic neurons only and not in muscles (Spilker et al., 2012). Lastly, although NMJs fragmentation and terminal nerve sprouting could be interpreted as degeneration markers of the NMJs in rodent, it has been proposed to represent an outcome of active repair process helping to maintain the efficiency of neuromuscular transmission (Slater, 2020).

Titration of MBNL proteins by CUGexp-RNA plays a pivotal role in DM1 pathogenesis and most of DM1 splicing abnormalities are attributable to MBNL loss-of-function (Nakamori et al., 2013). CUGexp foci that colocalize with MBNL1 have been found in DM1 motor neurons

(Wheeler et al., 2007) and electron microscopy analysis showed modifications of motor endplates size, NMJs shape as well as neurotransmission defects in affected muscles of DM1 patients (Allen et al., 1969; Bombelli et al., 2016; Fardeau & Tomé, 1980; Kanning et al., 2010; Macdermot, 1961). Loss of MBNL proteins, and notably loss of MBNL2, in mice have recapitulated DM1 neurological features associated with similar splicing abnormalities (Charizanis et al., 2012; Goodwin et al., 2015). Of interest, some alternative splicing abnormalities found in spinal cord of dKO mice, such as MAPT, SORBS1 and TANC2 have been previously reported in brain from DM1 patients (Caillet-Boudin et al., 2014; Dhaenens et al., 2011; Jiang et al., 2004; Sergeant et al., 2001; Suenaga et al., 2012) as well as brain from DMSXL mice (Dinca et al., 2022; Hernández-Hernández et al., 2013), and associated with DM1 patients CNS defects suggesting that RNA modifications described in DM1 brain may also occur in DM1 spinal cord and contribute to DM1 pathogenesis.

In conclusion, our results demonstrate the contribution of MBNL1 and MBNL2 in motor unit homeostasis and provide new insights to a better understanding of motor unit involvement in DM1 disease. This work also opens new avenues for the care of DM1 patients and most importantly, for further clinical trials.

Material and methods

Antibodies

Rabbit monoclonal anti-synaptophysin (Syn) (Invitrogen, 1/200), polyclonal anti-neurofilament (NF) 68 kDa (Millipore Bioscience Research Reagents, 1/500), α -BTX Alexa Fluor 488 conjugate (1/500) were purchased from Invitrogen. Spinal cord immunofluorescences were performed with polyclonal anti-MBNL1 antibody (A2764, gift from C. A. Thornton, 1/1000), monoclonal anti-MBNL2 antibody (3B4, Santa Cruz, 1/300) and anti-ChAT antibody (AB144P, Millipore, 1/50).

Generation of Hb9-Cre-dKO conditional knock mice

Mbnl1^{+/-};*Mbnl2*^{LoxP/LoxP} mice (obtained from Dr. Swanson, USA;K. Y. Lee et al., 2013) have been crossed with transgenic mice expressing a Cre Recombinase under a MN-specific Hb9 promoter (B6.129S1-*Mnx1*^{tm4(Cre)Tmj}/J ; Stock #006600, Jackson Labs, Bar Harbor, ME) to generate Hb9-Cre DKO mice (*Mbnl1* Δ E3/ Δ E3, *Mbnl2*c/c; Hb9-Cre+/-), Hb9Cre-Mbnl2 KO mice (*Mbnl1*+/, *Mbnl2*c/c; Hb9Cre+/-), *Mbnl1*-KO mice (*Mbnl1* Δ E3/ Δ E3, *Mbnl2*c/c; Hb9Cre-/-) and CTL mice (*Mbnl1*+/, *Mbnl2*+/, Hb9-Cre-/-).

Animal procedures

All mouse procedures were done according to the protocols APAFIS#22706-2019110616459523 v5; APAFIS#22758_2019111316521357v8 and APAFIS#22871-2019112115405462v4 approved by the Ethical Committee on Animal Resources at the Centre Experimentation Fonctionnelle of Pitié-Salpêtrière animal facility and under appropriate biological containment. Briefly, mice were maintained in a conventional specific-pathogen-free facility with a fixed light cycle (22°C, 12-hour dark-light cycle). Mice have been analyzed for motor function at 2 and 4 months of age by accelerating rotarod and gait analysis using Catwalk XT device.

Accelerating rotarod

Rotarod testing was performed on 2- and 4-months old mice using LE8200 apparatus (Harvard Apparatus). An accelerating rotarod protocol 4 to 40 rpm over 5 min was used. Mice's latency to fall was recorded as the mean latency of the three consecutive trials and data are reported \pm SEM.

Gait analysis

Gait analysis was performed using The CatWalk™. For data collection, six runs per animal were performed with a minimum of three runs crossed at the same speed with 3-full step sequence patterns. Quantitative analysis of the data included the following parameters: Step sequence, average speed, walking pattern, stride length, Stand duration, hind-front paw distance.

In situ isometric force analysis

In situ isometric contraction of the TA muscle was performed as described previously (Delacroix et al., 2018). Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (50 mg/kg body weight). A blind analysis was performed by the investigator. The knee and foot were fixed with clamps and the distal tendon of the TA muscle was attached using a silk ligature to a force sensor (305B, Dual-Mode Lever, Aurora Scientific). The sciatic nerve was proximally crushed and distally stimulated by a bipolar silver electrode using supramaximal square wave pulses of 0.1 ms duration. Muscle was also directly stimulated in order to initiate muscle contraction in the case of neurotransmission failure. Force that was developed during isometric muscle contractions in response to nerve or muscle tetanic stimulation (frequency of 100Hz, train of stimulation of 500 ms) was then measured. The maximal absolute force was determined at optimal length (ie., length at which supramaximal tension was obtained during the tetanus). Signals from the force sensor were amplified and digitized with a computer equipped with an analogue-to-digital interface board

(BioAmp, ADInstruments) using LabChart 8 software (ADInstruments). Myotonia was quantified as the area beneath the curve of muscle force decaying over time after stimulation.

Repetitive sciatic nerve stimulation electromyography

Repetitive sciatic nerve stimulation electromyography of the muscle TA was performed as described previously (Boëx et al., 2022). Briefly, two monopolar reference and recording electrodes were inserted, one close to the patella tendon and the other in the middle of the TA muscle. A monopolar ground electrode was also inserted into the contralateral hindlimb muscle. The sciatic nerve was stimulated with series of 10 stimuli at 5Hz. CMAPs were amplified (BioAmp, ADInstruments), acquired with a sampling rate of 100 kHz, and filtered with a 5-kHz low-pass filter and a 1-Hz high-pass filter (PowerLab 4/25, ADInstruments), and peak-to-peak amplitudes were analyzed with LabChart 8 software (ADInstruments). During all experiments, mouse body temperature was maintained at 37°C with radiant heat. After recordings, the mice were euthanized by cervical dislocation and the muscles were collected.

RNA extraction & RNA seq

Total RNAs from 4 months old mice lumbar spinal cord were isolated using TRI-Reagent according to the manufacturer's protocol and tissue were lysed using Fastprep system and Lysing Matrix D tubes (MP biomedical). For mouse samples, total stranded RNA-seq was performed at the Platform of the Institut du Cerveau. RNA quality control of each sample was realised with Tapestation 2200 (Agilent) and libraries were prepared with the KAPA mRNA hyperprep ROCHE kit, from an input of 250ng. Sequencing was performed on an Illumina NovaSeq 6000 as paired-end 150 bp reads using flowcells SP-300. RNA-seq reads were trimmed using Cutadapt(v2.10) and aligned with STAR (v2.7.5a). The reference genomes used for the alignment are mm10. Quantification of transcripts followed with HTSeq(v0.12.4). All the steps were built in a Nextflow(v20.04.1). Differential alternative splicing was detected by rMATS(v4.1.2), based on the STAR-aligned files (.bam). Detection of events was done with a 'prep' step of each pair of conditions (CTL-vs-dKO, CTL-vs-Mbnl1-KO, CTL vs Hb9Cre-MBNL2-KO), a 'post' step of all conditions together and finally a 'stats' step of each pair of conditions to define *pvalue*, *false discovery rate (FDR)* and *IncLevelDifference* for each comparison. GO terms and biological pathways enrichment analysis was done using the EnrichR (GO Biological process 2021) (Supp table S5-7).

Reverse transcription PCR (RT-PCR)

200 ng RNA was reverse transcribed using SuperScriptIV™ first-strand synthesis system (Life Technologies) in a total of 20 µl. 0,5 microliter of complementary DNA preparation was subsequently used in a semi-quantitative PCR analysis according to standard protocol (ReddyMix, ThermoFisher). PCR amplification was carried out for 0–35 cycles for splicing of pre-mRNA within the linear range of amplification for each gene. PCR products were quantified using the QIAxcel Advanced system (Qiagen). Tanc2 ex 23a and Cacna1d ex 12a primers were as described by (Charizanis et al., 2012), Clasp1 ex26 was described by (Dinca et al., 2022). Dvl1 ex 14b primers: ex13FW (CTTACCAGGACCCTGGCTTC) and ex15REV (TGATTCACTGCCACTACCCC).

NMJS staining from isolated muscle fiber

TA muscle fibers from adult 2- and 4-months old mice were dissected and fixed with 4% PFA in PBS for 30 min at 4°C and rinsed with PBS at room temperature. Isolated muscle fibers were then staining as described previously (Messéant et al., 2015). Briefly, isolated muscle fibers were washed three times for 15 min in PBS, incubated for 15 min with 100 mM glycine in PBS, permeabilized (0.5% Triton X-100 in PBS) for 1 h and blocked for 4 h in blocking buffer (3% BSA, 5% goat serum and 0.5% Triton X-100 in PBS). Isolated muscle fibers were incubated overnight at 4°C with rabbit polyclonal antibodies against NF and Syn in blocking solution. After three washes in PBS, muscles were incubated overnight at 4°C with Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG and Alexa Fluor 488-conjugated α -BTX in blocking solution. After three washes in PBS, isolated muscle fibers were flat-mounted in Vectashield (Vector Laboratories) mounting medium. Images were collected with Zeiss LSM880 confocal microscope and processed through a semi-automatic ImageJ macro adapted from NMJS-morph (Jones et al., 2016).

Spinal cord Nissl staining

Anesthetized mice were transcardially perfused with phosphate buffered saline (PBS), followed by 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate buffer for fixation. spinal cords were post-fixed in 4% PFA overnight, cryoprotected in 30% sucrose for over 24 hr and embedded in Tissue-Tek before storage at -80°C. 14µm transversal cryosections of lumbar spinal cords were mounted on slides, air dried for 30 minutes and stored at -80°C until staining. Slides were air dried for 30 minutes then rinsed in 70% ethanol for 1 minute, stained with cresyl violet (0,05% glacial acid acetic, 0,05% cresyl violet in distilled water) for 15 minutes then quickly rinsed in several ethanol baths: 70%, 70%, 90% and 100% before dehydration with xylene for 1 minute. Sections were covered in DPX mounting medium then coverslipped before drying overnight.

Spinal cord immunostaining

MN immunostaining was adapted from (Besse et al., 2020). After air drying for 30 minutes, slides with transversal cryosections of lumbar spinal cords were permeabilized for 30 minutes (0.1% Triton X-100 in PBS). Then, we performed an unmasking procedure using 85°C heated citric acid monohydrate (10mM, pH6), incubating slides in it twice for 5 minutes. Sections were then cooled in cold PBS. Sections were then washed using the following procedure, repeated along the experiment: twice in PBS for 5 minutes then in 0.1% Triton X-100 in PBS for 2 minutes and once again in PBS for 5 minutes. Sections were isolated using Dako pen. Sections were blocked for 1 hour in blocking buffer (4% BSA, 10% donkey serum and 0.1% Triton X-100 in PBS) then incubated with anti-MBNL1, anti-MBNL2 and anti-ChAT antibodies overnight at 4°C in the blocking solution. Sections were washed, incubated 1 hour at room temperature with Alexa fluor Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 555 donkey anti-mouse IgG and Alexa Fluor 647 donkey anti-goat IgG in 0.1% Triton X-100 in PBS. Finally, sections were washed, incubated with Hoechst (1/2500 in PBS) for 10 minutes, washed twice with PBS and flat-mounted in Vectashield (Vector Laboratories) mounting medium. Images were taken using a Nikon Ti2 confocal microscope with a SCU-W1 spinning disk head (Yokogawa).

MET

Mouse anterior tibialis were fixed for 2 with 2% paraformaldehyde, 2% glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer (pH 7.4). Samples were postfixed with 2% OsO₄, in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) for 1 h, then dehydrated in a graded series of acetone including a 1% uranyl acetate staining step in 70% acetone, and finally embedded in epoxy resin (EMBed-812, Electron Microscopy Sciences, USA). Ultra-thin (70 nm) sections were stained with uranyl acetate and lead citrate. examined using a CM100 Philips transmission electron microscope and photographed with a digital SIS Morada camera.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using the GraphPad Prism software (Version 8, GraphPad Software Inc.). Data distribution was assessed by the Shapiro-Wilk test prior to the use of one-way ANOVA analyses of variance as appropriate.

Acknowledgments: This work was supported by grants from ANR (Agence National de la Recherche, “motor-DM” project to F.R), AFM (Association Francaise contre les Myopathies) and Association Institut de Myologie. CFR was supported by the Fondation pour la Recherche

Médicale (FRM). We thank Pr. M. Swanson for Mbnl1^{Δ3/Δ3}; Mbnl2^{c/c} mouse model. Holt and G. Morris (CIND, RJA Orthopaedic Hospital, UK) as well as “The Muscular Dystrophy Association Monoclonal Antibody Resource” for the MBNL2 antibody, C. Thornton for the MBNL1 polyclonal antibody, the iGenSeq facility and Data analysis core of the Institut du Cerveau (Paris, France).

Author contributions: C.F.R., S.C., J.L. L.A. X.L. conducted most of the experiments. M.H. and J.M contributed to semi-automated NMJs analysis, M.L. conducted animal procedures, L.S. provided resources for NMJs analysis. M.S. provided Mbnl conditional mouse model. D.F. and F.R supervised the project and wrote the manuscript.

Competing interests: The authors declare no conflicts of interest.

References

- Allen, D. E., Johnson, A. G., & Woolf, A. L. (1969). The intramuscular nerve endings in dystrophia myotonica--a biopsy study by vital staining and electron microscopy. *Journal of Anatomy*, *105*(Pt 1), 1–26. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1232086/pdf/janat00396-0008.pdf>
- Batra, R., Charizanis, K., Manchanda, M., Mohan, A., Li, M., Finn, D. J., Goodwin, M., Zhang, C., Sobczak, K., Thornton, C. A., & Swanson, M. S. (2014). Loss of MBNL leads to disruption of developmentally regulated alternative polyadenylation in RNA-mediated disease. *Molecular Cell*, *56*(2), 311–322. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.08.027>
- Besse, A., Astord, S., Marais, T., Roda, M., Giroux, B., Lejeune, F. X., Relaix, F., Smeriglio, P., Barkats, M., & Biferi, M. G. (2020). AAV9-Mediated Expression of SMN Restricted to Neurons Does Not Rescue the Spinal Muscular Atrophy Phenotype in Mice. *Molecular Therapy*, *28*(8), 1887–1901. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.05.011>
- Boëx, M., Cottin, S., Halliez, M., Bauché, S., Buon, C., Sans, N., Montcouquiol, M., Molgó, J., Amar, M., Ferry, A., Lemaitre, M., Rouche, A., Langui, D., Baskaran, A., Fontaine, B., Messéant, J., & Strohlic, L. (2022). The cell polarity protein Vangl2 in the muscle shapes the neuromuscular synapse by binding to and regulating the tyrosine kinase MuSK. *Science Signaling*, *15*(734). <https://doi.org/10.1126/scisignal.abg4982>
- Bolis, A., Coviello, S., Bussini, S., Dina, G., Pardini, C., Previtali, S. C., Malaguti, M., Morana, P., Del Carro, U., Feltri, M. L., Quattrini, A., Wrabetz, L., & Bolino, A. (2005). Loss of Mtmr2 phosphatase in Schwann cells but not in motor neurons causes Charcot-Marie-Tooth type 4B1 neuropathy with myelin outfoldings. *Journal of Neuroscience*, *25*(37), 8567–8577. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2493-05.2005>
- Bombelli, F., Lispi, L., Porrini, S. C., Giacanelli, M., Terracciano, C., Massa, R., & Petrucci, A. (2016). Neuromuscular transmission abnormalities in myotonic dystrophy type 1: A neurophysiological study. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, *150*, 84–88. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2016.08.020>

- Brook, J. D., McCurrach, M. E., Harley, H. G., Buckler, A. J., Church, D., Aburatani, H., Hunter, K., Stanton, V. P., Thirion, J. P., Hudson, T., Sohn, R., Zemelmann, B., Snell, R. G., Rundle, S. A., Crow, S., Davies, J., Shelbourne, P., Buxton, J., Jones, C., ... Housman, D. E. (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. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90154-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90154-5)
- Caillet-Boudin, M. L., Fernandez-Gomez, F. J., Tran, H., Dhaenens, C. M., Buee, L., & Sergeant, N. (2014). Brain pathology in myotonic dystrophy: When tauopathy meets spliceopathy and RNAopathy. In *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Vol. 6, Issue JAN, p. 57). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2013.00057>
- Charizanis, K., Lee, K. Y., Batra, R., Goodwin, M., Zhang, C., Yuan, Y., Shiue, L., Cline, M., Scotti, M. M., Xia, G., Kumar, A., Ashizawa, T., Clark, H. B., Kimura, T., Takahashi, M. P., Fujimura, H., Jinnai, K., Yoshikawa, H., Gomes-Pereira, M., ... Swanson, M. S. (2012). Muscleblind-like 2-Mediated Alternative Splicing in the Developing Brain and Dysregulation in Myotonic Dystrophy. *Neuron*, *75*(3), 437–450. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.05.029>
- Charlet-B., N., Savkur, R. S., Singh, G., Philips, A. V., Grice, E. A., & Cooper, T. A. (2002). Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Molecular Cell*, *10*(1), 45–53. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00572-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00572-5)
- Cheever, T. R., Olson, E. A., & Ervasti, J. M. (2011). Axonal regeneration and neuronal function are preserved in motor neurons lacking β -actin In Vivo. *PLoS ONE*, *6*(3), e17768. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017768>
- Chipman, P. H., Franz, C. K., Nelson, A., Schachner, M., & Rafuse, V. F. (2010). Neural cell adhesion molecule is required for stability of reinnervated neuromuscular junctions. *European Journal of Neuroscience*, *31*(2), 238–249. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.07049.x>
- Choi, J., Personius, K. E., DiFranco, M., Dansithong, W., Yu, C., Srivastava, S., Dixon, D. M., Bhatt, D. B., Comai, L., Vergara, J. L., & Reddy, S. (2015). Muscleblind-Like 1 and Muscleblind-Like 3 Depletion Synergistically Enhances Myotonia by Altering Clc-1 RNA Translation. *EBioMedicine*, *2*(9), 1034–1047. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.07.028>
- Delacroix, C., Hyzewicz, J., Lemaitre, M., Friguet, B., Li, Z., Klein, A., Furling, D., Agbulut, O., & Ferry, A. (2018). Improvement of Dystrophic Muscle Fragility by Short-Term Voluntary Exercise through Activation of Calcineurin Pathway in mdx Mice. *American Journal of Pathology*, *188*(11), 2662–2673. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.07.015>
- Dhaenens, C. M., Tran, H., Frandemiche, M. L., Carpentier, C., Schraen-Maschke, S., Sistiaga, A., Goicoechea, M., Eddarkaoui, S., Van Brussels, E., Obriot, H., Labudeck, A., Gevaert, M. H., Fernandez-Gomez, F., Charlet-Berguerand, N., Deramecourt, V., Maurice, C. A., Buee, L., de Munain, A. L., Sablonnière, B., ... Sergeant, N. (2011). Mis-splicing of Tau exon 10 in myotonic dystrophy type 1 is reproduced by overexpression of CELF2 but not by MBNL1 silencing. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1812*(7), 732–742. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.03.010>
- Dinca, D. M., Lallemand, L., González-Barriga, A., Cresto, N., Sicot, G., Pillet, L.-E., Polveche, H., Magneron, P., Huguet-Lachon, A., Benyamine, H., Azotla-Vilchis, C. N., Agonizantes-Juárez, L. E., Tahraoui-Bories, J., Martinat, C., Hernández-Hernández, O., Auboeuf, D., Rouach, N., Bourgeois, C. F., Gourdon, G., & Gomes-Pereira, M. (2022). Myotonic dystrophy RNA toxicity alters morphology, adhesion and migration of mouse and human astrocytes. *Research Square Preprints*, 10.21203/RS.3.RS-137333/V1. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31594-9>
- Fardeau, M., & Tomé, F. (1980). Light and electron microscopic study of motor endplates in the

- adult and neonatal forms of dystrophia myotonica. In Elsevier/North-Holland Biomedical Press (Ed.), *Ontogenesis and functional mechanisms of peripheral synapses* (pp. 287–298).
- Freyermuth, F., Rau, F., Kokunai, Y., Linke, T., Sellier, C., Nakamori, M., Kino, Y., Arandel, L., Jollet, A., Thibault, C., Philipps, M., Vicaire, S., Jost, B., Udd, B., Day, J. W., Duboc, D., Wahbi, K., Matsumura, T., Fujimura, H., ... Charlet-Berguerand, N. (2016). Splicing misregulation of SCN5A contributes to cardiac-conduction delay and heart arrhythmia in myotonic dystrophy. *Nature Communications*, 7, 11067. <https://doi.org/10.1038/ncomms11067>
- Fugier, C., Klein, A. F., Hammer, C., Vassilopoulos, S., Ivarsson, Y., Toussaint, A., Tosch, V., Vignaud, A., Ferry, A., Messadeg, N., Kokunai, Y., Tsuburaya, R., De La Grange, P., Dembele, D., Francois, V., Precigout, G., Boulade-Ladame, C., Hummel, M. C., De Munain, A. L., ... Charlet-Berguerand, N. (2011). Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy. *Nature Medicine*, 17(6), 720–725. <https://doi.org/10.1038/nm.2374>
- Goodwin, M., Mohan, A., Batra, R., Lee, K. Y., Charizanis, K., Fernández Gómez, F. J., Eddarkaoui, S., Sergeant, N., Buée, L., Kimura, T., Clark, H. B., Dalton, J., Takamura, K., Weyn-Vanhenenryck, S. M., Zhang, C., Reid, T., Ranum, L. P. W., Day, J. W., & Swanson, M. S. (2015). MBNL Sequestration by Toxic RNAs and RNA Misprocessing in the Myotonic Dystrophy Brain. *Cell Reports*, 12(7), 1159–1168. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.029>
- Harper. (2001). Myotonic dystrophy, 3rd edition. In *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. <https://doi.org/10.1136/jnnp.72.3.422-a>
- Hernández-Hernández, O., Guiraud-Dogan, C., Sicot, G., Huguet, A., Lullier, S., Steidl, E., Saenger, S., Marciniak, E., Obriot, H., Chevarin, C., Nicole, A., Revillod, L., Charizanis, K., Lee, K. Y., Suzuki, Y., Kimura, T., Matsuura, T., Cisneros, B., Swanson, M. S., ... Gomes-Pereira, M. (2013). Myotonic dystrophy CTG expansion affects synaptic vesicle proteins, neurotransmission and mouse behaviour. *Brain*, 136(3), 957–970. <https://doi.org/10.1093/brain/aws367>
- Hess, D. M., Scott, M. O., Potluri, S., Pitts, E. V., Cisterni, C., & Balice-Gordon, R. J. (2007). Localization of TrkC to Schwann cells and effects of neurotrophin-3 signaling at neuromuscular synapses. *Journal of Comparative Neurology*, 501(4), 465–482. <https://doi.org/10.1002/cne.21163>
- Jiang, H., Mankodi, A., Swanson, M. S., Moxley, R. T., & Thornton, C. A. (2004). Myotonic dystrophy type 1 is associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of muscleblind proteins and deregulated alternative splicing in neurons. *Human Molecular Genetics*, 13(24), 3079–3088. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh327>
- Jones, R. A., Reich, C. D., Dissanayake, K. N., Kristmundsdottir, F., Findlater, G. S., Ribchester, R. R., Simmen, M. W., & Gillingwater, T. H. (2016). NMJ-morph reveals principal components of synaptic morphology influencing structure–function relationships at the neuromuscular junction. *Open Biology*, 6(12), 160240. <https://doi.org/10.1098/rsob.160240>
- Kanadia, R. N., Johnstone, K. A., Mankodi, A., Lungu, C., Thornton, C. A., Esson, D., Timmers, A. M., Hauswirth, W. W., & Swanson, M. S. (2003). A Muscleblind Knockout Model for Myotonic Dystrophy. *Science*, 302(5652), 1978–1980. <https://doi.org/10.1126/science.1088583>
- Kanning, K. C., Kaplan, A., & Henderson, C. E. (2010). Motor neuron diversity in development and disease. In *Annual Review of Neuroscience* (Vol. 33, Issue 1, pp. 409–440). Annual Reviews. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135722>

- Klein, A. F., Gasnier, E., & Furling, D. (2011). Gain of RNA function in pathological cases: Focus on myotonic dystrophy. In *Biochimie* (Vol. 93, Issue 11, pp. 2006–2012). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.06.028>
- Klinck, R., Fourrier, A., Thibault, P., Toutant, J., Durand, M., Lapointe, E., Caillet-Boudin, M. L., Sergeant, N., Gourdon, G., Meola, G., Furling, D., Puymirat, J., & Chabot, B. (2014). RBFOX1 cooperates with MBNL1 to control splicing in muscle, including events altered in myotonic dystrophy type 1. *PLoS ONE*, 9(9), 18–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107324>
- Konieczny, P., Stepniak-Konieczna, E., & Sobczak, K. (2014). MBNL proteins and their target RNAs, interaction and splicing regulation. *Nucleic Acids Research*, 42(17), 10873–10887. <https://doi.org/10.1093/nar/gku767>
- Krishnan, A. V., & Kiernan, M. C. (2006). Axonal function and activity-dependent excitability changes in myotonic dystrophy. *Muscle and Nerve*, 33(5), 627–636. <https://doi.org/10.1002/mus.20516>
- Lee-Hsin, W., Yu-Mei, L., Chien-Yu, L., Yijuang, C., & Guey-Shin, W. (2020). *Neurodegeneration induces a developmental RNA processing program by calpain-mediated MBNL2 degradation*. 886, 1–35.
- Lee, K.-Y., Seah, C., Li, C., Chen, Y.-F., Chen, C.-Y., Wu, C.-I., Liao, P.-C., Shyu, Y.-C., Olafson, H. R., McKee, K. K., Wang, E. T., Yeh, C.-H., & Wang, C.-H. (2022). Mice lacking MBNL1 and MBNL2 exhibit sudden cardiac death and molecular signatures recapitulating myotonic dystrophy. *Human Molecular Genetics*, 5–6. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddac108>
- Lee, K. Y., Chang, H. C., Seah, C., & Lee, L. J. (2019). Deprivation of Muscleblind-Like Proteins Causes Deficits in Cortical Neuron Distribution and Morphological Changes in Dendritic Spines and Postsynaptic Densities. *Frontiers in Neuroanatomy*, 13, 75. <https://doi.org/10.3389/fnana.2019.00075>
- Lee, K. Y., Li, M., Manchanda, M., Batra, R., Charizanis, K., Mohan, A., Warren, S. A., Chamberlain, C. M., Finn, D., Hong, H., Ashraf, H., Kasahara, H., Ranum, L. P. W., & Swanson, M. S. (2013). Compound loss of muscleblind-like function in myotonic dystrophy. *EMBO Molecular Medicine*, 5(12), 1887–1900. <https://doi.org/10.1002/emmm.201303275>
- Li, X. M., Dong, X. P., Luo, S. W., Zhang, B., Lee, D. H., Ting, A. K. L., Neiswender, H., Kim, C. H., Carpenter-Hyland, E., Gao, T. M., Xiong, W. C., & Mei, L. (2008). Retrograde regulation of motoneuron differentiation by muscle β -catenin. *Nature Neuroscience*, 11(3), 262–268. <https://doi.org/10.1038/nn2053>
- Luria, V., & Laufer, E. (2007). Lateral motor column axons execute a ternary trajectory choice between limb and body tissues. *Neural Development*, 2(1), 13. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-2-13>
- Macdermot, V. (1961). The histology of the neuromuscular junction in dystrophia myotonica. *Brain*, 84(1), 75–84. <https://doi.org/10.1093/brain/84.1.75>
- Mende, Y., Jakubik, M., Riessland, M., Schoenen, F., Roßbach, K., Kleinridders, A., Köhler, C., Buch, T., & Wirth, B. (2010). Deficiency of the splicing factor Sfrs10 results in early embryonic lethality in mice and has no impact on full-length SMN /Smn splicing. *Human Molecular Genetics*, 19(11), 2154–2167. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq094>
- Messéant, J., Dobbertin, A., Girard, E., Delers, P., Manuel, M., Mangione, F., Schmitt, A., Le Denmat, D., Molgó, J., Zytnicki, D., Schaeffer, L., Legay, C., & Strohlic, L. (2015). Musk frizzled-like domain is critical for mammalian neuromuscular junction formation and maintenance. *Journal of Neuroscience*, 35(12), 4926–4941. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3381-14.2015>
- Nakamori, M., Sobczak, K., Puwanant, A., Welle, S., Eichinger, K., Pandya, S., Dekdebrun, J.,

- Heatwole, C. R., McDermott, M. P., Chen, T., Cline, M., Tawil, R., Osborne, R. J., Wheeler, T. M., Swanson, M. S., Moxley, R. T., & Thornton, C. A. (2013). Splicing biomarkers of disease severity in myotonic dystrophy. *Annals of Neurology*, *74*(6), 862–872. <https://doi.org/10.1002/ana.23992>
- Panaite, P. A., Gantelet, E., Kraftsik, R., Gourdon, G., Kuntzer, T., & Barakat-Walter, I. (2008). Myotonic dystrophy transgenic mice exhibit pathologic abnormalities in diaphragm neuromuscular junctions and phrenic nerves. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *67*(8), 763–772. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e318180ec64>
- Poulos, M. G., Batra, R., Li, M., Yuan, Y., Zhang, C., Darnell, R. B., & Swanson, M. S. (2013). Progressive impairment of muscle regeneration in muscleblind-like 3 isoform knockout mice. *Human Molecular Genetics*, *22*(17), 3547–3558. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt209>
- Pratt, S. J. P., Shah, S. B., Ward, C. W., Inacio, M. P., Stains, J. P., & Lovering, R. M. (2013). Effects of in vivo injury on the neuromuscular junction in healthy and dystrophic muscles. *Journal of Physiology*, *591*(2), 559–570. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.241679>
- Pratt, S. J. P., Shah, S. B., Ward, C. W., Kerr, J. P., Stains, J. P., & Lovering, R. M. (2014). Recovery of altered neuromuscular junction morphology and muscle function in mdx mice after injury. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *72*(1), 153–164. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1663-7>
- Pratt, S. J. P., Valencia, A. P., Le, G. K., Shah, S. B., & Lovering, R. M. (2015). Pre- and postsynaptic changes in the neuromuscular junction in dystrophic mice. *Frontiers in Physiology*, *6*(SEP), 252. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00252>
- Rau, F., Freyermuth, F., Fugier, C., Villemin, J. P., Fischer, M. C., Jost, B., Dembele, D., Gourdon, G., Nicole, A., Duboc, D., Wahbi, K., Day, J. W., Fujimura, H., Takahashi, M. P., Auboeuf, D., Dreumont, N., Furling, D., & Charlet-Berguerand, N. (2011). Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy. *Nature Structural and Molecular Biology*, *18*(7), 840–845. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2067>
- Rau, F., Lainé, J., Ramanoudjame, L., Ferry, A., Arandel, L., Delalande, O., Jollet, A., Dingli, F., Lee, K. Y., Peccate, C., Lorain, S., Kabashi, E., Athanasopoulos, T., Koo, T., Loew, D., Swanson, M. S., Le Rumeur, E., Dickson, G., Allamand, V., ... Furling, D. (2015). Abnormal splicing switch of DMD's penultimate exon compromises muscle fibre maintenance in myotonic dystrophy. *Nature Communications*, *6*(1), 7205. <https://doi.org/10.1038/ncomms8205>
- Sergeant, N., Sablonnière, B., Schraen-Maschke, S., Ghestem, A., Maurage, C. A., Wattez, A., Vermersch, P., & Delacourte, A. (2001). Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Human Molecular Genetics*, *10*(19), 2143–2155. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.19.2143>
- Shafer, B., Onishi, K., Lo, C., Colakoglu, G., & Zou, Y. (2011). Vangl2 Promotes Wnt/Planar Cell Polarity-like Signaling by Antagonizing Dvl1-Mediated Feedback Inhibition in Growth Cone Guidance. *Developmental Cell*, *20*(2), 177–191. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.01.002>
- Shen, C., Li, L., Zhao, K., Bai, L., Wang, A., Shu, X., Xiao, Y., Zhang, J., Zhang, K., Hui, T., Chen, W., Zhang, B., Hsu, W., Xiong, W. C., & Mei, L. (2018). Motoneuron Wnts regulate neuromuscular junction development. *ELife*, *7*. <https://doi.org/10.7554/eLife.34625>
- Slater, C. R. (2020). 'Fragmentation' of NMJs: a sign of degeneration or regeneration? A long journey with many junctions. *Neuroscience*, *439*, 28–40. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.05.017>
- Spilker, K. A., Wang, G. J., Tugizova, M. S., & Shen, K. (2012). *Caenorhabditis elegans* Muscleblind homolog mbl-1 functions in neurons to regulate synapse formation. *Neural Development*, *7*(1),

1–14. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-7-7>

- Suenaga, K., Lee, K. Y., Nakamori, M., Tatsumi, Y., Takahashi, M. P., Fujimura, H., Jinnai, K., Yoshikawa, H., Du, H., Ares, M., Swanson, M. S., & Kimura, T. (2012). Muscleblind-like 1 knockout mice reveal novel splicing defects in the myotonic dystrophy brain. *PLoS ONE*, 7(3), e33218. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033218>
- Tang, Z. Z., Yarotsky, V., Wei, L., Sobczak, K., Nakamori, M., Eichinger, K., Moxley, R. T., Dirksen, R. T., & Thornton, C. A. (2012). Muscle weakness in myotonic dystrophy associated with misregulated splicing and altered gating of Ca v1.1 calcium channel. *Human Molecular Genetics*, 21(6), 1312–1324. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr568>
- Wang, E. T., Cody, N. A. L., Jog, S., Biancolella, M., Wang, T. T., Treacy, D. J., Luo, S., Schroth, G. P., Housman, D. E., Reddy, S., Lécuyer, E., & Burge, C. B. (2012). Transcriptome-wide regulation of pre-mRNA splicing and mRNA localization by muscleblind proteins. *Cell*, 150(4), 710–724. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.041>
- Wang, W., Li, X., Lee, M., Jun, S., Aziz, K. E., Feng, L., Tran, M. K., Li, N., McCrea, P. D., Park, J. II, & Chen, J. (2015). FOXKs promote Wnt/ β -catenin signaling by translocating DVL into the nucleus. *Developmental Cell*, 32(6), 707–718. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.01.031>
- Wheeler, T. M., Krym, M. C., & Thornton, C. A. (2007). Ribonuclear foci at the neuromuscular junction in myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul Disorders*, 17(3), 242–247. [https://doi.org/S0960-8966\(07\)00004-1](https://doi.org/S0960-8966(07)00004-1) [pii]\r10.1016/j.nmd.2006.12.015

Résultats complémentaires

La perte de MBNL2 dans les MN n'induit pas d'anomalies tardives de la JNM

La nette aggravation de la structure des JNM entre 2 et 4 mois des souris dKO a montré que la maintenance de la JNM est altérée par la perte des protéines MBNL. En revanche, les plaques motrices des souris Hb9Cre-Mbnl2-KO ne se détériorent pas, 4 mois après la naissance des souris. En supposant que cette déficience puisse apparaître plus tardivement chez les souris Hb9Cre-Mbnl2-KO, nous avons caractérisé les JNM des souris CTL et Hb9Cre-Mbnl2-KO âgées de 1 an, en comparaison avec les souris âgées de 4 mois (Figure 28).

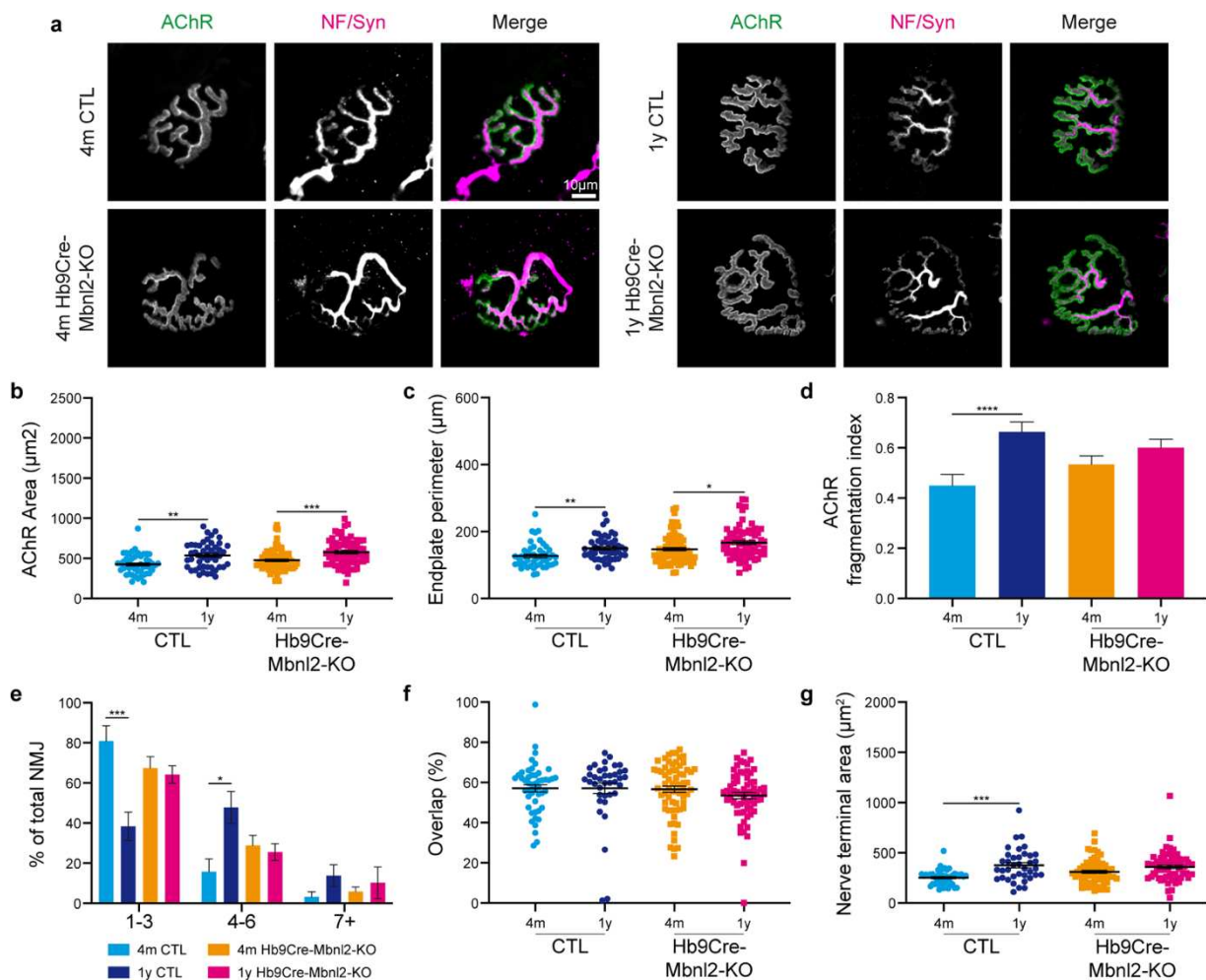


Figure 28 : JNM des souris Hb9Cre-Mbnl2-KO de 1 an

(a) Images confocales représentatives des JNM de TA de souris CTL et Hb9Cre-Mbnl2-KO âgées de 4 mois ou 1 an. Neurofilament (NF, magenta) et Synapsine (SYN, magenta) avec α -BTX (RACH, vert). (b-f) Quantifications des caractéristiques structurales des JNM de TA de souris CTL et Hb9Cre-Mbnl2-KO âgées de 4 mois ou 1 an. (b) Aire des RACH. (c) Périmètre de la plaque motrice. (d) Index de fragmentation des RACH. (e) Pourcentages de JNMs qui contiennent le nombre de fragments de RACH indiqués. (f) Ratio de la superposition des marquages pré- et postsynaptiques. (g) Aire terminal nerveuse.

$n_{CTL4m} = 4$, au moins 9 JNM par souris ; $n_{CTL1y} = 3$, au moins 16 JNM par souris ; $n_{Hb9Cre-Mbnl2-KO4m} = 7$, au moins 9 JNM par souris ; $n_{Hb9Cre-Mbnl2-KO1y} = 5$, au moins 11 JNM par souris. Les barres d'erreur indiquent la s.e.m ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. One way Anova : (b, c, f, g) test de Tukey ; (d) test de Dunn. (e) Two way Anova : test de Sidak.

Les JNM des TA des souris Hb9Cre-Mbnl2-KO âgées de 1 an ont un aspect similaire à celles des souris CTL de même âge. Comme les JNM des souris âgées de 4 mois, elles ont un aspect bien délimité et perforé et ne présentent pas de défaut d'innervation (Figure 28 a). L'aire occupée par les RACH (Figure 28 b) ainsi que le périmètre de la plaque motrice terminale (Figure 28 c) des JNM des souris Hb9Cre-Mbnl2-KO mais aussi CTL augmente entre 4 mois et 1 an. Ainsi, la déplétion de Mbnl2 spécifiquement dans les MN ne conduit pas à une augmentation anormale tardive de la taille des JNM comparées aux souris CTL.

En outre, les JNM des souris CTL âgées de 1 an présente des structures post-synaptiques discontinues avec un taux de fragmentation supérieur à celui observées chez des souris plus jeunes (4 mois) (Figure 28 d). La proportion de « cluster » de RACH CTL présentant de 1 à 3 fragments diminue de 40% et le nombre de RACH présentant entre 4 et 6 fragments est significativement augmentée, confirmant les résultats précédemment publiés sur la tendance des plaques motrices à se fragmenter au cours du vieillissement (Figure 28 e)(Valdez et al., 2010). En revanche, tout comme nous l'avions observé à 4 mois, et contrairement aux souris CTL, les JNM des TA des souris Hb9Cre-Mbnl2-KO âgées de 1 an ne présentent pas de fragmentation des RACH. Ces résultats surprenants suggèreraient que la perte de Mbnl2 seul dans le MN pourrait avoir un effet protecteur quant à la fragmentation des « clusters » de RACH au cours du vieillissement.

Quant au côté présynaptique, l'aire terminale nerveuse, de la même manière que l'aire des RACH, augmente significativement chez les souris CTL entre 4 mois et 1 an mais pas chez les souris Hb9Cre-MBNL2. Toutefois, la colocalisation des marquages pré- et postsynaptiques ne varie pour

aucune condition montrant l'absence d'anomalie de l'innervation des JNM chez ses souris (Figure 28 f). Enfin, l'aire terminale nerveuse de la même manière que l'aire des RCh, augmente significativement chez les souris CTL entre 4 mois et 1 an mais pas chez les souris Hb9Cre-MBNL2 (Figure 28 g). Il n'y a donc pas d'anomalie de l'innervation des JNM des souris Hb9Cre-Mbnl2-KO, 1 an après la naissance. Ainsi, la perte d'expression de Mbnl2 dans les MN ne conduit pas à l'apparition tardive d'anomalies de la structure des JNM.

MBNL dans le muscle squelettique participe au maintien de la JNM

Notre étude du modèle dKO en comparaison du modèle Mbnl1-KO nous a permis de démontrer l'importance des protéines MBNL dans le MN pour le maintien des JNM et suggère leur implication au niveau de la communication neuromusculaire. Les atteintes structurales de la JNM des souris Mbnl1-KO étant cependant sévères au niveau post-synaptique, elles soulèvent la question suivante : quel est le rôle de MBNL dans le muscle squelettique sur le maintien de la JNM ? Dans ce but, nous avons déplété à la fois Mbnl1 et Mbnl2 spécifiquement dans le muscle squelettique (TA) de souris adultes sauvages (âgées de 2 mois) par injection intramusculaire de virus adéno-associés (AAV). En effet, la protéine MBNL1 est exprimée de manière prédominante dans le muscle squelettique mais sa déplétion induit une compensation par surexpression de son paralogue MBNL2 (K. Y. Lee et al., 2013).

Pour cela, nous avons injecté des AAV contenant un shmiR dirigé contre Mbnl1 et Mbnl2 (shMBNL), sous contrôle du promoteur synthétique sPC5.12 spécifique au muscle squelettique. Contrairement aux shARN qui sont transcrits par l'ARN polymérase III, les shmiR sont transcrits par l'ARN polymérase II, ce qui permet de placer leur expression sous l'influence d'un promoteur tissu-spécifique (K. H. Chung et al., 2006). Des AAV exprimant un shmiR contrôle dirigé contre l'ARNm bactérien LacZ ont été injectés dans le TA contralatéral (shCtl). Nous avons ensuite prélevé les TA injectés 2 ou 4 mois post-injection (PI) et avons confirmé par qRT-PCR une diminution de l'expression de l'ARNm de MBNL1 de 80% et de MBNL2 de 50% dans les TA exprimant le shMBNL par rapport aux shCtl, 2 mois PI comme 4 mois PI (Figure 29 a, b).

De plus, nous n'avons pas relevé de diminution évidente de la quantité relative de l'ARNm de MBNL1 et de MBNL2 dans le nerf sciatique ou la moelle épinière correspondants aux TA injectés avec les AAV-shMBNL 4m PI, confirmant la spécificité de notre approche pour le muscle squelettique (Figure 29 c, d). La perte de MBNL1 et MBNL2 dans le muscle squelettique adulte entraîne l'apparition de la myotonie (Figure 29 e), ainsi qu'une diminution de la force maximale spécifique (Figure 29 f) précédemment décrits dans les modèles DM1 (Mankodi et al., 2000;

Vignaud et al., 2010) et de déplétion de MBNL (Choi et al., 2015; K. Y. Lee et al., 2013; Kanadia, Johnstone, et al., 2003).

Notre approche par ARN interférence est donc efficace pour étudier l'impact de la perte de MBNL1 et MBNL2 dans le muscle squelettique adulte.

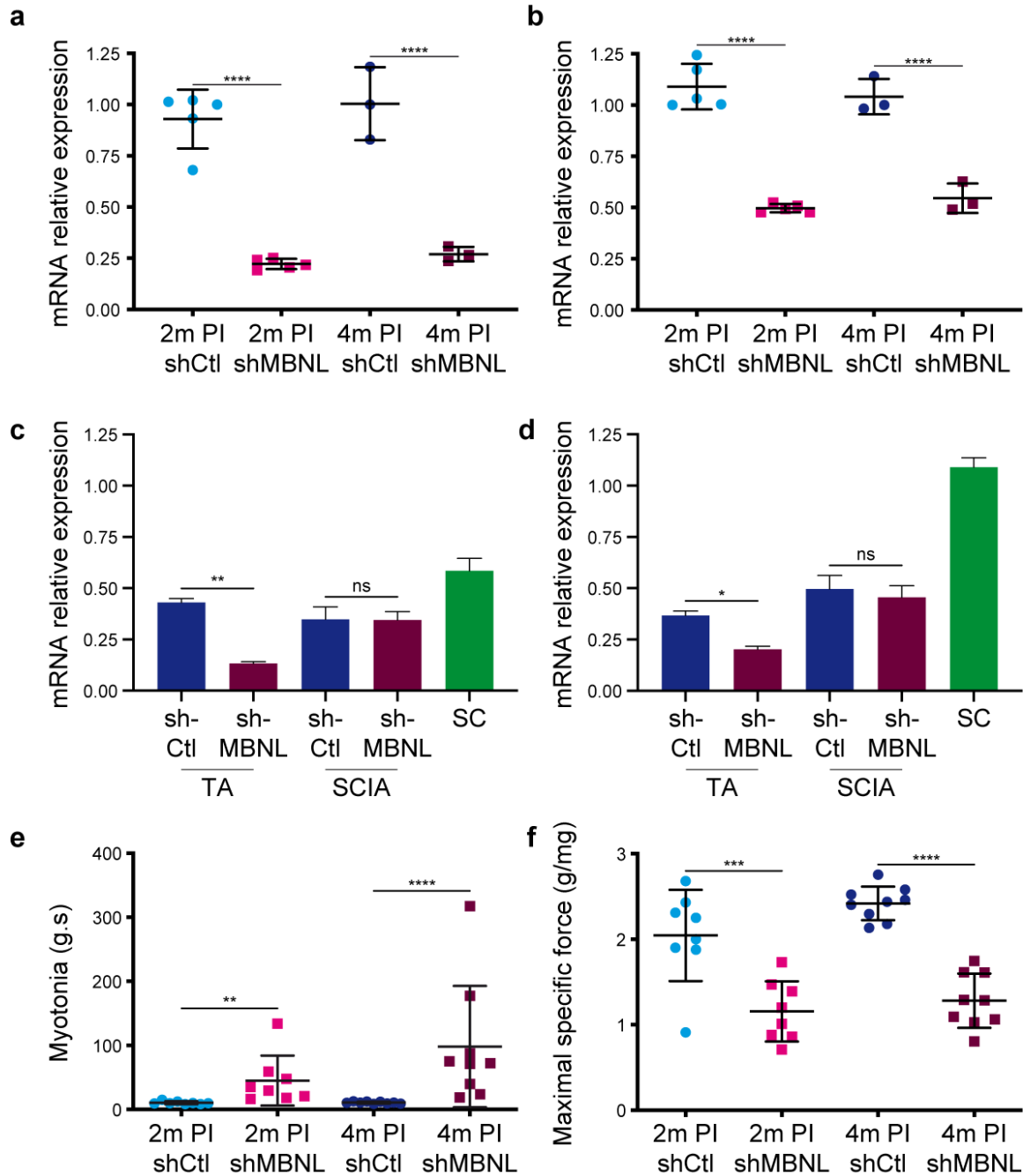


Figure 29 : L'injection d'AAV-shMBNL provoque la diminution importante de Mbnl1 et Mbnl2 spécifiquement dans le muscle squelettique

(a-d) Quantifications des quantités relatives des ARNm Mbnl1 (a) et Mbnl2 (b) par RT-PCR quantitative par rapport à la quantité d'ARNm de RLP0 : (a, b) dans les TA exprimant le shCtl ou le shMBNL, 2 et 4 mois PI ; (c, d) dans les TA, nerfs sciatiques (SCIA) et moelle épinière (SC) des souris injectées avec les AAV exprimant le shCtl et le shMBNL, 4 mois PI. (e) Mesure *in situ* de la myotonie (g.s) dans les TA exprimant le shCtl ou le shMBNL, 2 et 4 mois PI. (f) Analyse quantitative dans les TA exprimant le shCtl ou le shMBNL, 2 et 4 mois PI, des forces maximales spécifiques absolues (g/mg de muscle) par stimulation nerveuse.

(a, b) $n_{\text{shCtl}2\text{mPI}} = 5$; $n_{\text{shMBNL}2\text{mPI}} = 5$; $n_{\text{shCtl}4\text{mPI}} = 3$; $n_{\text{shMBNL}4\text{mPI}} = 3$. One way Anova : test de Tukey. (c, d) $n_{\text{TAshCtl}4\text{mPI}} = 4$; $n_{\text{TAshMBNL}4\text{mPI}} = 3$; $n_{\text{SCIAshCtl}4\text{mPI}} = 4$; $n_{\text{SCIAshMBNL}4\text{mPI}} = 4$; $n_{\text{SC}4\text{mPI}} = 4$. Test de Student apparié. (e, f) $n_{\text{shCtl}2\text{mPI}} = 8$; $n_{\text{shMBNL}2\text{mPI}} = 8$; $n_{\text{shCtl}4\text{mPI}} = 9$; $n_{\text{shMBNL}4\text{mPI}} = 9$. One way Anova : (e) test de Dunn ; (f) test de Tukey. Les barres d'erreur indiquent la s.e.m ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

L'analyse des JNM et de la communication neuromusculaire de ces souris, 2 et 4 mois PI, est présentée figure 30.

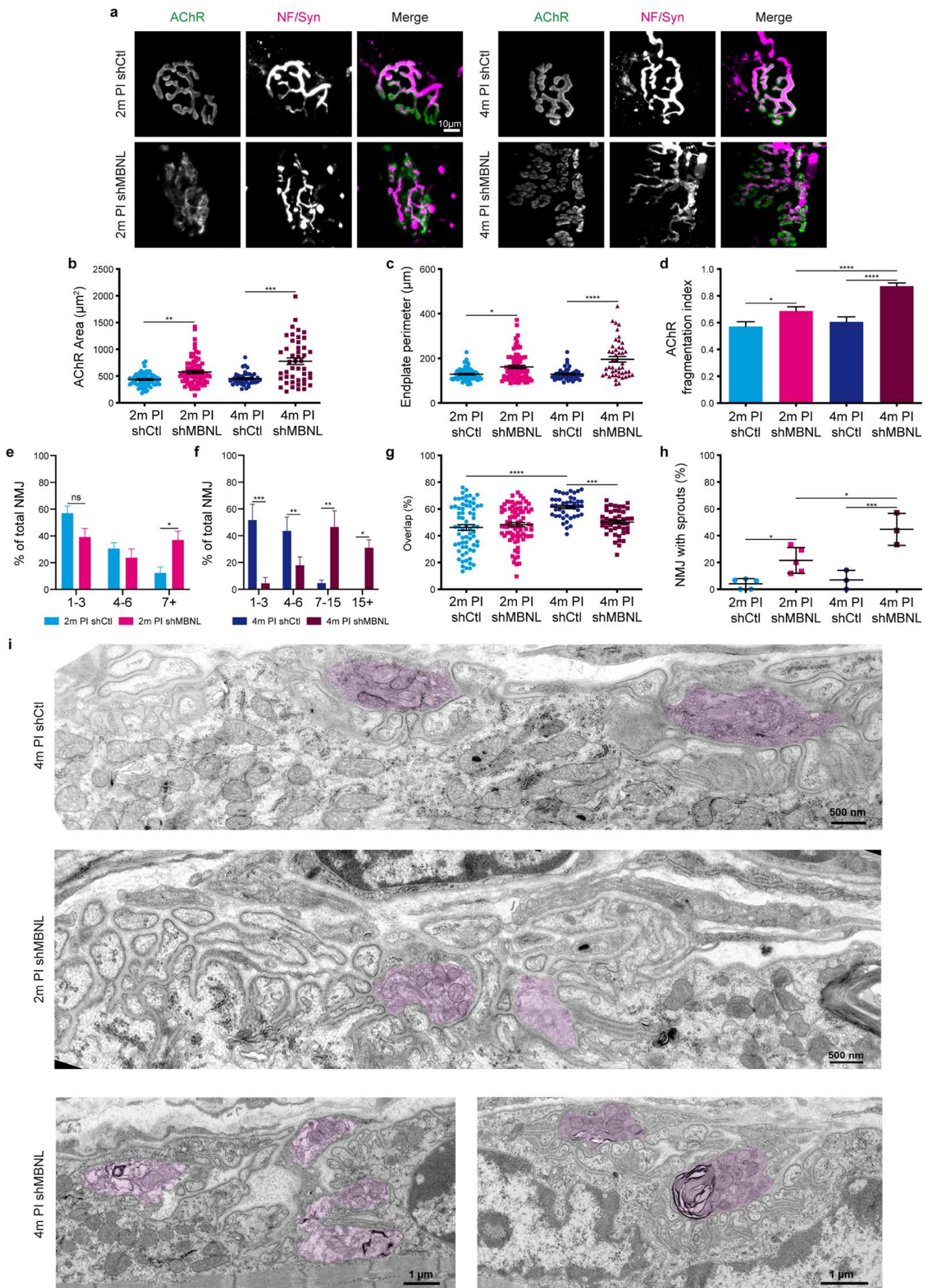


Figure 30 : La depletion simultanée de Mbnl1 et Mbnl2 dans le muscle squelettique adulte induit des défauts structuraux progressifs de la JNM

(a) Images confocales représentatives des JNM de souris WT injectées avec des AAV-Ctl (shCtl) ou des AAV-shMbnl (shMBNL), 2 ou 4 mois PI (Post-injection). Neurofilament (NF, magenta) et Synapsine (SYN, magenta) avec α -BTX (RACH, vert).

(b-h) Quantifications des caractéristiques structurales des JNM de TA de souris WT injectées avec les shCtl ou les shMBNL, 2 ou 4 mois PI. (b) Aire des RACH. (c) Périmètre de la plaque motrice. (d) Index de fragmentation des RACH. (e, f) Pourcentages de JNMs des TA exprimant les shCtl ou shMBNL, 2 mois PI (e) ou 4 mois PI (f), qui contiennent le nombres de fragments de RACH indiqués. (g) Ratio de la superposition des marquages pré- et postsynaptiques. (h) Proportion de JNM avec des « sprouts ».

$n_{shCtl2mPI} = 5$, au moins 12 JNM par TA ; $n_{shMBNL2mPI} = 5$, au moins 15 JNM par TA ; $n_{shCtl4mPI} = 3$, au moins 14 JNM par TA ; $n_{shMBNL4mPI} = 3$, au moins 14 JNM par TA.

(i) Images de microscopie électronique à transmission de JNM de TA de souris WT injectées avec les shCtl 4 mois PI ou les shMBNL, 2 ou 4 mois PI. Les boutons synaptiques sont coloriés en violet.

Les barres d'erreur indiquent la s.e.m ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. One way Anova : (b, c, d, g, h) test de Dunn. (e, f) Two way anova : test de Sidak.

Chez la souris, la JNM adopte sa conformation adulte au bout de 20 jours après la naissance et à 2 mois, elle est considérée comme mature (Slater, 1982). 2 mois et 4 mois PI, les clusters de RACH des TA exprimant le shCtl ont une forme perforée en bretzel qui dénote de cette maturité (Figure 30 a). L'aire occupée par les RACH est augmentée pour les JNM des TA exprimant le shMBNL par rapport au shCtl, passant à une aire moyenne de 435 à 575 μm^2 et de 452 à 777 μm^2 entre 2 et 4 mois PI respectivement (Figure 30 b). De même le périmètre des plaques motrices shMBNL s'agrandit par rapport à celui des shCtl, passant de 128 à 161 μm et de 129 à 195 μm entre 2 et 4 mois PI respectivement (Figure 30 c). Ainsi, la taille des plaques motrices des TA injectés avec le shMBNL est bien plus grande qu'avec le shCtl, 2 mois PI et de manière encore plus importante 4 mois PI.

En plus d'une modification de la taille des JNM, les RACH des TA injectés avec le shMBNL présentent un aspect fragmenté avec un marquage discontinu des RACH, confirmé par l'augmentation de l'index de fragmentation 2 mois et 4 mois PI (Figure 30 d). 2 mois PI, les JNM avec plus de 7 fragments représentent environ 10% des synapses dans les TA exprimant le shCtl

(Figure 30 d). Cette proportion est portée à 37% dans les TA shMBNL 2 mois PI et à 87% 4 mois PI avec plus de 30% des JNM présentant plus de 15 fragments. Ainsi, les « clusters » de RACH des TA exprimant le shMBNL sont plus fragmentés que dans les TA exprimant le shCtl avec une sévérité accrue 4 mois PI (Figure 30 e, f).

Quant au côté présynaptique, nous avons décelé une diminution de 10% de la surface colocalisant entre les marquages pré- et postsynaptiques parmi les JNM des TA exprimant le shMBNL par rapport au shCtl 4 mois PI (Figure 30 g). Étonnamment, le ratio associé au shCtl 4 mois PI est plus élevé que 2 mois auparavant de 10%. Le muscle squelettique et la JNM continuent de croître après la naissance jusqu'aux alentours de 2 mois après la naissance (Cano et al., 2013; Gokhin et al., 2008), ce qui pourrait expliquer cette augmentation de la colocalisation entre les parties pré- et postsynaptiques entre 2 et 4 mois chez les souris transgéniques CTL. Cependant, les souris soumises à notre injection d'AAV ont 2 mois au moment de l'injection et 4 mois 2 mois PI ; elles ont donc un profil entièrement adulte dès 2 mois PI. Un processus régénératif pourrait être à l'origine de cette différence.

Le déficit d'innervation détecté 4 mois PI est associé avec l'apparition de « sprouts » terminaux de neurofilament dans 44% des JNM analysées des TA shMBNL (Figure 30 h). 2 mois PI, 21% des JNM sont déjà concernées par ce phénomène tandis que les TA shCtl ne développent pas ces structures 2 ou 4 mois PI. De la même manière que pour les défauts postsynaptiques, les altérations présynaptiques des souris AAV-shMbnl1/2 sont bien plus importantes 4 mois PI que 2 mois PI. Cette aggravation est encore plus marquée que pour les anomalies postsynaptiques puisque le défaut d'innervation n'est pas présent 2 mois PI.

Ces observations sont corroborées par l'analyse ultrastructurale de ces JNM. En effet, les JNM des TA exprimant le shMBNL présentent, 2 mois PI, des défauts strictement postsynaptiques avec des zones de dégénérescence dans des gouttières synaptiques anormalement formées. Ces défauts sont retrouvés 4 mois PI mais sont associés à des dégénérescences des boutons terminaux (Figure 30 i). Ces analyses montrent donc une aggravation globale au cours du temps des JNM des TA suite à une perte de Mbnl1 et Mbnl2 à l'âge adulte. Ainsi, nos résultats montrent que la perte des protéines MBNL dans le muscle squelettique adulte altère le maintien de la JNM et suggèrent que les protéines MBNL (et notamment MBNL1) exprimées dans le muscle squelettique peuvent réguler le métabolisme d'ARN impliqués dans le maintien de la JNM.

De plus, de la même manière que pour les JNM des souris transgéniques Mbnl1-KO, les altérations des TA exprimant le shMBNL 2 mois PI semblent postsynaptiques. Cette ressemblance

suggère un rôle pour MBNL1 dans le maintien de la postsynapse, MBNL2 étant surtout exprimé par compensation dans le muscle squelettique (K. Y. Lee et al., 2013). Par ailleurs, les altérations relevées 2 mois PI des JNM des TA shMBNL s'étendent au compartiment pré-synaptique à 4 mois PI. Il est en effet possible que des dérégulations au niveau postsynaptique dues à la perte de MBNL1 puissent causer une détérioration de la présynapse, par un mécanisme rétrograde restant à déterminer tel que cela a été montré pour Lrp4 (Barik et al., 2014).

Alors que la structure et l'ultrastructure des JNM sont altérées dans les TA de souris déplétées pour MBNL, l'analyse par électromyogramme (EMG) n'a pas permis de mettre en évidence des défauts de la communication nerf-muscle avec une absence de décrement du CMAP des TA exprimant le shMBNL par rapport aux TA exprimant le shCtl, 2 ou 4 mois PI (Figure 31 a). Ce résultat suggère que les défauts de la JNM ne sont pas suffisants pour provoquer un déficit de la communication neuromusculaire. En effet, malgré une baisse de la force maximale spécifique directe des TA shMBNL par rapport aux TA shCtl 2 et 4 mois PI (Figure 31 b), les TA déplétés de Mbnl1 et Mbnl2 ne manifestent pas de diminution du ratio de la force directe sur la force indirecte (Figure 31 c), une mesure de l'implication nerveuse dans la génération de la force tétanique. Les altérations fonctionnelles causées par la perte de Mbnl1 et Mbnl2 dans le muscle squelettique seraient donc soit purement musculaires, soit les anomalies pré-synaptiques observées par MET ne sont pas suffisantes pour observer une modification fonctionnelle avec les techniques utilisées.

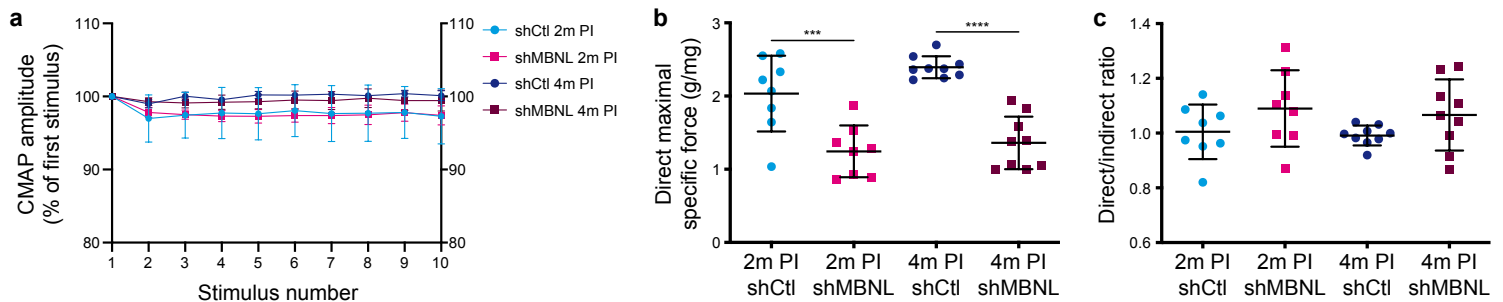


Figure 31 : La perte de MBNL dans le muscle squelettique n'induit pas de défauts manifestes de la communication neuromusculaire

(a) Quantification de l'amplitude des 10 premiers Potentiels d'action musculaire composés (CMAP), exprimées en pourcentage du premier pic, à 5Hz. (b) Analyse quantitative dans les TA exprimant le shCtl ou le shMBNL, 2 et 4 mois PI, des forces maximales spécifiques directes (g/mg de muscle) par stimulation musculaire. (c) Calcul du ratio des forces maximales spécifiques directes et absolues. $n_{shCtl2mPI} = 8$; $n_{shMBNL2mPI} = 8$; $n_{shCtl4mPI} = 9$; $n_{shMBNL4mPI} = 9$. (a) Two way Anova : test de Tukey. (a, b) One way Anova : test de Tukey.

Contribution du muscle squelettique aux défauts de la JNM dans un contexte DM1

Les modèles transgéniques Mbnl-KO et de déplétion par ARN interférence nous ont permis de caractériser l'impact d'une perte des protéines MBNL dans le MN et le muscle squelettique sur le maintien de la JNM. Afin de rapporter ces observations à un modèle DM1, nous avons caractérisé les JNM de souris HSA^{LR} (Figure 32). Ces souris expriment spécifiquement dans le muscle squelettique un transgène de l'actine squelettique humaine contenant 300 répétitions CTG dans son 3'UTR (Mankodi et al., 2000). Nous avons mené cette étude sur des souris adultes de 4 mois (« young ») et des souris âgées de plus de 1 an (« old »), suspectant que les défauts pourraient s'aggraver avec le temps de la même manière que pour nos modèles basés sur la perte de MBNL.

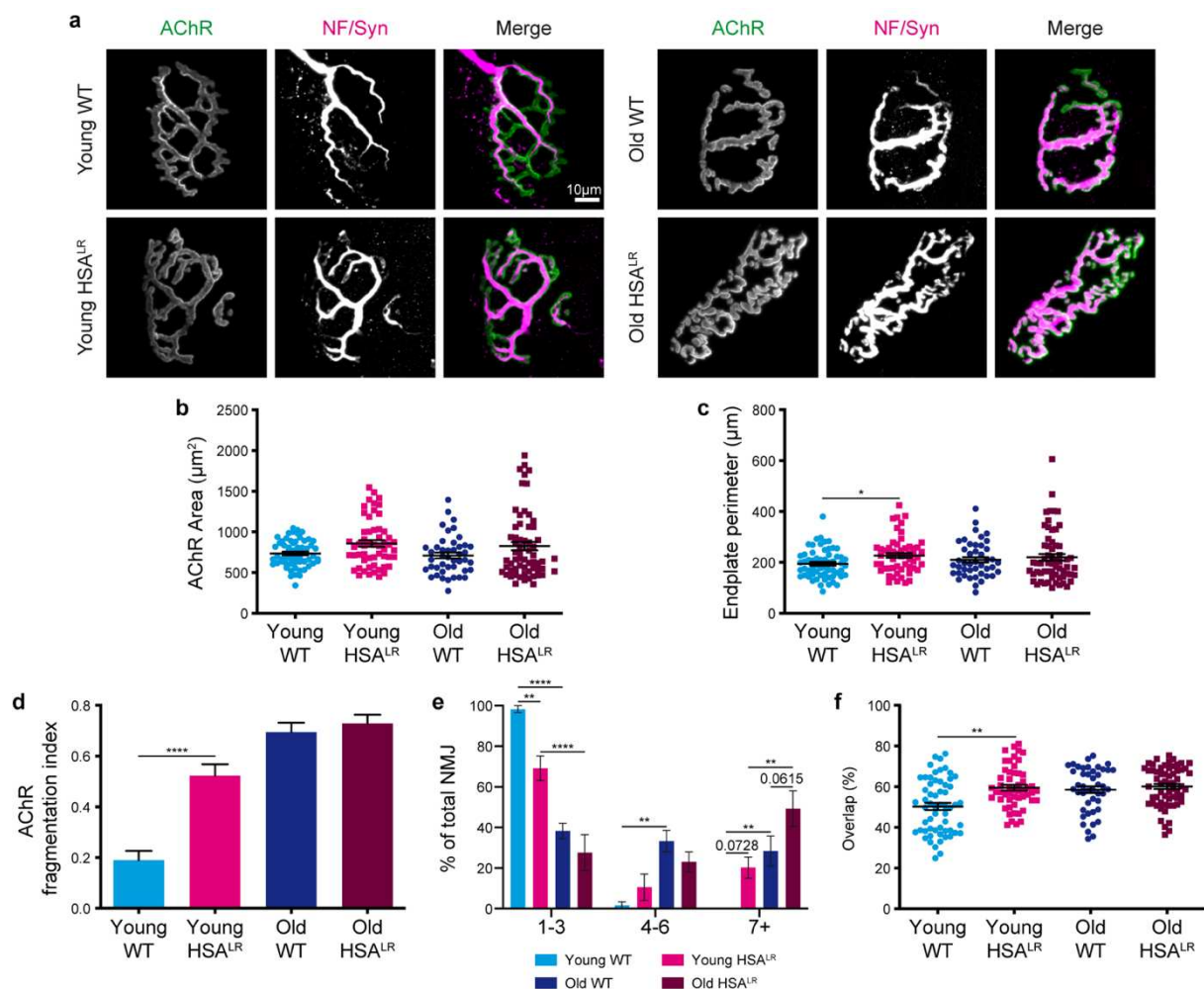


Figure 32 : Les JNM des souris HSA^{LR} reproduisent certains défauts postsynaptiques des souris déplétées de MBNL dans le muscle squelettique

(a) Images confocales représentatives des JNM de TA de souris WT et HSA^{LR} jeunes et âgées. Neurofilament (NF, magenta) et Synapsine (SYN, magenta) avec α -BTX (RCh, vert).

(b-e) Quantifications des caractéristiques structurales des JNM de TA de souris WT et HSA^{LR} jeunes et âgées. (b) Aire des RCh. (c) Périmètre de la plaque motrice. (d) Index de fragmentation des RCh. (e) Pourcentages de JNMs qui contiennent le nombre de fragments de RCh indiqués (f) Ratio de la superposition des marquages pré- et postsynaptiques.

$n_{WTj} = 4$, 15 JNM par souris ; $n_{WTa} = 4$, au moins 7 JNM par souris ; $n_{HSAj} = 4$, au moins 12 JNM par souris ; $n_{HSAa} = 4$, au moins 13 JNM par souris. Les barres d'erreur indiquent la s.e.m ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. One way Anova : (b, c, d, f) test de Dunn. (d) Two way Anova : test de Tukey.

De la même manière que pour les souris transgéniques CTL, Mbn1-KO et dKO, les JNM des jeunes souris WT et HSA^{LR} ne manifestent pas de défaut de maturité (Figure 32 a). Ainsi, comme la déplétion de MBNL dans le muscle squelettique adulte, la présence de répétitions CTG dans le muscle squelettique sous la dépendance du promoteur HSA ne provoque pas d'altérations développementales de la JNM ni de dénervation. De plus, les aires des RCh des JNMs des souris HSA^{LR} sont comparables à celles des souris WT, peu importe l'âge (Figure 32 b). Les plaques motrices des jeunes souris HSA^{LR} ont toutefois un périmètre plus élevé de 30 μ m par rapport à celui des plaques motrices des jeunes souris WT (Figure 32 c). La différence de taille entre les JNM des souris WT et HSA^{LR} est donc visible uniquement à un jeune âge et dans une mesure bien moindre que celle observée pour les modèles de déplétion de MBNL.

Au niveau postsynaptique, les TA des souris HSA^{LR} âgées de 4 mois montrent un taux de fragmentation supérieur à celui des souris WT (Figure 32 d) avec une diminution de 25% du nombre de « clusters » de RCh présentant 1 à 3 fragments (Figure 32 e). Cette différence de fragmentation des « clusters » de RCh entre les souris WT et HSA^{LR} n'est plus retrouvée chez les souris âgées (Figure 32 d). Toutefois, on peut noter que la fragmentation augmente avec l'âge, aussi bien chez les souris WT que HSA^{LR} avec une tendance à une proportion plus élevée de JNM présentant plus de 7 fragments et de façon plus marquée pour les JNMs des TA des souris HSA^{LR}. (Figure 32 e). Ainsi, l'expression de longues répétitions CTG dans le muscle squelettique provoque une fragmentation anormale des « clusters » de RCh qui s'aggrave avec le temps.

L'effet est très similaire à celui observé chez les souris *Mbnl1*-KO, dKO et déplétées de *Mbnl1* et *Mbnl2* par ARN interférence, ce qui suggère que la séquestration de MBNL1 dans le muscle squelettique pourrait être la principale cause de cette fragmentation dans un contexte DM1. Les présynapses des souris HSA^{LR} ne présentent pas de défauts apparents, ne manifestant pas de diminution de la colocalisation des marquages pré- et postsynaptiques (Figure 32 f) ou de « sprouts » neuronaux terminaux. L'expression de répétitions pathologiques CTG dans le muscle squelettique ne provoque donc pas de défauts présynaptiques, même chez des souris âgées, contrairement à ce qui a été observé avec la déplétion de MBNL1 et MBNL2 spécifiquement dans le muscle squelettique par ARN interférence. Cette différence pourrait être due à un plus faible niveau de perte de fonction de MBNL dans les souris HSA^{LR}, les foci ne provoquant la séquestration permanente que d'environ 30% de la quantité totale de MBNL1 *in vitro* dans un autre modèle DM1 (Ho, Savkur, et al., 2005). Ainsi, il est possible que la perte de MBNL puisse être le facteur déterminant à la source des défauts de la JNM dans un contexte DM1. La perte de fonction de MBNL dans les souris HSA^{LR} ne serait donc pas suffisante dans les souris HSA^{LR} pour récapituler les défauts de nos modèles transgéniques et d'ARN interférence.

Par ailleurs, le ratio de colocalisation des parties pré- et postsynaptiques augmente de 50 à 60% entre les jeunes souris WT et HSA^{LR}, alors qu'il est identique entre les deux génotypes à un âge avancé (Figure 32 f). Les JNM des jeunes souris HSA^{LR} semblent donc adopter un profil âgé avant les JNM des souris WT. La même dynamique est visible pour la fragmentation des « clusters » de RACH : l'augmentation de la proportion de JNM avec plus de 7 fragments est de 30% entre les souris jeunes et âgées WT et HSA^{LR} mais ces dernières sont fragmentées plus précocement (Figure 32 e). De ces deux observations l'on peut supposer que les JNM des souris HSA^{LR} sont altérées par un phénomène de vieillissement accéléré. En effet, des marqueurs de sénescence ont été identifiés dans la DM (revu dans Hasuike, Mochizuki, & Nakamori, 2022).

Matériel & méthodes des résultats complémentaires

Les anticorps utilisés, les procédures animales, l'analyse de la force isométrique *in situ*, l'extraction ARN, la transcription réverse PCR (RT-PCR), le marquage des JNMs, la microscopie électronique à transmission ainsi que la méthode d'analyse statistique ont été précisés dans la partie « Material and methods » de l'article en préparation (cf. p111).

Injections d'AAV

Les TA de souris *C57BL/6* WT de 2 mois ont été injectés avec 15µL de vecteurs AAV9-SpC5.12-shLacZ (shCtl) ou de vecteurs AAV9- SpC5.12-shMbnl1&Mbnl2 (shMBNL) contenant 1.10^{11} génomes viraux. Pour chaque souris, le TA gauche a été injecté avec les AAV-shMBNL et le muscle contralatéral avec les AAV-shCtl. Les animaux ont été sacrifiés 2 ou 4 mois après l'injection.

Souris HSA^{LR}

Les souris HSA^{LR} homozygotes (à longues répétitions, lignée 20b, généreusement fournies par C. A. Thornton) ont été comparées à des souris WT du même fond (FVB/N).

Caractérisation de l'AChE (cf. p149)

L'activité de l'AChE a été déterminée par la méthode de Koëlle-Friedenwald (Koelle & Friedenwald, 1949). Brièvement, les muscles congelés ont été coupés avec une épaisseur de 12µm au cryostat et mis sur lame. Après réhydratation des sections, elles ont été incubées avec la solution de Koëlle puis la réaction a été interrompue avec du sulfate d'ammonium (20% dans de l'eau). Les coupes ont ensuite été lavées au PBS puis fixées au paraformaldéhyde (4% dans du PBS) avant un dernier lavage et montage entre lame et lamelle. La présence de l'AChE a été investiguée par immunofluorescence tel que précédemment décrit (Krejci et al., 2006). Les coupes ont été fixées au paraformaldéhyde (4% dans du PBS), lavées au PBS, bloquées (BSA 3%, sérum de chèvre 5% dans du PBS) et incubées avec la fasciculine-2 conjuguée avec l'anticorps Alexa fluor 594 (1/500) dans la solution de blocage sur la nuit à 4°C. Après 3 lavages au PBS, les coupes ont été montées entre lame et lamelle avec du vectashield (Vector Laboratories). Les images ont été prises à l'Apotome de Zeiss et traitées avec le logiciel ImageJ.

Conclusion des résultats complémentaires

Les altérations progressives de la structure et de l'ultrastructure de la JNM des TA injectés avec les AAV exprimant le shMBNL démontrent l'implication de MBNL, cette fois dans le muscle squelettique, sur la maintenance de la JNM. MBNL1 et MBNL2 interviennent donc dans le maintien de la JNM dans toute l'unité motrice. De plus, la perte de MBNL dans le muscle squelettique semble être à l'origine de la majorité des défauts post-synaptiques relevés dans nos modèles.

Le modèle HSA^{LR} reproduit ces résultats, montrant que l'expression de répétitions CTG dans le muscle squelettique induit des défauts exclusivement post-synaptiques de maintenance de la JNM. Cette déficience semble donc majoritairement due à la perte de fonction de MBNL dans un cadre DM1. Par ailleurs, le modèle HSA^{LR} n'exprimant que peu de répétitions exclusivement dans le muscle squelettique, il est possible que les altérations de la JNM chez les patients DM1 soient plus sévères que dans ce modèle, comme le suggère notre modèle de déplétion spécifique aux MNs de MBNL1 et MBNL2. Nos résultats suggèrent que les altérations de toute l'unité motrice participent à la myopathie de la DM1.

Discussion Générale

L'ensemble de mon travail de thèse a visé à identifier le rôle de MBNL dans la communication neuromusculaire. En effet, la littérature sur la contribution du SNC à la pathologie musculaire de la DM1 reste succincte. A cette fin, nous avons généré un modèle murin délété de Mbnl1 de façon ubiquitaire et Mbnl2 spécifiquement dans les MNs (dKO). Nous avons ensuite caractérisé les altérations de l'unité motrice causées par cette perte. Ainsi, les souris Mbnl1-KO et dKO développent des troubles moteurs aux alentours de l'âge de 2 mois, qui s'intensifient avec le temps. Ceux-ci comprennent une diminution de leur vitesse de déplacement accompagnée d'une diminution des foulées que font les animaux. L'aspect ubiquitaire de la perte de Mbnl1 dans notre modèle ne nous permet pas d'identifier précisément la source de cette déficience. Bien que la perte de MBNL1 n'induisse pas de réduction de la force musculaire générée par le tibialis antérieur (TA), elle provoque l'apparition de la myotonie dans ce muscle qui pourrait participer aux défauts mesurés par notre expérience de démarche. De plus, la locomotion est un mécanisme volontaire qui sollicite tout le corps de la souris, des altérations dans d'autres muscles et organes causées par le KO Mbnl1 pourraient donc participer au déficit moteur que nous observons. En revanche les souris dKO manifestent des défauts additionnels de coordination par rapport aux souris CTL et Mbnl1-KO à l'âge de 2 mois. En effet, à cet âge, les souris dKO se reposent sur plus de pattes lors de leur déplacement. La déplétion de MBNL2 dans les MNs montre donc de manière spécifique que MBNL1 et MBNL2 dans les MNs sont directement impliqués dans la coordination motrice.

Les MNs induisant la contraction musculaire au travers de la jonction neuromusculaire (JNM), nous avons réalisé une étude morphologique et fonctionnelle de cette synapse dans le TA chez les souris Mbnl-KO âgées de 2 et 4 mois. Seules les souris dKO montrent des défauts morphologiques de la JNM à 2 mois, suggérant que MBNL1 et MBNL2 dans le MN sont tous deux nécessaires pour la structure de la plaque motrice. Les JNM des souris dKO mais aussi Mbnl1-KO de 4 mois développent des altérations bien plus sévères que celles des souris de 2 mois. Les anomalies morphologiques des JNM des souris Mbn1-KO semblent majoritairement post-synaptiques tandis que les JNM des souris dKO reproduisent ces défauts mais développent également des déficiences pré-synaptiques structurales et ultrastructurales. Cette aggravation globale entre les âges de 2 et 4 mois des JNM des souris dKO dénote d'un rôle de MBNL1 et MBNL2 dans les MNs pour la maintenance de la JNM. Nous avons complété cette analyse par l'étude de modèles spécifiques au muscle squelettique. Les défauts post-synaptiques des JNM des souris injectées avec les AAV-shMbnl1&2 et des souris HSA^{LR} suggèrent que ces altérations sont majoritairement dues à la perte

de MBNL1 dans le muscle squelettique. Nous n'avons pas décelé de défauts de conduction neuromusculaire chez nos souris. Cependant, les défauts progressifs structuraux de la JNM mais également de coordination des souris dKO suggèrent que MBNL1 et MBNL2 pourraient réguler des processus synaptiques fins dans les MNs.

Afin d'identifier les conséquences moléculaires de la perte de MBNL1 et MBNL2 dans les MNs, nous avons réalisé un séquençage haut-débit des ARNs extraits de moelles épinières des souris Mbnl-KO âgées de 4 mois. L'analyse qui en découle a identifié plus de 1000 événements différentiels d'épissage alternatif affectant 815 gènes uniques entre les souris contrôles et dKO. L'analyse des processus biologiques dans lesquels sont impliqués les transcrits altérés par la perte de MBNL1 et MBNL2 dans les MNs montre que les protéines MBNL sont des acteurs de la communication neuromusculaire en régulant l'homéostasie des vésicules, la libération de neurotransmetteurs et la localisation des protéines à la synapse. Nous avons retrouvé certains événements d'épissage déjà décrits dans le cerveau de souris déplétées de MBNL1 ou MBNL2 dans la moelle épinière de nos souris Mbnl-KO (Charizanis et al., 2012; Suenaga et al., 2012), suggérant une régulation similaire entre le cerveau et la moelle épinière des ARN pré-messagers par MBNL1 et MBNL2. Nous avons également identifié de nouveaux transcrits altérés par la perte de MBNL1 et MBNL2. Dvl1 est un acteur central de la voie Wnt qui participe au maintien des JNM par l'intermédiaire du MN (Shafer et al., 2011; Shen et al., 2018; Wang et al., 2015). L'exon 14b de Dvl1 est anormalement inclus dans les cellules de la moelle épinière des souris dKO uniquement. Les conséquences de cette inclusion ne sont pas connues mais pourraient mener à une dégradation du transcrit par la dégradation des ARNm non sens (NMD), l'exon 14b introduisant un codon stop prématuré. Nos résultats montrent que MBNL1 et MBNL2 régulent l'épissage alternatif de nombreux transcrits dans la moelle épinière et pourraient intervenir dans la transmission synaptique au sein de l'unité motrice.

J'ai ainsi démontré que MBNL est impliqué dans le maintien de l'unité motrice. Mes résultats suggèrent, pour la première fois, que le MN pourrait contribuer à la physiopathologie musculaire de la DM1.

1. Atouts et limites des modèles murins

a. Atouts et limites des modèles transgéniques Mbnl-KO

Afin de déterminer le rôle de MBNL dans les MNs sur l'homéostasie et la fonction musculaire, nous avons délété Mbnl2 spécifiquement dans les MNs. Pour cela nous avons croisé des souris loxées autour de l'exon 2 de Mbnl2 avec des souris exprimant la Cre recombinase sous l'influence du promoteur Homeobox9 (Hb9), un gène exprimé spécifiquement dans les MNs (Ross et al., 1998). L'expression du gène Hb9 augmente dès 9,5 jours de développement chez la souris (Arber et al., 1999). Or, de la même manière que chez l'homme, le pic d'expression de MBNL chez la souris dans le cerveau est plus tardif que 9,5 jours (Kanadia, Urbinati, et al., 2003; Konieczny et al., 2014). Donc la déplétion de Mbnl2 est suffisamment précoce pour la considérer comme une déplétion constitutive dans les MNs. De plus, les axones des MNs innervent la JNM aux alentours de 12,5 jours de développement (W. Lin et al., 2001). Ainsi, notre modèle permet de voir les effets de la perte de MBNL2 dans les MNs sur tout le processus de formation, maturation et maintenance de la JNM.

Plutôt qu'un knock-out, notre modèle se rapproche d'un knock-down, ayant montré que Mbnl2 n'est déplété que dans une partie des MNs de la moelle épinière. Cet effet a également été observé dans un autre modèle de délétion de Mbnl2 par expression de la Cre recombinase dans les cardiomyocytes (K.-Y. Lee et al., 2022). Cependant, ce degré d'efficacité de la Cre recombinase est suffisant pour d'une part induire des défauts locomoteurs et de la JNM supplémentaires chez les souris dKO par rapport aux souris Mbnl1-KO ; d'autre part conduire à des défauts de l'épissage alternatif dans les MNs des souris Hb9Cre-Mbnl2-KO et des altérations de l'épissage alternatif supplémentaires dans la moelle des souris dKO par rapport aux souris Mbnl1-KO. En conclusion, la diminution de MBNL2 dans les MNs des souris Hb9Cre-Mbnl2-KO et dKO est suffisante pour déduire le rôle de Mbnl2 dans l'homéostasie de l'unité motrice.

Il s'agit donc du premier modèle de délétion de Mbnl MN spécifique visant à étudier l'implication du MN dans la DM1.

Afin de déterminer les conséquences moléculaires de la perte d'expression de Mbnl1 et/ou Mbnl2 dans les MNs de souris transgéniques, des expériences de séquençage ARN à haut débit ont été effectuées à partir d'extraits ARN issus de la moelle épinière lombaire des souris Mbnl-KO. La perte de Mbnl2 étant MN spécifique, nous avons pu attribuer les événements d'épissage alternatifs différents entre les souris WT et Hb9Cre-Mbnl2-KO / Mbnl1-KO et dKO à la perte de Mbnl2

dans les MNs. Cela dit, Mbnl1 est délété de manière ubiquitaire dans la moelle épinière des souris Mbnl1-KO et dKO, où les MNs ne représentent qu'une partie infime des cellules (K. Chung et al., 1984). Ainsi, cette analyse nous informe uniquement sur les processus dans lesquels Mbnl1 est impliqué dans les neurones, cellules gliales et autres cellules de la moelle épinière. De plus, une étude récente a montré la présence d'anomalies de l'épissage alternatif cellule-spécifique dans le CNS des patients DM1 et notamment une différence entre des ARN issus de la substance blanche et des motoneurones spinaux (Nakamori et al., 2022).

Afin de pallier à ce manque de spécificité, nous avons envisagé de faire notre séquençage ARN sur des MNs isolés par microdissection laser (Bandyopadhyay et al., 2014). Cependant, la quantité de MNs et de souris nécessaires afin d'obtenir une quantité suffisante d'ARN pour le séquençage à haut débit ne nous a pas permis de réaliser cette expérience durant ma thèse. Une solution alternative serait d'utiliser un modèle de délétion de Mbnl1 et Mbnl2 spécifique aux MNs, par l'insertion de sites LoxP autour de l'exon 3 de Mbnl1 en plus des sites LoxP déjà présents autour de l'exon 2 de Mbnl2 et de croiser ces souris avec des souris Hb9Cre, comme nous l'avons réalisé au cours de ma thèse.

Les modèles MBNL décrits jusqu'à présent récapitulent une grande partie des défauts DM (Charizanis et al., 2012; K. Y. Lee et al., 2013; K.-Y. Lee et al., 2022). Cependant dans la DM1, la perte de fonction de MBNL n'est pas totale (Ho, Savkur, et al., 2005). Dès lors, la perte de MBNL peut provoquer des altérations plus sévères que celles observées dans le cadre pathologique. C'est le cas pour un modèle de double déplétion ubiquitaire de MBNL1 et MBNL2 létal à l'état embryonnaire, alors que les souris DMSXL exprimant de longues répétitions CTG, malgré des défauts développementaux, sont viables à la naissance (Huguet et al., 2012; K. Y. Lee et al., 2013 et cf. Introduction 1.6.1).

D'autre part, d'un point de vue purement musculaire, le phénotype observé chez les souris délétées de Mbnl1 et Mbnl2 spécifiquement dans le muscle squelettique est nettement plus sévère que celui observé chez les souris HSA^{LR} (K. Y. Lee et al., 2013; Mankodi et al., 2000). En revanche, certaines altérations de l'épissage alternatif de la DM1, notamment de la forme congénitale, ne sont reproduites que dans les modèles de double déplétion de MBNL1 et MBNL2 (Goodwin et al., 2015; K. Y. Lee et al., 2013). Enfin, la perte de fonction de MBNL serait à l'origine de plus de 80% des défauts du métabolisme des ARN observés chez les patients DM1 (Nakamori et al., 2013).

Ainsi, la génération de modèles murins modélisant la perte des protéines MBNL dans différents tissus est un bon moyen d'identifier les conséquences possibles de la séquestration de ces protéines dans la pathologie. Ces altérations doivent ensuite être confirmées dans un modèle en contexte DM1, avec expansion de répétitions et si possible dans des échantillons de tissus issus de patients DM1.

b. Atouts et limites de l'approche AAV et ARN interférence

A la vue des anomalies postsynaptiques que nous avons identifiées dans le TA des souris *Mbnl1*-KO, nous avons supposé qu'en plus de son rôle dans les MN sur le maintien de la JNM, MBNL1 (*Mbnl2* n'étant exprimé que très faiblement dans le muscle squelettique de souris sauvages) pourrait également réguler le maintien de la JNM via les composants exprimés dans le muscle squelettique. Afin d'évaluer le rôle des protéines MBNL dans le muscle squelettique sur le maintien de la JNM, nous avons généré au cours de ma thèse un modèle murin basé sur l'injection d'un AAV exprimant un shmiR dirigé contre *Mbnl1* et *Mbnl2* sous le contrôle du promoteur muscle spécifique SpC5.12. L'injection intramusculaire d'AAV9, avec un fort taux de transduction dans les cellules musculaires (Muraine et al., 2020), exprimant le shmiR dirigé contre *Mbnl1* et *Mbnl2* (shMBNL) sous le contrôle du promoteur spécifique au muscle squelettique SpC5.12 (X. Li et al., 1999), a permis une déplétion de MBNL1 et MBNL2 spécifiquement dans ce tissu (cf. Résultats complémentaires figure 29). Les JNM des TA exprimant le shMBNL développent des défauts d'abord postsynaptiques qui s'étendent à la partie présynaptique. Ainsi, l'expression des protéines MBNL dans le muscle squelettique est impliquée dans le maintien de la JNM. De la même manière que dans le MN, MBNL pourrait réguler le métabolisme des ARN participant à ce processus. Cette approche a pour avantage de se mettre en place rapidement, contrairement aux souris transgéniques mais surtout de permettre la déplétion de *Mbnl* chez la souris adulte, et dans notre cas regarder l'effet sur des JNM déjà matures.

Toutefois, si le promoteur SpC5.12 permet l'expression du shmiR-MBNL spécifiquement dans les noyaux des fibres musculaires (X. Li et al., 1999), nous n'avons pas la certitude qu'il l'induit également dans les noyaux sous-synaptiques. Ces noyaux, placés à proximité de chaque plaque motrice, se spécialisent afin de permettre l'expression des gènes codant pour les éléments de la JNM et sont donc essentiels au développement et au maintien de la synapse musculaire (revu par Belotti & Schaeffer, 2020). Les altérations des JNM des souris *Mbnl1*-KO ou des souris exprimant le shMBNL pourraient donc être causées par une dérégulation du métabolisme des ARN dans ces

noyaux suite à la perte de MBNL1. Pour déterminer si le promoteur SpC5.12 permet l'expression de nos constructions dans les noyaux sous-synaptiques, nous prévoyons d'injecter en intramusculaire des AAV9 exprimant le gène LacZ sous contrôle du promoteur SpC5.12 afin de regarder l'expression de la β -galactosidase dans les noyaux sous-synaptiques.

En parallèle, afin de confirmer le rôle des protéines MBNL dans les MNs sur le maintien des JNM, nous souhaiterions développer un modèle AAV. Pour dépléter Mbnl1 et Mbnl2 dans les MNs, nous utiliserions la même approche précédemment décrite mais via des injections intrathécales. Cette approche nécessite la validation de promoteurs motoneurones spécifiques, qui ne soient pas trop grands, afin de pouvoir répondre à la limite de la taille d'encapsulation du virus, mais aussi une concentration importante de virus à la vue du faible volume pouvant être injecté dans la moelle épinière des souris.

c. Intérêt du modèle transgénique HSA^{LR} pour l'étude de la JNM

Pour rapporter nos résultats à un modèle DM1, nous avons caractérisé la morphologie des JNM issues de TA de souris HSA^{LR}, exprimant un transgène de l'actine squelettique humaine avec 300 répétitions CTG dans sa partie 3'UTR (Mankodi et al., 2000). L'expression du transgène est donc confinée au muscle squelettique, ce qui nous a permis de comparer les effets des répétitions CTG et de la perte totale de MBNL1 et MBNL2 spécifiquement dans ce tissu.

A ce jour, il n'existe pas de modèle murin exprimant des répétitions CTG spécifiquement dans les MNs mais le modèle EpA960/CaMKII^{Cre} pourrait constituer une solution alternative. Ce modèle murin induit l'expression de 960 répétitions CTG dans l'exon 15 de DMPK, sous contrôle du promoteur de la kinase Ca²⁺/calmoduline dépendante (CaMKII) (P. Y. Wang et al., 2017). La protéine CaMKII est en effet exprimée spécifiquement dans le SNC, dont les MNs spinaux (Y. L. Lin et al., 2022). Toutefois, contrairement aux patients DM1, les longues répétitions 960CTG de ce modèle sont interrompues.

Une alternative serait l'expression d'un transgène contenant les répétitions CTG sous contrôle d'un promoteur spécifique aux MNs, ChAT par exemple. L'équivalent d'un modèle DMSXL confiné aux MNs.

2. Rôle des protéines MBNL dans l'unité motrice sur la communication neuromusculaire

a. Rôle des protéines MBNL dans les MNs sur la communication neuromusculaire

Afin de déterminer les effets sur le métabolisme des ARN de la perte de MBNL1 et MBNL2 dans les MNs, nous avons réalisé un séquençage ARN à haut débit sur des extraits de moelles épinières lombaires des souris *Mbnl*-KO. Notre séquençage ARN associé à une analyse d'épissage alternatif a permis d'identifier MBNL1 et MBNL2 comme des régulateurs de la communication neuromusculaire dans la moelle épinière et les MNs. Plus précisément, les termes associés de la « Gene ontology » (termes GO) les plus représentés des gènes dont l'épissage est dérégulé par l'absence de MBNL1 et MBNL2 concernent globalement le transport de l'information synaptique. Les gènes régulés par MBNL1 et MBNL2 sont ainsi impliqués dans le bourgeonnement, l'endocytose et l'amarrage des vésicules synaptiques.

Cependant, notre séquençage ARN n'étant pas cellule spécifique, les proportions des modifications identifiées de l'épissage alternatif des gènes chez les souris *Hb9Cre-Mbnl2*-KO et *dKO* par rapport aux souris *Mbnl1*-KO peuvent être sous-estimées dans les MNs. En effet, il est possible que d'autres cellules que les MNs, donc non déplétées de *Mbnl2*, puissent également exprimer ces gènes. En effet, des défauts de l'épissage alternatif, associés à un phénotype anormal, ont été décrits dans les astrocytes (cf. Introduction partie 3.1.2.1) du modèle *DMSXL* (cf. Introduction partie 1.6.1) mais également dans des astrocytes prélevés post-mortem dans le cortex frontal et l'hippocampe de patients *DM1* (Dinca et al., 2022). De plus, ces dérégulations semblent attribuées à la perte de fonction de MBNL1 et MBNL2 dans ce type cellulaire (Dinca et al., 2022).

i. Nouvelles voies possibles de régulation de la JNM dans les MNs pour la *DM1*

Parmi les ARN dérégulés, vérifiés par RT-PCR (cf. Article figure 4e, f), dans notre modèle transgénique, on retrouve la protéine *dishevelled 1* (*Dvl1*) dont l'épissage est altéré spécifiquement chez les souris *dKO*. En effet, la perte de MBNL1 et MBNL2 spécifique dans les MNs induit une augmentation de l'inclusion de l'exon 14b qui contient un codon stop et dont l'apparition pourrait altérer l'activité de la protéine. *Dvl1* est une protéine centrale dans l'activation de la voie Wnt, impliquée dans une grande variété de processus biologiques, dont l'homéostasie de la JNM (cf. Introduction partie 3.2.2.1.3). La voie Wnt est également active dans les MNs et participe à la

formation et la maintenance de la JNM (Shen et al., 2018). Plus précisément, la délétion du gène médiateur de sécrétion du ligand Wnt (Wls) spécifiquement dans les MNs induit l'apparition de déficits axonaux à l'âge adulte (Shen et al., 2018). Le transport axonal vésiculaire pourrait participer à la manifestation de ces défauts, ayant été décrit comme altéré dans un mutant *C.elegans* de la voie Wnt non canonique JNK (Byrd et al., 2001). Cette voie de signalisation est sous contrôle de Wnt7a (Heasley & Winn, 2008), exprimé dans les MNs (Shen et al., 2018). L'inclusion de l'exon 14b de *Dvl1* a également été identifiée dans le cerveau des souris *Mbnl2*-KO (Charizanis et al., 2012). De plus, une expérience de CLIP a identifié des sites de liaison de MBNL dans le 3'UTR du gène *Dvl1*, dans le cortex frontal humain (Goodwin et al., 2015).

Nous avons également identifié une inclusion anormale de la forme +ex34/+ex35 de l'agrine uniquement dans la moelle épinière de souris dKO. Ainsi, la perte conjointe de MBNL1 et MBNL2 dans les MNs de la moelle épinière induirait l'inclusion de l'exon 35 de l'agrine, l'épissage alternatif de l'exon 34 ne paraissant pas être altéré. L'agrine neurale sécrétée par le MN permet le

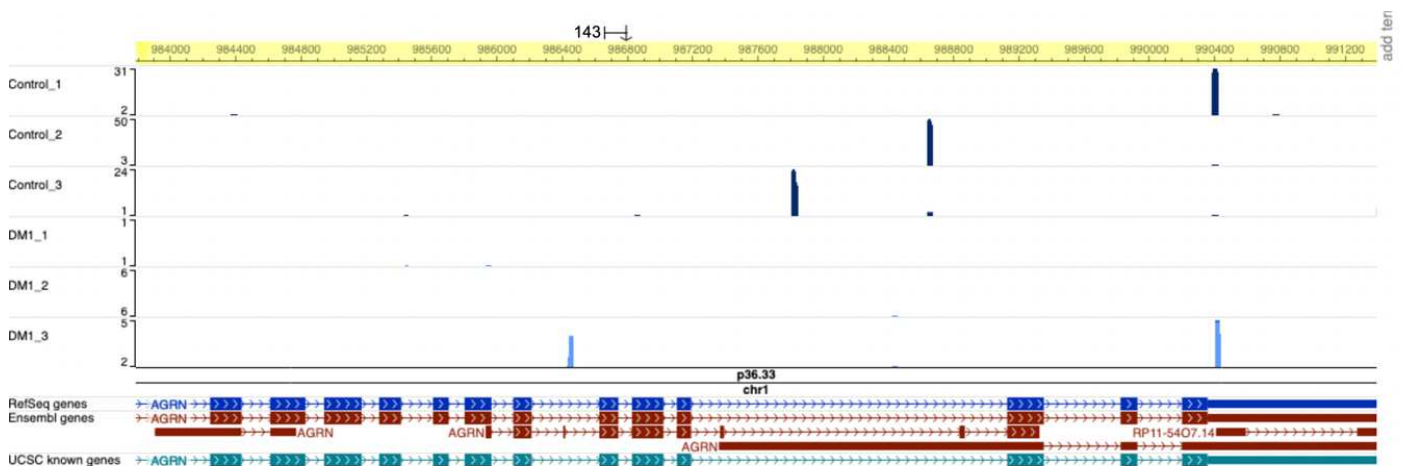


Figure 33 : La perte de Mbnl1 et Mbnl2 spécifiquement dans les MNs induit l'inclusion de l'exon 35 de l'agrine

Vue par « Genome browser » des sites de liaison de MBNL2 sur les ARN pré-messagers de l'agrine obtenus par séquençage CLIP dont les bibliothèques ont été générées à partir d'échantillons humains de cerveau de patients contrôles et DM1 par Goodwin et al., 2015.

Des sites de liaison de MBNL sont retrouvés dans l'intron 34 de l'ARN de l'agrine murine dans le cortex frontal humain (Goodwin et al., 2015) (Figure 33). MBNL induisant généralement l'exclusion d'un exon dont il se lie en amont (Figure 15), la protéine pourrait favoriser l'exclusion de l'exon 35. L'exon 35 fait partie des exons alternatifs de l'agrine qui forment les sites d'épissage

alternatifs Z (Hoch et al., 1993). Cet exon est inclus dans les formes Z11 et Z19 alors qu'il est exclu des formes Z8 et Z0. La forme Z0 est incapable d'induire le « clustering » des RACH tandis que l'efficacité des autres formes Z sont plus ou moins efficaces quant à ce processus (Ferns et al., 1993; Gesemann et al., 1995). Les protéines Nova1 et Nova2 ont été identifiées comme des régulateurs de l'épissage alternatif de l'exon 34 (Ruggiu et al., 2009), cependant, les protéines de liaison à l'ARN régulatrices de l'épissage alternatif des autres exons alternatifs de l'agrine ne sont pas connues.

Ainsi, les voies Wnt et Agrine-Lrp4-MuSK, centrales dans la communication synaptique et l'homéostasie de la JNM, pourraient être modifiées dans les MNs des souris dKO. L'altération de l'épissage alternatif de Dvl1 et de l'agrine pourraient participer aux défauts de communication neuromusculaire chez les souris dKO, et par extension, les patients DM1. Toutefois, les conséquences des dérégulations de l'épissage alternatif sur la fonction des protéines résultantes restent à être déterminées.

Nous avons concentré notre étude de la JNM sur le muscle tibial antérieur (TA). Cependant, la locomotion utilise le système musculaire dans son intégralité. Ainsi, même si le TA ne présente pas de décrétement par EMG, il est possible que d'autres muscles soient plus impactés par la perte de MBNL1 et MBNL2 dans les MNs. D'ailleurs, les défauts de locomotion des souris Mbnl-KO se manifestent également dans les pattes avant (cf. Article figure 1), suggérant que la perte de MBNL1 et MBNL2 dans les MNs affectent également les muscles antérieurs, conduisant à des défauts globaux de la motricité. Le soleus par exemple, un autre muscle postérieur mais lent par opposition au TA (Gollnick et al., 1974), pourrait révéler un profil d'innervation avec les MNs différent du TA.

- ii. La perte de Mbnl1 et Mbnl2 dans les MNs récapitule les défauts d'épissage DM1 identifiés dans le cerveau

Notre analyse de séquençage ARN a également révélé des altérations de l'épissage alternatif dans la moelle épinière des souris Mbnl-KO, précédemment décrites dans d'autres tissus de modèles murins et des patients DM1 (cf. Article figure 4 d).

En effet, La perte concomitante de MBNL1 et MBNL2 dans les MNs induit l'inclusion de l'exon 23a du gène *Tetratricopeptide repeat, ankyrin and coiled-coil containing 2* (Tanc2) et l'inclusion de l'exon 12a du gène de la sous-unité α du canal calcique voltage-dépendant (CACNA1D) (cf. Article

Figure supplémentaire 5 b), tel que cela a été décrit dans l'hippocampe de souris délétées de Mbnl2 et le cortex temporal des patients DM1 (Charizanis et al., 2012). Par ailleurs, la perte de Mbnl1 dans les cellules de la moelle épinière induit l'inclusion de l'exon 26 du gène de la protéine 1 associée au ligand cytoplasmique (CLASP1) (cf. Article Figure supplémentaire 5 b), comme décrit dans le cortex frontal des patients DM1 (Dinca et al., 2022).

Un autre gène dont l'épissage est dérégulé dans l'hippocampe des souris DMSXL est CamkII β , dont l'exon 13 est anormalement exclus (Potier et al., 2022). CamkII est une protéine impliquée dans les voies du métabolisme énergétique AMPK et mTORC1 (Raney & Turcotte, 2008). A la synapse, CamkII semble intervenir dans le maintien des RACH par protection face au système ubiquitine/protéasome (Mousslim et al., 2012). De plus, il a été démontré dans un modèle murin que l'inactivation de CamkII β spécifiquement dans les MNs provoque des perturbations dans la voie de signalisation Agrin-Lrp4-MuSK, conduisant à des défauts de formation et de maintenance de la JNM (Y. L. Lin et al., 2022). Le défaut d'épissage de CamkII β dans les MNs pourrait donc également jouer un rôle sur la maintenance de la JNM dans notre modèle.

Nous avons donc révélé de nombreux événements d'épissage alternatif altérés par la perte de MBNL1 et MBNL2 dans les MNs, dont certains précédemment décrits dans le cerveau de modèles murins ou patients DM1. Ces résultats suggèrent que le MN est un type cellulaire affecté par la séquestration des protéines MBNL causée par les répétitions CTG caractéristiques de la pathologie. Le MN pourrait donc participer au mécanisme physiopathologique de la DM1.

iii. Impact de la perte de MBNL dans les cellules de Schwann terminales

La JNM est une structure tripartite (cf. Introduction 3.2.1). Bien que nous nous soyons concentrés sur les parties pré- et postsynaptiques de la JNM, nous avons relevé un engouffrement anormal du bouton synaptique par des cellules de Schwann terminales (tSC) exclusivement dans les TA des souris dKO (cf. Article figure supplémentaire 3). Les tSC sont notamment impliquées dans la régénération de la JNM (cf. Introduction 3.2.3.2), nous ne savons donc pas si ce comportement hors du commun est dû au fonctionnement normal de la tSC dans un cadre régénératif causé par la perte de MBNL dans les MNs ou à une altération des tSC en elles-mêmes. Dans ce dernier cas, la perte de MBNL dans les MNs et les tSC leur serait délétère. L'expression des transcrits mutés DMPK n'a jamais été investiguée dans les tSC, elles sont cependant altérées dans la Dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), une autre dystrophie musculaire. (Revu par Santosa, Keane, Jablonka-Shariff, Vannucci, & Snyder-Warwick, 2018).

Notre travail suggérant une implication de la JNM au mécanisme pathologique de la DM1, il est possible que les tSC y participent.

b. Rôle des protéines MBNL dans le muscle squelettique sur la communication neuromusculaire

La ressemblance des altérations postsynaptiques entre les JNM des TA des souris *Mbnl1*-KO, dKO (cf. Article figure 3) et ceux exprimant le shMBNL (cf. Résultats complémentaires figure 30) suggère qu'elles sont, au moins partiellement, dues à la perte de MBNL1 dans le muscle squelettique. Il a été montré précédemment que l'épissage alternatif de l'exon 6 de MUSK et l'exon 4 de CHRNG est altéré dans des cellules musculaires dérivées de fœtus DM1 avec plus de 1000 répétitions CTG en comparaison à celles dérivées de fœtus sains, et dans du tissu de patients DM1 pour CHRNG (Klinck et al., 2014). L'exon 6 de Musk code, avec l'exon 7 constitutif, le 3^{ème} domaine immunoglobuline G (Ig3) de la protéine. Bien que ce domaine ne soit pas essentiel au « clustering » des RACH par la voie de signalisation Agrine-Lrp4-MuSK (H. Zhou et al., 1999), il est nécessaire pour la co-liaison de Musk avec les protéines de la morphogénèse osseuse (BMP) (Yilmaz et al., 2016). Les BMP interviennent dans le développement de nombreux tissus, dont le muscle squelettique (revue par Katagiri & Watabe, 2016).

Cette activité de MuSK est nécessaire pour l'expression de la protéine *regulator of G protein signaling 4* (RGS4) dont l'altération inhibe l'activité des RACH muscariniques dans des myoblastes (Yilmaz et al., 2016). Par ailleurs, la régulation dépendant des BMP de MuSK semble affecter le profil d'expression de gènes spécifiques aux muscles lents (Yilmaz et al., 2016). Si ce domaine est affecté dans notre modèle, il serait d'autant plus intéressant d'étudier les JNM du soleus, un muscle lent.

La sous-unité gamma des RACH n'est produite qu'au stade fœtal, suite à quoi elle est remplacée par la sous-unité ϵ des RACH (CHRNE) (Gu & Hall, 1988). La délétion de CHRNG chez la souris compromet le processus de « prepatterning » des RACH (Y. Liu et al., 2008) tandis que des mutations chez l'homme conduisent à des myasthénies (Morgan et al., 2006). Les effets de l'altération de l'épissage alternatif de MuSK et CHRNG n'ont pas été étudiés dans la DM1 mais pourraient contribuer à des défauts neuromusculaires chez les patients.

CamkII β est un autre gène exprimé dans le muscle squelettique et dont l'épissage est dérégulé dans le muscle squelettique des souris *Mbnl1*-KO et HSA^{LR} (X. Lin et al., 2006) ainsi que chez les

patients DM1 (Nakamori et al., 2013). CamkII est un activateur de la kinase activée par l'AMP (AMPK) (Hart et al., 2015). AMPK, quant à elle, est impliquée dans la voie de signalisation AMPK/mTORC1 de régulation du métabolisme. Ainsi, AMPK promeut l'initiation du mécanisme autophagique tandis mTORC1 l'inhibe (J. Kim et al., 2011).

Les répétitions CTG caractéristiques de la DM1 semblent déréguler ces adaptations de la cellule musculaire à l'environnement. En effet, le processus autophagique ne semble pas s'activer dans des muscles de souris HSA^{LR} et de patients DM1, malgré des conditions de privation, propices à l'autophagie (Brockhoff et al., 2017). La dérégulation de l'autophagie dans la DM1 pourrait participer à la dégradation des JNM, tels que le montrent des altérations de la plaque motrice chez des modèles murins avec des défaillances de la voie de signalisation mTOR (Baraldo et al., 2020; revue par Castets, Ham, & Rüegg, 2020).

c. MBNL et le transport des ARN dans l'unité motrice

Les protéines MBNL sont impliquées dans différents mécanismes moléculaires du métabolisme de l'ARN (cf. Introduction 2.4). Outre leur rôle de régulateur de l'épissage alternatif, les protéines MBNL peuvent également se lier au 3'UTR de leurs cibles ARN et diriger le choix du site de polyadénylation et influencer la localisation ou la stabilité des ARN cibles (Batra et al., 2014; Masuda et al., 2012, cf. Introduction 2.4.2.1 et 2.4.2.3). Au sein des cellules neuronales, les transcrits sont fréquemment localisés entre le corps cellulaire et les projections neuronales (Cajigas et al., 2012). L'enrichissement différentiel des transcrits dans différents compartiments des cellules neuronales s'accompagne de leur traduction locale et contribue au maintien de la polarité neuronale mais aussi à la neurotransmission (Mattioli et al., 2019; revue par Rajgor, Welle, & Smith, 2021).

Pour certains gènes, les isoformes de clivage et de polyadénylation alternatifs (APA) sont localisées différemment entre ces compartiments, ainsi le choix du site APA influence directement la localisation du transcrit (revue par Waldron, 2016). Ainsi il a été montré que les régions 3'UTR des transcrits issus de l'utilisation des derniers exons alternatifs distaux (ALE) contiennent plus de motifs de liaisons à des protéines liant l'ARN comme les protéines MBNL (Taliaferro et al., 2016). Ainsi la déplétion de MBNL diminue l'association des isoformes à APA distaux des fractions membranaires (E. T. Wang et al., 2012). De plus, la dérégulation induite par la perte de MBNL suit un principe similaire à l'épissage alternatif : les transitions des isoformes APA fœtales à celles adultes sont dérégulées dans le muscle squelettique du modèle HSA^{LR} et chez les patients DM (Batra et al., 2014).

Nous pourrions ainsi compléter notre analyse de l'épissage alternatif par la technique de séquençage poly(A)-seq afin d'identifier des cibles potentielles soumises au transport et à la traduction locale dépendant de MBNL. L'isolation des MNs serait, là encore, utile pour distinguer le rôle de MBNL1 spécifiquement dans les MNs, étant directement impliqué dans le transport des ARN dans les cellules neuronales (Hildebrandt et al., 2022). Ces mécanismes étant également mis en place dans le muscle squelettique (Denes et al., 2021), une approche similaire sur des ARN extraits de JNM isolées pourrait révéler des altérations dans cette structure à l'interface du SNP et du muscle squelettique.

3. Les atteintes de la communication neuromusculaire dans la DM1

a. Les anomalies structurales et fonctionnelles du SNP chez les patients DM1

Les altérations de la communication neuromusculaire des patients DM1 prêtent à débat. En effet, peu d'études se sont penchées spécifiquement sur l'implication de la JNM et du MN sur la force musculaire, la DM1 étant principalement connue comme une « myopathie ». Ainsi, une étude a relevé des troubles de la communication axonale chez des patients DM1 (Krishnan & Kiernan, 2006), tandis qu'une autre suggère des défauts fonctionnels de la JNM (Bombelli et al., 2016). En revanche, d'autres identifient la faiblesse musculaire comme strictement myopathique (Caughy & Myriantopoulos, 1963). Ces études s'accordent cependant sur la grande hétérogénéité de l'atteinte périphérique chez les patients DM1. Il est en effet possible que celle-ci dépende de la forme clinique. Des mesures électrophysiologiques sur une cohorte plus grande, celles précédemment citées n'ayant pu recruter au maximum qu'une dizaine de patients souvent avec une forme adulte ou tardive, pourraient renseigner sur les défauts de communication neuromusculaire des patients DM1. Les anomalies structurales des JNM des patients DM1 montrent elles aussi la variété des altérations des plaques motrices parmi les patients (cf. Introduction 3.4). Ces études se basent également sur des petites cohortes et datent d'il y a plus de 40 ans. Une caractérisation ultrastructurale mais aussi structurale des JNM de plus de patients permettrait de déterminer les leurs défauts en fonction du phénotype clinique.

En plus des déficits de la structure des JNM que développent les patients DM1 et certains modèles DM1 ou de perte de MBNL (K. Y. Lee et al., 2013; Panaite et al., 2013), une autre étude a décrit un déficit de la forme 16S de l'AChE chez des patients DM1 congénitaux (Fardeau & Tomé, 1980). La forme 16S de l'AChE est produite dans le muscle squelettique et, au moins en

partie, sécrétée par le MN (Fernandez, 1981; Koenig & Vigny, 1978). L'AChE assure l'élimination rapide de l'ACh rémanente après un potentiel de plaque (Rosenberry, 1979). Dans le but de vérifier une possible altération de l'expression et/ou de l'activité AChE dans nos modèles murins, nous avons effectué des marquages de l'AChE par immunofluorescence et regardé son activité par la méthode de Koëlle (Figure 34).

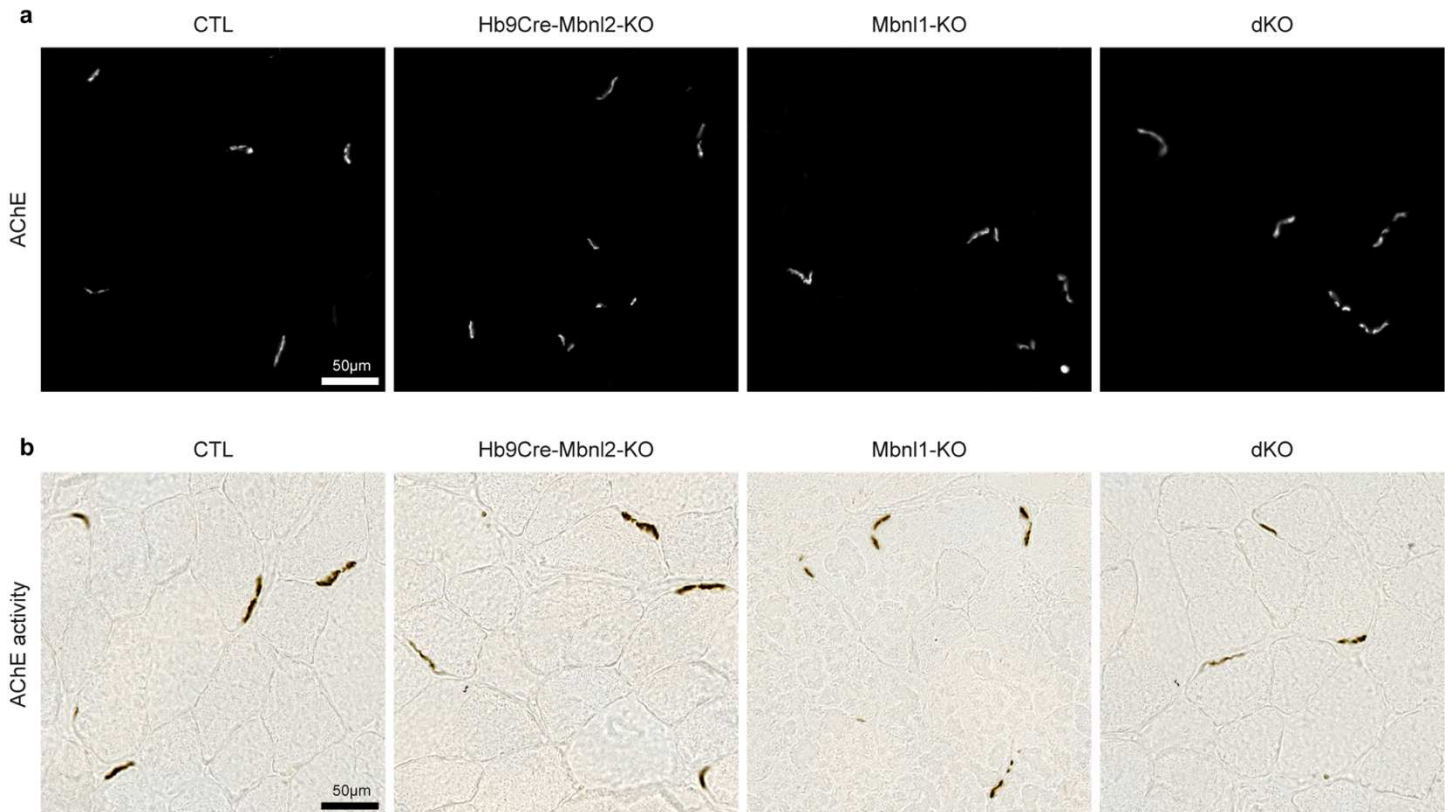


Figure 34 : La perte de MBNL dans l'unité motrice n'altère pas l'homéostasie de l'AChE

(a) Images confocales représentatives de coupes transversales de TA de souris CTL, Hb9Cre-Mbnl2-KO, Mbnl1-KO et dKO. AChE (Fasciculine).

(b) Images représentatives de coupes transversales de TA de souris CTL, Hb9Cre-Mbnl2-KO, Mbnl1-KO et dKO. Activité de l'AChE (réaction de Koëlle).

L'AChE est présente chez les souris CTL, Mbnl1-KO, Hb9Cre-Mbnl2-KO et dKO âgées de 4 mois (Figure 34 a). De plus, il n'y a pas de différence d'activité de l'AChE entre les différents génotypes étudiés (Figure 34 b). Ainsi, la perte ubiquitaire de Mbnl1, associée ou non à une perte spécifique au MN de Mbnl2, n'a pas d'impact sur la présence de l'AChE ou son activité dans le TA. Soit la dérégulation de l'AChE dans la DM1 est due à un autre mécanisme que la perte de

fonction de MBNL, soit l'AChE n'est pas affectée dans la DM1, la publication à la source de cette information n'ayant étudié que 3 patients congénitaux dont 2 présentaient un déficit de la forme 16S de l'AChE (Fardeau & Tomé, 1980). Il est également possible que la perte de cette forme de l'AChE ne soit pas suffisante pour observer une diminution globale des AChE, ou qu'elle soit compensée par d'autres isoformes.

b. Contribution nerveuse au déficit locomoteur des patients DM1

Nous avons décrit pour la première fois des défauts locomoteurs dus à la perte de MBNL1 de manière ubiquitaire, avec ou sans une perte de MBNL2 spécifiquement dans les MNs (cf. Article figure 1). Quelques études ont identifié des défauts de la motricité chez des patients DM1 (Galli et al., 2012; R. B. Wright et al., 1995) qui corrélaient avec la myopathie chez ces patients (Bachasson et al., 2016). Les altérations neuronales des patients DM1 pourraient cependant participer au déficit locomoteur que rencontrent les patients, tel que cela a été décrit dans la DMD (Goudriaan et al., 2018). Dans ce sens, la faiblesse musculaire ne semble pas corrélée aux défauts de coordination chez les patients DM1 (Naro et al., 2019). L'aggravation du profil de marche entre les souris Mbnl1-KO et dKO (cf. Article figure 1d) illustre cette possibilité et suggère que les défauts de coordination dans la DM1 pourraient être dus, au moins en partie, à la perte de MBNL dans le SNC et plus précisément dans les MNs.

Conclusion & perspectives

Mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence l'importance des protéines MBNL pour la communication neuromusculaire. Les anomalies structurales sévères de la JNM associées aux défauts de locomotion dus à la perte des protéines MBNL montrent que celles-ci sont impliquées dans le maintien de la JNM et sa fonction. Les causes moléculaires de ces altérations restent à définir. En effet, nous avons révélé de possibles voies métaboliques et de signalisation dérégulées par la perte de MBNL1 et MBNL2 dans les MNs mais la nature tissu-, et non cellule-, -spécifique de notre analyse ne permet pas d'en mesurer la portée sur la fonction du MN. Il est donc désormais nécessaire de confirmer ces altérations de l'épissage alternatif et d'en caractériser les conséquences fonctionnelles. L'inclusion de l'exon 14b de Dvl1 dans les MNs constitue un bon candidat pour cette approche. Des cellules souches pluripotentes de patients DM1 reprogrammées en MNs, en coculture avec des cellules musculaires, permettraient de confirmer l'implication de ce défaut d'épissage dans la communication neuromusculaire dans la DM1. De manière plus globale, notre analyse a révélé des défauts du métabolisme des vésicules synaptiques. Celles-ci ne sont pas importantes que pour la communication neuromusculaire mais également dans les synapses purement neuronales du SNC. La perte de MBNL1 et MBNL2 pourrait, de cette manière, participer aux altérations neurologiques et neuromusculaires de la DM1.

Par ailleurs, MBNL étant majoritairement décrit comme un régulateur de l'épissage alternatif, nous avons axé notre analyse sur cet aspect. Cependant, la diversité des modes de régulation du métabolisme des ARN par MBNL gagne de plus en plus l'intérêt de la communauté des chercheurs de la DM1. Afin de caractériser les différents échelons de la régulation des ARN dans les MNs, des expériences complémentaires sont nécessaires. La localisation et le transport associés aux sites de polyadénylation des ARN constituent de bons candidats pour approfondir notre savoir sur MBNL dans les MNs, surtout en considérant l'importance de ces processus dans des cellules polarisées comme les neurones. La grande proportion de gènes dérégulés dans les MNs en lien avec les microtubules, plateformes pour le transport vésiculaire, appuie encore davantage cette perspective.

La transposition aux patients DM1 de nos conclusions requiert de caractériser les mécanismes dérégulés dans notre modèle chez un ou plusieurs modèles DM1 et dans des tissus de patients DM1. Malgré tout, nos résultats suggèrent, pour la première fois, que le MN est impliqué dans la physiopathologie de la DM1. Ce travail remet au goût du jour la notion de contribution du

système nerveux périphérique, mais également du SNC, dans les atteintes musculaires de la DM1. La contribution nerveuse aux troubles myopathiques de la DM1 n'a pas été étudiée dans des proportions suffisantes. La DM1 pose en effet problème quant à l'extrême variabilité des symptômes parmi les patients, tant pour la nature de l'organe touché que son degré de défaillance. La caractérisation de la DM1 nécessite donc des études extrêmement complètes avec un grand nombre de patients, de différentes formes cliniques, ce qui est souvent incompatible avec sa faible prévalence.

En ayant soulevé les questions de l'implication des MNs et de la communication neuromusculaire dans la DM1, nous espérons que davantage d'attention sera portée sur ces aspects dans la DM1. La complexité de la régulation des protéines MBNL dans autant de tissus est à l'image des altérations que causent leur perte. Il est donc nécessaire d'en définir le rôle et les cibles dans les tissus affectés pour parvenir à clarifier l'intrication du mécanisme pathologique de la DM1.

Bibliographie

- Abbruzzese, C., Krahe, R., Liguori, M., Tessarolo, D., Siciliano, M. J., Ashizawa, T., & Giacanelli, M. (1996). Myotonic dystrophy phenotype without expansion of (CTG)_n repeat: An entity distinct from proximal myotonic myopathy (PROMM)? *Journal of Neurology*, 243(10), 715–721. <https://doi.org/10.1007/BF00873977>
- Adereth, Y., Dammai, V., Kose, N., Li, R., & Hsu, T. (2005). RNA-dependent integrin $\alpha 3$ protein localization regulated by the Muscleblind-like protein MLP1. *Nature Cell Biology*, 7(12), 1140–1147. <https://doi.org/10.1038/ncb1335>
- Allan, D. W., & Greer, J. J. (1997). Development of phrenic motoneuron morphology in the fetal rat. *Journal of Comparative Neurology*, 382(4), 469–479. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19970616\)382:4<469::AID-CNE4>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19970616)382:4<469::AID-CNE4>3.0.CO;2-0)
- Allen, D. E., Johnson, A. G., & Woolf, A. L. (1969). The intramuscular nerve endings in dystrophia myotonica—a biopsy study by vital staining and electron microscopy. *Journal of Anatomy*, 105(Pt 1), 1–26. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1232086/pdf/janat00396-0008.pdf>
- Allen, N. J. (2014). Astrocyte regulation of synaptic behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30(1), 439–463. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013053>
- Allen, N. J., & Eroglu, C. (2017). Cell Biology of Astrocyte-Synapse Interactions. In *Neuron* (Vol. 96, Issue 3, pp. 697–708). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.09.056>
- Allen, N. J., & Lyons, D. A. (2018). Glia as architects of central nervous system formation and function. In *Science* (Vol. 362, Issue 6411, pp. 181–185). <https://doi.org/10.1126/science.aat0473>
- Almeida, R. G., & Lyons, D. A. (2017). On myelinated axon plasticity and neuronal circuit formation and function. *Journal of Neuroscience*, 37(42), 10023–10034. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3185-16.2017>
- Alsaggaf, R., St. George, D. M. M., Zhan, M., Pfeiffer, R. M., Wang, Y., Wagner, K. R., Greene, M. H., Amr, S., & Gadalla, S. M. (2018). Cancer Risk in Myotonic Dystrophy Type I: Evidence of a Role for Disease Severity. *JNCI Cancer Spectrum*, 2(4). <https://doi.org/10.1093/JNCICS/PKY052>
- Alvarez-Medina, R., Cayuso, J., Okubo, T., Takada, S., & Martí, E. (2008). Wnt canonical pathway restricts graded Shh/Gli patterning activity through the regulation of Gli3 expression. *Development*, 135(2), 237–247. <https://doi.org/10.1242/dev.012054>
- Alwazzan, M., Newman, E., Hamshere, M. G., & Brook, J. D. (1999). Myotonic dystrophy is associated with a reduced level of RNA from the DMWD allele adjacent to the expanded repeat. *Human Molecular Genetics*, 8(8), 1491–1497. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.8.1491>
- Amack, J. D., Paguio, A. P., & Mahadevan, M. S. (1999). Cis and trans effects of the myotonic dystrophy (DM) mutation in a cell culture model. *Human Molecular Genetics*, 8(11), 1975–1984. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.11.1975>
- Amenta, A. R., Creely, H. E., Mercado, M. L. T., Hagiwara, H., McKechnie, B. A., Lechner, B. E., Rossi, S. G., Wang, Q., Owens, R. T., Marrero, E., Mei, L., Hoch, W., Young, M. F., McQuillan, D. J., Rotundo, R. L., & Fallon, J. R. (2012). Biglycan Is an Extracellular MuSK Binding Protein Important for Synapse Stability. *Journal of Neuroscience*, 32(7), 2324–2334. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4610-11.2012>
- An, M. C., Lin, W., Yang, J., Dominguez, B., Padgett, D., Sugiura, Y., Aryal, P., Gould, T. W., Oppenheim, R. W., Hester, M. E., Kaspar, B. K., Ko, C. P., & Lee, K. F. (2010).

- Acetylcholine negatively regulates development of the neuromuscular junction through distinct cellular mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(23), 10702–10707. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004956107>
- André, L. M., Ausems, C. R. M., Wansink, D. G., & Wieringa, B. (2018). Abnormalities in skeletal muscle myogenesis, growth, and regeneration in myotonic dystrophy. In *Frontiers in Neurology* (Vol. 9, Issue MAY, p. 368). Frontiers. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00368>
- André, L. M., van Cruchten, R. T. P., Willemse, M., Bezstarosti, K., Demmers, J. A. A., van Agtmaal, E. L., Wansink, D. G., & Wieringa, B. (2019). Recovery in the myogenic program of congenital myotonic dystrophy myoblasts after excision of the expanded (CTG)_n repeat. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 5685. <https://doi.org/10.3390/ijms20225685>
- Andreassi, C., & Riccio, A. (2009). To localize or not to localize: mRNA fate is in 3'UTR ends. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 19, Issue 9, pp. 465–474). Trends Cell Biol. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.06.001>
- Angeard, N., Gargiulo, M., Jacqueline, A., Radvanyi, H., Eymard, B., & Héron, D. (2007). Cognitive profile in childhood myotonic dystrophy type 1: Is there a global impairment? *Neuromuscular Disorders*, 17(6), 451–458. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2007.02.012>
- Antonini, G., Clemenzi, A., Bucci, E., Morino, S., Garibaldi, M., Sepe-Monti, M., Giubilei, F., & Novelli, G. (2009). Erectile dysfunction in myotonic dystrophy type 1 (DM1). In *Journal of Neurology* (Vol. 256, Issue 4, pp. 657–659). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00415-009-0912-4>
- Antonini, G., Mainero, C., Romano, A., Giubilei, F., Ceschin, V., Gragnani, F., Marino, S., Fiorelli, M., Soscia, F., Di Pasquale, A., Caramia, F., Morino, S., Fiorelli, M., Soscia, F., & Pasquale, A. Di. (2004). Cerebral atrophy in myotonic dystrophy: A voxel based morphometric study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 75(11), 1611–1613. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2003.032417>
- Antonini, G., Vichi, R., Leardi, M. G., Pennisi, E., Monza, G. C., & Millefiorini, M. (1990). Effect of clomipramine on myotonia: A placebo-controlled, double-blind, crossover trial. *Neurology*, 40(9), 1473. <https://doi.org/10.1212/WNL.40.9.1473>
- Anvret, M., Ahlberg, G., Grandell, U., Hedberg, B., Johnson, K., & Edstrom, L. (1993). Larger expansions of the CTG repeat in muscle compared to lymphocytes from patients with myotonic dystrophy. *Human Molecular Genetics*, 2(9), 1397–1400. <https://doi.org/10.1093/hmg/2.9.1397>
- Apel, E. D., Roberds, S. L., Campbell, K. P., & Merlie, J. P. (1995). Rapsyn may function as a link between the acetylcholine receptor and the agrin-binding dystrophin-associated glycoprotein complex. In *Neuron* (Vol. 15, Issue 1). [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90069-1](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90069-1)
- Arandel, L., Matloka, M., Klein, A. F., Rau, F., Sureau, A., Ney, M., Cordier, A., Kondili, M., Polay-Espinoza, M., Naouar, N., Ferry, A., Lemaitre, M., Begard, S., Colin, M., Lamarre, C., Tran, H., Buée, L., Marie, J., Sergeant, N., & Furling, D. (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), 207–220. <https://doi.org/10.1038/s41551-021-00838-2>
- Arber, S., Han, B., Mendelsohn, M., Smith, M., Jessell, T. M., & Sockanathan, S. (1999). Requirement for the homeobox gene Hb9 in the consolidation of motor neuron identity. *Neuron*, 23(4), 659–674. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)80026-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)80026-X)
- Armand, J. (1982). The Origin, Course and Terminations of Corticospinal Fibers in Various Mammals. *Progress in Brain Research*, 57(C), 329–360. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)64136-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)64136-9)
- Ashizawa, T., Anvret, M., Baiget, M., Barceló, J. M., Brunner, H., Cobo, A. M., Dallapiccola, B.,

- Fenwick, R. G., Grandell, U., Harley, H., Junien, C., Koch, M. C., Korneluk, R. G., Lavedan, C., Miki, T., Mulley, J. C., De López Munain, A., Novelli, G., Roses, A. D., ... Harper, P. S. (1994). Characteristics of intergenerational contractions of the CTG repeat in myotonic dystrophy. *American Journal of Human Genetics*, *54*(3), 414–423.
- Ashizawa, T., Dubel, J. R., & Harati, Y. (1993). Somatic instability of ctg repeat in myotonic dystrophy. *Neurology*, *43*(12), 2674–2678. <https://doi.org/10.1212/wnl.43.12.2674>
- Ashizawa, T., & Sarkar, P. S. (2011). Myotonic dystrophy types 1 and 2. In *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 101). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-045031-5.00015-3>
- Ashwal-Fluss, R., Meyer, M., Pamudurti, N. R., Ivanov, A., Bartok, O., Hanan, M., Evantal, N., Memczak, S., Rajewsky, N., & Kadener, S. (2014). CircRNA Biogenesis competes with Pre-mRNA splicing. *Molecular Cell*, *56*(1), 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.08.019>
- Bachasson, D., Moraux, A., Ollivier, G., Decostre, V., Ledoux, I., Gidaro, T., Servais, L., Behin, A., Stojkovic, T., Hébert, L. J., Puymirat, J., Eymard, B., Bassez, G., & Hogrel, J. Y. (2016). Relationship between muscle impairments, postural stability, and gait parameters assessed with lower-trunk accelerometry in myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscular Disorders*, *26*(7), 428–435. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2016.05.009>
- Bachinski, L. L., Udd, B., Meola, G., Sansone, V., Bassez, G., Eymard, B., Thornton, C. A., Moxley, R. T., Harper, P. S., Rogers, M. T., Jurkat-Rott, K., Lehmann-Horn, F., Wieser, T., Gamez, J., Navarro, C., Bottani, A., Kohler, A., Shriver, M. D., Sallinen, R., ... Krahe, R. (2003). Confirmation of the Type 2 Myotonic Dystrophy (CCTG)_n Expansion Mutation in Patients with Proximal Myotonic Myopathy/Proximal Myotonic Dystrophy of Different European Origins: A Single Shared Haplotype Indicates an Ancestral Founder Effect. *American Journal of Human Genetics*, *73*(4), 835–848. <https://doi.org/10.1086/378566>
- Baker, R. W., & Hughson, F. M. (2016). Chaperoning SNARE assembly and disassembly. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *17*(8), 465–479. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.65>
- Balice-Gordon, R. J., & Lichtman, J. W. (1994). Long-term synapse loss induced by focal blockade of postsynaptic receptors. *Nature*, *372*(6506), 519–524. <https://doi.org/10.1038/372519a0>
- Bandyopadhyay, U., Fenton, W. A., Horwich, A. L., & Nagy, M. (2014). Production of RNA for Transcriptomic Analysis from Mouse Spinal Cord Motor Neuron Cell Bodies by Laser Capture Microdissection. *Journal of Visualized Experiments*, *83*, e51168–e51168. <https://doi.org/10.3791/51168>
- Banerjee, A., Ifrim, M. F., Valdez, A. N., Raj, N., & Bassell, G. J. (2018). *Aberrant RNA translation in fragile X syndrome: From FMRP mechanisms to emerging therapeutic strategies*. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.04.008>
- Baraldo, M., Geremia, A., Pirazzini, M., Nogara, L., Solagna, F., Türk, C., Nolte, H., Romanello, V., Megighian, A., Boncompagni, S., Kruger, M., Sandri, M., & Blaauw, B. (2020). Skeletal muscle mTORC1 regulates neuromuscular junction stability. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, *11*(1), 208–225. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12496>
- Barbé, L., Lanni, S., López-Castel, A., Franck, S., Spits, C., Keymolen, K., Seneca, S., Tomé, S., Miron, I., Letourneau, J., Liang, M., Choufani, S., Weksberg, R., Wilson, M. D., Sedlacek, Z., Gagnon, C., Musova, Z., Chitayat, D., Shannon, P., ... Pearson, C. E. (2017). CpG Methylation, a Parent-of-Origin Effect for Maternal-Biased Transmission of Congenital Myotonic Dystrophy. *American Journal of Human Genetics*, *100*(3), 488–505. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.01.033>
- Bargiela, A., Sabater-Arcis, M., Espinosa-Espinosa, J., Zulaica, M., De Munain, A. L., & Artero, R. (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 of the United States of America*, *116*(50), 25203–25213.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1820297116>

- Barik, A., Li, L., Sathyamurthy, A., Xiong, W. C., & Mei, L. (2016). Schwann cells in neuromuscular junction formation and maintenance. *Journal of Neuroscience*, *36*(38), 9770–9781. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0174-16.2016>
- Barik, A., Lu, Y., Sathyamurthy, A., Bowman, A., Shen, C., Li, L., Xiong, W. C., & Mei, L. (2014). LRP4 is critical for neuromuscular junction maintenance. *Journal of Neuroscience*, *34*(42), 13892–13905. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1733-14.2014>
- Barreau, C., Paillard, L., Méreau, A., & Osborne, H. B. (2006). Mammalian CELF/Bruno-like RNA-binding proteins: molecular characteristics and biological functions. In *Biochimie* (Vol. 88, Issue 5, pp. 515–525). <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2005.10.011>
- Bashaw, G. J., & Klein, R. (2010). Signaling from axon guidance receptors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(5), a001941. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001941>
- Bassez, G., Chapoy, E., Bastuji-Garin, S., Radvanyi-Hoffman, H., Authier, F. J., Pellissier, J. F., Eymard, B., & Gherardi, R. K. (2008). Type 2 myotonic dystrophy can be predicted by the combination of type 2 muscle fiber central nucleation and scattered atrophy. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *67*(4), 319–325. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31816b4acc>
- Bassez, G., Lazarus, A., Desguerre, I., Varin, J., Laforêt, P., Bécane, H. M., Meune, C., Arne-Bes, M. C., Ounnoughene, Z., Radvanyi, H., Eymard, B., & Duboc, D. (2004). Severe cardiac arrhythmias in young patients with myotonic dystrophy type 1. *Neurology*, *63*(10), 1939–1941. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000144343.91136.CF>
- Batra, R., Charizanis, K., Manchanda, M., Mohan, A., Li, M., Finn, D. J., Goodwin, M., Zhang, C., Sobczak, K., Thornton, C. A., & Swanson, M. S. (2014). Loss of MBNL leads to disruption of developmentally regulated alternative polyadenylation in RNA-mediated disease. *Molecular Cell*, *56*(2), 311–322. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.08.027>
- Batra, R., Charizanis, K., & Swanson, M. S. (2010). Partners in crime: Bidirectional transcription in unstable microsatellite disease. *Human Molecular Genetics*, *19*(R1), R77–R82. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq132>
- Batra, R., Nelles, D. A., Pirie, E., Blue, S. M., Marina, R. J., Wang, H., Chaim, I. A., Thomas, J. D., Zhang, N., Nguyen, V., Aigner, S., Markmiller, S., Xia, G., Corbett, K. D., Swanson, M. S., & Yeo, G. W. (2017). Elimination of Toxic Microsatellite Repeat Expansion RNA by RNA-Targeting Cas9. *Cell*, *170*(5), 899–912.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.010>
- Batten, F. E., & Gibb, H. P. (1909). Myotonia atrophica. *Brain*, *32*(2), 187–205. <https://doi.org/10.1093/brain/32.2.187>
- Baylor, S. M., & Hollingworth, S. (2011). Calcium indicators and calcium signalling in skeletal muscle fibres during excitation-contraction coupling. In *Progress in Biophysics and Molecular Biology* (Vol. 105, Issue 3, pp. 162–179). <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2010.06.001>
- Beffert, U., Dillon, G. M., Sullivan, J. M., Stuart, C. E., Gilbert, J. P., Kambouris, J. A., & Ho, A. (2012). Microtubule plus-end tracking protein CLASP2 regulates neuronal polarity and synaptic function. *Journal of Neuroscience*, *32*(40), 13906–13916. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2108-12.2012>
- Begemann, G., Paricio, N., Artero, R., Kiss, I., Pérez-Alonso, M., & Mlodzik, M. (1997). muscleblind, a gene required for photoreceptor differentiation in Drosophila, encodes novel nuclear Cys3His-type zinc-finger-containing proteins. *Development (Cambridge, England)*, *124*(21), 4321–4331. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034248>
- Bellini, M., Biagi, S., Stasi, C., Costa, F., Mumolo, M. G., Ricchiuti, A., & Marchi, S. (2006). Gastrointestinal manifestations in myotonic muscular dystrophy. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 12, Issue 12, pp. 1821–1828). Baishideng Publishing Group Inc.

<https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i12.1821>

- Belotti, E., & Schaeffer, L. (2020). Regulation of Gene expression at the neuromuscular Junction. *Neuroscience Letters*, 735(June). <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135163>
- Benders, A. A. G. M., Groenen, P. J. T. A., Oerlemans, F. T. J. J., Veerkamp, J. H., & Wieringa, B. (1997). Myotonic dystrophy protein kinase is involved in the modulation of the Ca²⁺ homeostasis in skeletal muscle cells. *Journal of Clinical Investigation*, 100(6), 1440–1447. <https://doi.org/10.1172/JCI119664>
- Bergamin, E., Hallock, P. T., Burden, S. J., & Hubbard, S. R. (2010). The Cytoplasmic Adaptor Protein Dok7 Activates the Receptor Tyrosine Kinase MuSK via Dimerization. *Molecular Cell*, 39(1), 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.06.007>
- Berul, C. I., Maguire, C. T., Aronovitz, M. J., Greenwood, J., Miller, C., Gehrman, J., Housman, D., Mendelsohn, M. E., & Reddy, S. (1999). DMPK dosage alterations result in atrioventricular conduction abnormalities in a mouse myotonic dystrophy model. *Journal of Clinical Investigation*, 103(4), R1-7. <https://doi.org/10.1172/JCI5346>
- Berul, C. I., Maguire, C. T., Gehrman, J., & Reddy, S. (2000). Progressive atrioventricular conduction block in a mouse myotonic dystrophy model. *Journal of Interventional Cardiac Electrophysiology*, 4(2), 351–358. <https://doi.org/10.1023/A:1009842114968>
- Bessou, P., Emonet-Dénand, F., & Laporte, Y. (1965). Motor fibres innervating extrafusal and intrafusal muscle fibres in the cat. *The Journal of Physiology*, 180(3), 649–672. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1965.sp007722>
- Bishop, D. L., Misgeld, T., Walsh, M. K., Gan, W. B., & Lichtman, J. W. (2004). Axon branch removal at developing synapses by axosome shedding. *Neuron*, 44(4), 651–661. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.10.026>
- Bombelli, F., Lispi, L., Porrini, S. C., Giacanelli, M., Terracciano, C., Massa, R., & Petrucci, A. (2016). Neuromuscular transmission abnormalities in myotonic dystrophy type 1: A neurophysiological study. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 150, 84–88. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2016.08.020>
- Bondy-Chorney, E., Crawford Parks, T. E., Ravel-Chapuis, A., Jasmin, B. J., & Côté, J. (2016). Staufen1s role as a splicing factor and a disease modifier in Myotonic Dystrophy Type I. *Rare Diseases*, 4(1), e1225644. <https://doi.org/10.1080/21675511.2016.1225644>
- Botta, A., Vallo, L., Rinaldi, F., Bonifazi, E., Amati, F., Biancolella, M., Gambardella, S., Mancinelli, E., Angelini, C., Meola, G., & Novelli, G. (2007). Gene expression analysis in myotonic dystrophy: Indications for a common molecular pathogenic pathway in DM1 and DM2. *Gene Expression*, 13(6), 339–351. <https://doi.org/10.3727/000000006781510705>
- Brembilla-Perrot, B., Schwartz, J., Huttin, O., Frikha, Z., Sellal, J. M., Sadoul, N., Blangy, H., Olivier, A., Louis, S., & Kaminsky, P. (2014). Atrial flutter or fibrillation is the most frequent and life-threatening arrhythmia in myotonic dystrophy. *PACE - Pacing and Clinical Electrophysiology*, 37(3), 329–335. <https://doi.org/10.1111/pace.12260>
- Brill, M. S., Kleele, T., Ruschkies, L., Wang, M., Marahori, N. A., Reuter, M. S., Hausrat, T. J., Weigand, E., Fisher, M., Ahles, A., Engelhardt, S., Bishop, D. L., Kneussel, M., & Misgeld, T. (2016). Branch-Specific Microtubule Destabilization Mediates Axon Branch Loss during Neuromuscular Synapse Elimination. *Neuron*, 92(4), 845–856. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.049>
- Briscoe, J., Pierani, A., Jessell, T. M., & Ericson, J. (2000). A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell*, 101(4), 435–445. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80853-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80853-3)
- Brockhoff, M., Rion, N., Chojnowska, K., Wiktorowicz, T., Eickhorst, C., Erne, B., Frank, S., Angelini, C., Furling, D., Rüegg, M. A., Sinnreich, M., & Castets, P. (2017). Targeting

- deregulated AMPK/mTORC1 pathways improves muscle function in myotonic dystrophy type 1. *Journal of Clinical Investigation*, 127(2), 549–563. <https://doi.org/10.1172/JCI89616>
- Broix, L., Turchetto, S., & Nguyen, L. (2021). Coordination between Transport and Local Translation in Neurons. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 31, Issue 5, pp. 372–386). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.01.001>
- Brook, J. D., McCurrach, M. E., Harley, H. G., Buckler, A. J., Church, D., Aburatani, H., Hunter, K., Stanton, V. P., Thirion, J. P., Hudson, T., Sohn, R., Zeman, B., Snell, R. G., Rundle, S. A., Crow, S., Davies, J., Shelbourne, P., Buxton, J., Jones, C., ... Housman, D. E. (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. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90154-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90154-5)
- Brown, M. C., Jansen, J. K., & Van Essen, D. (1976). Polyneuronal innervation of skeletal muscle in new-born rats and its elimination during maturation. *The Journal of Physiology*, 261(2), 387–422. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1976.sp011565>
- Bruneau, E., Sutter, D., Hume, R. I., & Akaaboune, M. (2005). Identification of nicotinic acetylcholine receptor recycling and its role in maintaining receptor density at the neuromuscular junction in vivo. *Journal of Neuroscience*, 25(43), 9949–9959. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3169-05.2005>
- Burke, R. E., Levine, D. N., Tsairis, P., & Zajac, F. E. (1973). Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *The Journal of Physiology*, 234(3), 723–748. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010369>
- Buxton, J., Shelbourne, P., Davies, J., Jones, C., Van Tongeren, T., Aslanidis, C., De Jong, P. J., Jansen, G., Anvret, M., Riley, B., Williamson, R., & Johnson, K. (1992). Detection of an unstable fragment of DNA specific to individuals with myotonic dystrophy. *Nature*, 359, 710–713. [file:///C:/Users/ASUS/Desktop/Rujukan PhD/p21/xiong1993.pdf](file:///C:/Users/ASUS/Desktop/Rujukan%20PhD/p21/xiong1993.pdf)
- Byrd, D. T., Kawasaki, M., Walcoff, M., Hisamoto, N., Matsumoto, K., & Jin, Y. (2001). UNC-16, a JNK-signaling scaffold protein, regulates vesicle transport in *C. elegans*. *Neuron*, 32(5), 787–800. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00532-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00532-3)
- Cadigan, K. M., & Nusse, R. (1997). Wnt signaling: A common theme in animal development. *Genes and Development*, 11(24), 3286–3305. <https://doi.org/10.1101/gad.11.24.3286>
- Caillet-Boudin, M. L., Fernandez-Gomez, F. J., Tran, H., Dhaenens, C. M., Buee, L., & Sergeant, N. (2014). Brain pathology in myotonic dystrophy: When tauopathy meets spliceopathy and RNAopathy. In *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Vol. 6, Issue JAN, p. 57). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2013.00057>
- Cajigas, I. J., Tushev, G., Will, T. J., Tom Dieck, S., Fuerst, N., & Schuman, E. M. (2012). The Local Transcriptome in the Synaptic Neuropil Revealed by Deep Sequencing and High-Resolution Imaging. *Neuron*, 74(3), 453–466. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.036>
- Campbell, N. A., Mitchell, L. G., & Reece, J. B. (2000). *Biology: concepts & connections*. Benjamin/Cummings. <https://openlibrary.org/works/OL1983083W/Biology>
- Cano, R., Torres-Benito, L., Tejero, R., Biea, A. I., Ruiz, R., Betz, W. J., & Tabares, L. (2013). Structural and functional maturation of active zones in large synapses. *Molecular Neurobiology*, 47(1), 209–219. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8347-9>
- Caputo, C., & Gimenez, M. (1967). Effects of external calcium deprivation on single muscle fibers. *The Journal of General Physiology*, 50(9), 2177–2195. <https://doi.org/10.1085/jgp.50.9.2177>
- Carango, P., Noble, E., Marks, H. G., & Funanage, V. L. (1993). Absence of DMPK mRNA as a result of a triplet repeat expansion in myotonic dystrophy. *Genomics*.
- Cardani, R., Mancinelli, E., Rotondo, G., Sansone, V., & Meola, G. (2006). Muscleblind-like

- protein 1 nuclear sequestration is a molecular pathology marker of DM1 and DM2. *European Journal of Histochemistry*, 50(3), 177–182. https://air.unimi.it/retrieve/dfa8b990-7df3-748b-e053-3a05fe0a3a96/EUR_J_HIST_2006-Cardani_R.pdf
- Carnio, S., LoVerso, F., Baraibar, M. A., Longa, E., Khan, M. M., Maffei, M., Reischl, M., Canepari, M., Loeffler, S., Kern, H., Blaauw, B., Friguet, B., Bottinelli, R., Rudolf, R., & Sandri, M. (2014). Autophagy Impairment in Muscle Induces Neuromuscular Junction Degeneration and Precocious Aging. *Cell Reports*, 8(5), 1509–1521. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.061>
- Carrell, S. T., Carrell, E. M., Auerbach, D., Pandey, S. K., Bennett, C. F., Dirksen, R. T., & Thornton, C. A. (2016). Dmpk gene deletion or antisense knockdown does not compromise cardiac or skeletal muscle function in mice. *Human Molecular Genetics*, 25(19), 4328–4338. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw266>
- Cass, D., Hotchko, R., Barber, P., Jones, K., Gates, D. P., & Berglund, J. A. (2011). The four Zn fingers of MBNL1 provide a flexible platform for recognition of its RNA binding elements. *BMC Molecular Biology*, 12, 20. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-12-20>
- Castel, A. L., Nakamori, M., Tomé, S., Chitayat, D., Gourdon, G., Thornton, C. A., & Pearson, C. E. (2011). Expanded CTG repeat demarcates a boundary for abnormal CpG methylation in myotonic dystrophy patient tissues. *Human Molecular Genetics*, 20(1), 1–15. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq427>
- Castets, P., Ham, D. J., & Rüegg, M. A. (2020). The TOR Pathway at the Neuromuscular Junction: More Than a Metabolic Player? *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13(August), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00162>
- Caughey, J., & Myriantopoulos, N. (1963). *Dystrophia Myotonica and related disorders* (III). Charles C Thomas, Springfield.
- Cerro-Herreros, E., González-Martínez, I., Moreno-Cervera, N., Overby, S., Pérez-Alonso, M., Llamusi, B., & Artero, R. (2020). Therapeutic Potential of AntagomiR-23b for Treating Myotonic Dystrophy. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 21(September), 837–849. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2020.07.021>
- Chai, R. J., Vukovic, J., Dunlop, S., Grounds, M. D., & Shavlakadze, T. (2011). Striking denervation of neuromuscular junctions without lumbar motoneuron loss in geriatric mouse muscle. *PLoS ONE*, 6(12), e28090. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028090>
- Chand, K. K., Lee, K. M., Schenning, M. P., Lavidis, N. A., & Noakes, P. G. (2015). Loss of β 2-laminin alters calcium sensitivity and voltage-gated calcium channel maturation of neurotransmission at the neuromuscular junction. *Journal of Physiology*, 593(1), 245–265. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.284133>
- Chandrasekhar, A. (2004). Turning Heads: Development of Vertebrate Branchiomotor Neurons. In *Developmental Dynamics* (Vol. 229, Issue 1, pp. 143–161). <https://doi.org/10.1002/dvdy.10444>
- Charizanis, K., Lee, K. Y., Batra, R., Goodwin, M., Zhang, C., Yuan, Y., Shiue, L., Cline, M., Scotti, M. M., Xia, G., Kumar, A., Ashizawa, T., Clark, H. B., Kimura, T., Takahashi, M. P., Fujimura, H., Jinnai, K., Yoshikawa, H., Gomes-Pereira, M., ... Swanson, M. S. (2012). Muscleblind-like 2-Mediated Alternative Splicing in the Developing Brain and Dysregulation in Myotonic Dystrophy. *Neuron*, 75(3), 437–450. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.05.029>
- Charlet-B., N., Savkur, R. S., Singh, G., Philips, A. V., Grice, E. A., & Cooper, T. A. (2002). Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Molecular Cell*, 10(1), 45–53. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00572-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00572-5)

- Chen, F., Qian, L., Yang, Z. H., Huang, Y., Ngo, S. T., Ruan, N. J., Wang, J., Schneider, C., Noakes, P. G., Ding, Y. Q., Mei, L., & Luo, Z. G. (2007). Rapsyn Interaction with Calpain Stabilizes AChR Clusters at the Neuromuscular Junction. *Neuron*, *55*(2), 247–260. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.06.031>
- Chen, G., Masuda, A., Konishi, H., Ohkawara, B., Ito, M., Kinoshita, M., Kiyama, H., Matsuura, T., & Ohno, K. (2016). Phenylbutazone induces expression of MBNL1 and suppresses formation of MBNL1-CUG RNA foci in a mouse model of myotonic dystrophy. *Scientific Reports*, *6*, 25317. <https://doi.org/10.1038/srep25317>
- Chen, K. Y., Pan, H., Lin, M. J., Li, Y. Y., Wang, L. C., Wu, Y. C., & Hsiao, K. M. (2007). Length-dependent toxicity of untranslated CUG repeats on *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *352*(3), 774–779. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.11.102>
- Chen, W., Liang, Y., Deng, W., Shimizu, K., Ashique, A. M., Li, E., & Li, Y. P. (2003). The zinc-finger protein CNBP is required for forebrain formation in the mouse. *Development*, *130*(7), 1367–1379. <https://doi.org/10.1242/dev.00349>
- Chen, W., Wang, Y., Abe, Y., Cheney, L., Udd, B., & Li, Y. P. (2007). Haploinsufficiency for Znf9 in Znf9^{+/-} Mice Is Associated with Multiorgan Abnormalities Resembling Myotonic Dystrophy. *Journal of Molecular Biology*, *368*(1), 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.01.088>
- Cheng, A. W., Shi, J., Wong, P., Luo, K. L., Trepman, P., Wang, E. T., Choi, H., Burge, C. B., & Lodish, H. F. (2014). Muscleblind-like 1 (Mbnl1) regulates pre-mRNA alternative splicing during terminal erythropoiesis. *Blood*, *124*(4), 598–610. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-12-542209>
- Cheng, H. M., Chern, Y., Chen, I. H., Liu, C. R., Li, S. H., Chun, S. J., Rigo, F., Bennett, C. F., Deng, N., Feng, Y., Lin, C. S., Yan, Y. T., Cohen, S. N., & Cheng, T. H. (2015). Effects on Murine Behavior and Lifespan of Selectively Decreasing Expression of Mutant Huntingtin Allele by Supt4h Knockdown. *PLoS Genetics*, *11*(3), e1005043. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005043>
- Childs-Disney, J. L., Yildirim, I., Park, H., Lohman, J. R., Guan, L., Tran, T., Sarkar, P., Schatz, G. C., & Disney, M. D. (2014). Structure of the myotonic dystrophy type 2 RNA and designed small molecules that reduce toxicity. *ACS Chemical Biology*, *9*(2), 538–550. <https://doi.org/10.1021/cb4007387>
- Cho, D. H., Thienes, C. P., Mahoney, S. E., Analau, E., Filippova, G. N., & Tapscott, S. J. (2005). Antisense transcription and heterochromatin at the DM1 CTG repeats are constrained by CTCF. *Molecular Cell*, *20*(3), 483–489. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.09.002>
- Choi, J., Personius, K. E., DiFranco, M., Dansithong, W., Yu, C., Srivastava, S., Dixon, D. M., Bhatt, D. B., Comai, L., Vergara, J. L., & Reddy, S. (2015). Muscleblind-Like 1 and Muscleblind-Like 3 Depletion Synergistically Enhances Myotonia by Altering Clc-1 RNA Translation. *EBioMedicine*, *2*(9), 1034–1047. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.07.028>
- Chung, K. H., Hart, C. C., Al-Bassam, S., Avery, A., Taylor, J., Patel, P. D., Vojtek, A. B., & Turner, D. L. (2006). Polycistronic RNA polymerase II expression vectors for RNA interference based on BIC/miR-155. *Nucleic Acids Research*, *34*(7). <https://doi.org/10.1093/nar/gkl143>
- Chung, K., Kevetter, G. A., Willis, W. D., & Coggeshall, R. E. (1984). An estimate of the ratio of propriospinal to long tract neurons in the sacral spinal cord of the rat. *Neuroscience Letters*, *44*(2), 173–177. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(84\)90077-6](https://doi.org/10.1016/0304-3940(84)90077-6)
- Cleary, J. D., Tomé, S., Castel, A. L., Panigrahi, G. B., Foiry, L., Hagerman, K. A., Sroka, H., Chitayat, D., Gourdon, G., & Pearson, C. E. (2010). Tissue- and age-specific DNA replication patterns at the CTG/CAG-expanded human myotonic dystrophy type 1 locus.

- Nature Structural and Molecular Biology*, 17(9), 1079–1087. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1876>
- Coers, C., Telerman-Toppet, N., & Gerard, J. M. (1973). Terminal innervation ratio in neuromuscular disease. II. Disorders of lower motor neuron, peripheral nerve, and muscle. *Arch Neurol*, 29(4), 215–222. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4353847>
- Collingridge, G. L., & Lester, R. A. J. (1989). Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacological Reviews*, 41(2), 143–210.
- Coonrod, L. A., Nakamori, M., Wang, W., Carrell, S., Hilton, C. L., Bodner, M. J., Siboni, R. B., Docter, A. G., Haley, M. M., Thornton, C. A., & Berglund, J. A. (2013). Reducing levels of toxic RNA with small molecules. *ACS Chemical Biology*, 8(11), 2528–2537. <https://doi.org/10.1021/cb400431f>
- Couesnnon, A., Offner, N., Bernard, V., Chaverot, N., Backer, S., Dimitrov, A., Perez, F., Molgó, J., & Bloch-Gallego, E. (2013). CLIPR-59: A protein essential for neuromuscular junction stability during mouse late embryonic development. *Development (Cambridge)*, 140(7), 1583–1593. <https://doi.org/10.1242/dev.087106>
- Cros, D., Harnden, P., Pouget, J., Pellissier, J. F., Gastaut, J. L., & Serratrice, G. (1988). Peripheral neuropathy in myotonic dystrophy: A nerve biopsy study. *Annals of Neurology*, 23(5), 470–476. <https://doi.org/10.1002/ana.410230508>
- Cumming, S. A., Jimenez-Moreno, C., Okkersen, K., Wenninger, S., Daidj, F., Hogarth, F., Littleford, R., Gorman, G., Bassez, G., Schoser, B., Lochmüller, H., Van Engelen, B. G. M., & Monckton, D. G. (2019). Genetic determinants of disease severity in the myotonic dystrophy type 1 OPTIMISTIC cohort. *Neurology*, 93(10), E995–E1009. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000008056>
- Cywoniuk, P., Taylor, K., Sznajder, L. J., & Sobczak, K. (2017). Hybrid splicing minigene and antisense oligonucleotides as efficient tools to determine functional protein/RNA interactions. *Scientific Reports*, 7(1), 17587. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17816-x>
- Czaplinski, K. (2014). Understanding mRNA trafficking: Are we there yet? *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 32, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.04.025>
- Dansithong, W., Paul, S., Comai, L., & Reddy, S. (2005). MBNL1 is the primary determinant of focus formation and aberrant insulin receptor splicing in DM1. *Journal of Biological Chemistry*, 280(7), 5773–5780. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410781200>
- Darabid, H., Perez-Gonzalez, A. P., & Robitaille, R. (2014). Neuromuscular synaptogenesis: Coordinating partners with multiple functions. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(11), 703–718. <https://doi.org/10.1038/nrn3821>
- Dasen, J. S., & Jessell, T. M. (2009). Chapter Six Hox Networks and the Origins of Motor Neuron Diversity. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 88, pp. 169–200). Curr Top Dev Biol. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(09\)88006-X](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(09)88006-X)
- Dasen, J. S., Liu, J. P., & Jessell, T. M. (2003). Motor neuron columnar fate imposed by sequential phases of Hox-c activity. *Nature*, 425(6961), 926–933. <https://doi.org/10.1038/nature02051>
- Dasen, J. S., Tice, B. C., Brenner-Morton, S., & Jessell, T. M. (2005). A Hox regulatory network establishes motor neuron pool identity and target-muscle connectivity. *Cell*, 123(3), 477–491. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.009>
- Dasgupta, T., & Ladd, A. N. (2012). The importance of CELF control: Molecular and biological roles of the CUG-BP, Elav-like family of RNA-binding proteins. In *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* (Vol. 3, Issue 1, pp. 104–121). Wiley Interdiscip Rev RNA. <https://doi.org/10.1002/wrna.107>
- Dastidar, S., Majumdar, D., Tipanee, J., Singh, K., Klein, A. F., Furling, D., Chuah, M. K., & VandenDriessche, T. (2022). Comprehensive transcriptome-wide analysis of spliceopathy correction of myotonic dystrophy using CRISPR-Cas9 in iPSCs-derived cardiomyocytes.

- Molecular Therapy*, 30(1), 75–91. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.08.004>
- Davis, B. M., Mccurrach, M. E., Taneja, K. L., Singer, R. H., & Housman, D. E. (1997). Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of myotonic dystrophy protein kinase transcripts results in nuclear retention of transcripts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(14), 7388–7393. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.14.7388>
- Day, J. W., & Ranum, L. P. W. (2005a). Genetics and molecular pathogenesis of the myotonic dystrophies. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 5(1), 55–60. <https://doi.org/10.1007/s11910-005-0024-1>
- Day, J. W., & Ranum, L. P. W. (2005b). RNA pathogenesis of the myotonic dystrophies. *Neuromuscular Disorders*, 15(1), 5–16. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2004.09.012>
- Day, J. W., Ricker, K., Jacobsen, J. F., Rasmussen, L. J., Dick, K. A., Kress, W., Schneider, C., Koch, M. C., Beilman, G. J., Harrison, A. R., Dalton, J. C., & Ranum, L. P. W. (2003). Myotonic dystrophy type 2: Molecular, diagnostic and clinical spectrum. *Neurology*, 60(4), 657–664. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000054481.84978.F9>
- Day, J. W., Roelofs, R., Leroy, B., Pech, I., Benzow, K., & Ranum, L. P. W. (1999). Clinical and genetic characteristics of a five-generation family with a novel form of myotonic dystrophy (DM2). *Neuromuscular Disorders*, 9(1), 19–27. [https://doi.org/10.1016/S0960-8966\(98\)00094-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8966(98)00094-7)
- De Antonio, M., Dogan, C., Hamroun, D., Mati, M., Zerrouki, S., Eymard, B., Katsahian, S., & Bassez, G. (2016). Unravelling the myotonic dystrophy type 1 clinical spectrum: A systematic registry-based study with implications for disease classification. In *Revue Neurologique* (Vol. 172, Issue 10, pp. 572–580). Elsevier Masson. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2016.08.003>
- de Pontual, L., & Tomé, S. (2022). Overview of the Complex Relationship between Epigenetics Markers, CTG Repeat Instability and Symptoms in Myotonic Dystrophy Type 1. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 7, p. 3477). <https://doi.org/10.3390/ijms23073477>
- deLorimier, E., Coonrod, L. A., Copperman, J., Taber, A., Reister, E. E., Sharma, K., Todd, P. K., Guenza, M. G., & Berglund, J. A. (2014). Modifications to toxic CUG RNAs induce structural stability, rescue mis-splicing in a myotonic dystrophy cell model and reduce toxicity in a myotonic dystrophy zebrafish model. *Nucleic Acids Research*, 42(20), 12768–12778. <https://doi.org/10.1093/nar/gku941>
- Denes, L. T., Kelley, C. P., & Wang, E. T. (2021). Microtubule-based transport is essential to distribute RNA and nascent protein in skeletal muscle. *Nature Communications*, 12(1), 6079. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26383-9>
- Deniston, C. K., Salogiannis, J., Mathea, S., Snead, D. M., Lahiri, I., Matyszewski, M., Donosa, O., Watanabe, R., Böhning, J., Shiao, A. K., Knapp, S., Villa, E., Reck-Peterson, S. L., & Leschziner, A. E. (2020). Structure of LRRK2 in Parkinson's disease and model for microtubule interaction. *Nature*, 588(7837), 344–349. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2673-2>
- Desaki, J., & Uehara, Y. (1981). The overall morphology of neuromuscular junctions as revealed by scanning electron microscopy. *Journal of Neurocytology*, 10(1), 101–110. <https://doi.org/10.1007/BF01181747>
- Dhaenens, C. M., Schraen-Maschke, S., Tran, H., Vingtdeux, V., Ghanem, D., Leroy, O., Delplanque, J., Vanbrussel, E., Delacourte, A., Vermersch, P., Maurage, C. A., Gruffat, H., Sergeant, A., Mahadevan, M. S., Ishiura, S., Buée, L., Cooper, T. A., Caillet-Boudin, M. L., Charlet-Berguerand, N., ... Sergeant, N. (2008). Overexpression of MBNL1 fetal isoforms and modified splicing of Tau in the DM1 brain: Two individual consequences of CUG

- trinucleotide repeats. *Experimental Neurology*, 210(2), 467–478.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.11.020>
- Dinca, D. M., Lallemand, L., González-Barriga, A., Cresto, N., Sicot, G., Pillet, L.-E., Polveche, H., Magneron, P., Huguet-Lachon, A., Benyammine, H., Azotla-Vilchis, C. N., Agonizantes-Juárez, L. E., Tahraoui-Bories, J., Martinat, C., Hernández-Hernández, O., Auboeuf, D., Rouach, N., Bourgeois, C. F., Gourdon, G., & Gomes-Pereira, M. (2022). Myotonic dystrophy RNA toxicity alters morphology, adhesion and migration of mouse and human astrocytes. *Research Square Preprints*, 10.21203/RS.3.RS-137333/V1.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-31594-9>
- Dixon, D. M., Choi, J., El-Ghazali, A., Park, S. Y., Roos, K. P., Jordan, M. C., Fishbein, M. C., Comai, L., & Reddy, S. (2015). Loss of muscleblind-like 1 results in cardiac pathology and persistence of embryonic splice isoforms. *Scientific Reports*, 5, 1–13.
<https://doi.org/10.1038/srep09042>
- Du, H., Cline, M. S., Osborne, R. J., Tuttle, D. L., Clark, T. A., Donohue, J. P., Hall, M. P., Shiue, L., Swanson, M. S., Thornton, C. A., & Ares, M. (2010). Aberrant alternative splicing and extracellular matrix gene expression in mouse models of myotonic dystrophy. *Nature Structural and Molecular Biology*, 17(2), 187–193. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1720>
- Dubey, J., Ratnakaran, N., & Koushika, S. P. (2015). Neurodegeneration and microtubule dynamics: Death by a thousand cuts. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(September), 343.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00343>
- Ebashi, S., Endo, M., & Ohtsuki, I. (1969). Control of muscle contraction. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 2(4), 351–384. <https://doi.org/10.1017/S0033583500001190>
- Ebralidze, A., Wang, Y., Petkova, V., Ebralidze, K., & Junghans, R. P. (2004). RNA Leaching of Transcription Factors Disrupts Transcription in Myotonic Dystrophy. *Science*, 303(5656), 383–387. <https://doi.org/10.1126/science.1088679>
- Eccles, J. C., Eccles, R. M., Iggo, A., & Lundberg, A. (1960). Electrophysiological Studies on Gamma Motoneurons. *Acta Physiologica Scandinavica*, 50(1), 32–40.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1960.tb02070.x>
- Echeverria, G. V., & Cooper, T. A. (2014). Muscleblind-like 1 activates insulin receptor exon 11 inclusion by enhancing U2AF65 binding and splicing of the upstream intron. *Nucleic Acids Research*, 42(3), 1893–1903. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1020>
- Eckardt, V. F., & Nix, W. (1991). The anal sphincter in patients with myotonic muscular dystrophy. *Gastroenterology*, 100(2), 424–430. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(91\)90212-4](https://doi.org/10.1016/0016-5085(91)90212-4)
- Edge, C., Gooding, C., & Smith, C. W. J. (2013). Dissecting domains necessary for activation and repression of splicing by muscleblind-like protein 1. *BMC Molecular Biology*, 14, 29.
<https://doi.org/10.1186/1471-2199-14-29>
- Eguchi, T., Tezuka, T., Miyoshi, S., & Yamanashi, Y. (2016). Postnatal knockdown of dok-7 gene expression in mice causes structural defects in neuromuscular synapses and myasthenic pathology. *Genes to Cells*, 21(6), 670–676. <https://doi.org/10.1111/gtc.12370>
- Eisenberg, I., Alexander, M. S., & Kunkel, L. M. (2009). miRNAs in normal and diseased skeletal muscle. In *Journal of Cellular and Molecular Medicine* (Vol. 13, Issue 1, pp. 2–11). J Cell Mol Med. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00524.x>
- Ekester, E. (2004). Neurotrophic factors and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegenerative Diseases*, 1(2–3), 88–100. <https://doi.org/10.1159/000080049>
- Ekström, A. B., Tulinius, M., Sjöström, A., & Aring, E. (2010). Visual Function in Congenital and Childhood Myotonic Dystrophy Type 1. *Ophthalmology*, 117(5), 976–982.
<https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2010.01.055>
- Engel, A. G., Shen, X. M., Selcen, D., & Sine, S. M. (2015). Congenital myasthenic syndromes:

- Pathogenesis, diagnosis, and treatment. In *The Lancet Neurology* (Vol. 14, Issue 4, pp. 420–434). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70201-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70201-7)
- Enriquez, J., Venkatasubramanian, L., Baek, M., Peterson, M., Aghayeva, U., & Mann, R. S. (2015). Specification of Individual Adult Motor Neuron Morphologies by Combinatorial Transcription Factor Codes. *Neuron*, *86*(4), 955–970. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.04.011>
- Ensini, M., Tsuchida, T. N., Belting, H. G., & Jessell, T. M. (1998). The control of rostrocaudal pattern in the developing spinal cord: Specification of motor neuron subtype identity is initiated by signals from paraxial mesoderm. *Development*, *125*(6), 969–982. <https://doi.org/10.1242/dev.125.6.969>
- Ericson, J., Morton, S., Kawakami, A., Roelink, H., & Jessell, T. M. (1996). Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell*, *87*(4), 661–673. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81386-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81386-0)
- Fardaei, M., Larkin, K., Brook, J. D., & Hamshere, M. G. (2001). In vivo co-localisation of MBNL protein with DMPK expanded-repeat transcripts. *Nucleic Acids Research*, *29*(13), 2766–2771. <https://doi.org/10.1093/nar/29.13.2766>
- Fardaei, M., Rogers, M. T., Thorpe, H. M., Larkin, K., Hamshere, M. G., Harper, P. S., & Brook, J. D. (2002). Three proteins, MBNL, MBLL and MBXL, co-localize in vivo with nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells. *Human Molecular Genetics*, *11*(7), 805–814. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.7.805>
- Fardeau, M., & Tomé, F. (1980). Light and electron microscopic study of motor endplates in the adult and neonatal forms of dystrophia myotonica. In Elsevier/North-Holland Biomedical Press (Ed.), *Ontogenesis and functional mechanisms of peripheral synapses* (pp. 287–298).
- Faustino, N. A., & Cooper, T. A. (2005). Identification of putative new splicing targets for ETR-3 using sequences identified by systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *Molecular and Cellular Biology*, *25*(3), 879–887. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.3.879-887.2005>
- Favero, M., Busetto, G., & Cangiano, A. (2012). Spike timing plays a key role in synapse elimination at the neuromuscular junction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(25). <https://doi.org/10.1073/pnas.1201147109>
- Fernandez-Costa, J. M., & Artero, R. (2010). A conserved motif controls nuclear localization of Drosophila Muscleblind. *Molecules and Cells*, *30*(1), 65–70. <https://doi.org/10.1007/s10059-010-0089-9>
- Fernandez-Costa, J. M., Garcia-Lopez, A., Zuñiga, S., Fernandez-Pedrosa, V., Felipo-Benavent, A., Mata, M., Jaka, O., Aiastui, A., Hernandez-Torres, F., Aguado, B., Perez-Alonso, M., Vilchez, J. J., Lopez de Munain, A., & Artero, R. D. (2013). Expanded CTG repeats trigger miRNA alterations in Drosophila that are conserved in myotonic dystrophy type 1 patients. *Human Molecular Genetics*, *22*(4), 704–716. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds478>
- Fernandez-Gomez, F., Tran, H., Dhaenens, C. M., Caillet-Boudin, M. L., Schraen-Maschke, S., Blum, D., Sablonnière, B., Buée-Scherrer, V., Buee, L., & Sergeant, N. (2019). Myotonic Dystrophy: an RNA Toxic Gain of Function Tauopathy? In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1184, pp. 207–216). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9358-8_17
- Fernandez, H. L. (1981). Properties of 16S acetylcholinesterase from rat motor nerve and skeletal muscle. *Neurochemical Research*, *6*(9), 1005–1017. <https://doi.org/10.1007/BF00965031>
- Ferns, M. J., Campanelli, J. T., Hoch, W., Scheller, R. H., & Hall, Z. (1993). The ability of agrin to cluster AChRs depends on alternative splicing and on cell surface proteoglycans. *Neuron*, *11*(3), 491–502. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90153-I](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90153-I)

- Fetcho, J. R. (1987). A review of the organization and evolution of motoneurons innervating the axial musculature of vertebrates. *Brain Research Reviews*, 12(3), 243–280. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(87\)90001-4](https://doi.org/10.1016/0165-0173(87)90001-4)
- Filipello, F., Morini, R., Corradini, I., Zerbi, V., Canzi, A., Michalski, B., Erreni, M., Markicevic, M., Starvaggi-Cucuzza, C., Otero, K., Piccio, L., Cignarella, F., Perrucci, F., Tamborini, M., Genua, M., Rajendran, L., Menna, E., Vetrano, S., Fahnestock, M., ... Matteoli, M. (2018). The Microglial Innate Immune Receptor TREM2 Is Required for Synapse Elimination and Normal Brain Connectivity. *Immunity*, 48(5), 979–991.e8. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.04.016>
- Fisette-Paulhus, I., Gagnon, C., Girard-Côté, L., & Morin, M. (2022). Genitourinary and lower gastrointestinal conditions in patients with myotonic dystrophy type 1: A systematic review of evidence and implications for clinical practice. In *Neuromuscular Disorders* (Vol. 32, Issue 5, pp. 361–376). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2022.01.008>
- Fortune, M. T., Vassilopoulos, C., Coolbaugh, M. I., Siciliano, M. J., & Monckton, D. G. (2000). Dramatic, expansion-biased, age-dependent, tissue-specific somatic mosaicism in a transgenic mouse model of triplet repeat instability. *Human Molecular Genetics*, 9(3), 439–445. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.3.439>
- Francius, C., & Clotman, F. (2014). Generating spinal motor neuron diversity: A long quest for neuronal identity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(5), 813–829. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1398-x>
- Franck, S., Barbé, L., Ardui, S., De Vlaeminck, Y., Allemeersch, J., Dziedzicka, D., Spits, C., Vanroye, F., Hilven, P., Duqué, G., Vermeesch, J. R., Gheldof, A., & Sermon, K. (2020). MSH2 knock-down shows CTG repeat stability and concomitant upstream demethylation at the DMPK locus in myotonic dystrophy type 1 human embryonic stem cells. *Human Molecular Genetics*, 29(21), 3566–3577. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddaa250>
- Freyermuth, F., Rau, F., Kokunai, Y., Linke, T., Sellier, C., Nakamori, M., Kino, Y., Arandel, L., Jollet, A., Thibault, C., Philipps, M., Vicaire, S., Jost, B., Udd, B., Day, J. W., Duboc, D., Wahbi, K., Matsumura, T., Fujimura, H., ... Charlet-Berguerand, N. (2016). Splicing misregulation of SCN5A contributes to cardiac-conduction delay and heart arrhythmia in myotonic dystrophy. *Nature Communications*, 7, 11067. <https://doi.org/10.1038/ncomms11067>
- Fu, Y. H., Friedman, D. L., Richards, S., Pearlman, J. A., Gibbs, R. A., Pizzuti, A., Ashizawa, T., Perryman, M. B., Scarlato, G., Fenwick, R. G., & Caskey, C. T. (1993). Decreased expression of myotonin-protein kinase messenger RNA and protein in adult form of myotonic dystrophy. *Science*, 260(5105), 235–238. <https://doi.org/10.1126/science.8469976>
- Fu, Y. H., Pizzuti, A., Fenwick, R. G., King, J., Rajnarayan, S., Dunne, P. W., Dubel, J., Nasser, G. A., Ashizawa, T., De Jong, P., Wieringa, B., Korneluk, R., Perryman, M. B., Epstein, H. F., & Caskey, C. T. (1992). An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science*, 255(5049), 1256–1258. <https://doi.org/10.1126/science.1546326>
- Fu, Y., Ramisetty, S. R., Hussain, N., & Baranger, A. M. (2012). MBNL1-RNA Recognition: Contributions of MBNL1 Sequence and RNA Conformation. *ChemBioChem*, 13(1), 112–119. <https://doi.org/10.1002/cbic.201100487>
- Fugier, C., Klein, A. F., Hammer, C., Vassilopoulos, S., Ivarsson, Y., Toussaint, A., Tosch, V., Vignaud, A., Ferry, A., Messaddeq, N., Kokunai, Y., Tsuburaya, R., De La Grange, P., Dembele, D., Francois, V., Precigout, G., Boulade-Ladame, C., Hummel, M. C., De Munain, A. L., ... Charlet-Berguerand, N. (2011). Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy. *Nature Medicine*, 17(6), 720–725. <https://doi.org/10.1038/nm.2374>
- Furness, J. B. (2006). The organisation of the autonomic nervous system: Peripheral connections.

- Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 130(1–2), 1–5.
<https://doi.org/10.1016/j.autneu.2006.05.003>
- Gadalla, S. M., Lund, M., Pfeiffer, R. M., Gørtz, S., Mueller, C. M., Moxley, R. T., Kristinsson, S. Y., Björkholm, M., Shebl, F. M., Hilbert, J. E., Landgren, O., Wohlfahrt, J., Melbye, M., & Greene, M. H. (2011). Cancer risk among patients with myotonic muscular dystrophy. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 306(22), 2480–2486.
<https://doi.org/10.1001/jama.2011.1796>
- Galli, M., Cimolin, V., Crugnola, V., Priano, L., Menegoni, F., Trotti, C., Milano, E., & Mauro, A. (2012). Gait pattern in myotonic dystrophy (Steinert disease): A kinematic, kinetic and EMG evaluation using 3D gait analysis. *Journal of the Neurological Sciences*, 314(1–2), 83–87.
<https://doi.org/10.1016/j.jns.2011.10.026>
- Gao, Z., & Cooper, T. A. (2013). Reexpression of pyruvate kinase M2 in type 1 myofibers correlates with altered glucose metabolism in myotonic dystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(33), 13570–13575.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1308806110>
- Garcia-Lopez, A., Monferrer, L., Garcia-Alcover, I., Vicente-Crespo, M., Alvarez-Abril, M. C., & Artero, R. D. (2008). Genetic and chemical modifiers of a CUG toxicity model in *Drosophila*. *PLoS ONE*, 3(2), e1595. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001595>
- Garrett, J. M., Dubose, T. D., Jackson, J. E., & Norman, J. R. (1969). Esophageal and Pulmonary Disturbances in Myotonia Dystrophica. *Archives of Internal Medicine*, 123(1), 26–32.
<https://doi.org/10.1001/archinte.1969.00300110028005>
- Gates, D. P., Coonrod, L. A., & Berglund, J. A. (2011). Autoregulated splicing of muscleblind-like 1 (MBNL1) Pre-mRNA. *Journal of Biological Chemistry*, 286(39), 34224–34233.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.236547>
- Gesemann, M., Denzer, A. J., & Ruegg, M. A. (1995). Acetylcholine receptor-aggregating activity of agrin isoforms and mapping of the active site. *Journal of Cell Biology*, 128(4), 625–636.
<https://doi.org/10.1083/jcb.128.4.625>
- Ginhoux, F., & Prinz, M. (2015). Origin of microglia: Current concepts and past controversies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020537>
- Goers, E. S., Purcell, J., Voelker, R. B., Gates, D. P., & Berglund, J. A. (2010). MBNL1 binds GC motifs embedded in pyrimidines to regulate alternative splicing. *Nucleic Acids Research*, 38(7), 2467–2484. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1209>
- Gokhin, D. S. Q. analysis of neonatal skeletal muscle functional improvement in the mouse, Ward, S. R., Bremner, S. N., & Lieber, R. L. (2008). Quantitative analysis of neonatal skeletal muscle functional improvement in the mouse. *Journal of Experimental Biology*, 211(6), 837–843.
<https://doi.org/10.1242/jeb.014340>
- Golden, M. G., & Dasen, J. S. (2012). Polycomb repressive complex 1 activities determine the columnar organization of motor neurons. *Genes and Development*, 26(19), 2236–2250.
<https://doi.org/10.1101/gad.199133.112>
- Gollnick, P. D., Sjödin, B., Karlsson, J., Jansson, E., & Saltin, B. (1974). Human soleus muscle: A comparison of fiber composition and enzyme activities with other leg muscles. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 348(3), 247–255. <https://doi.org/10.1007/BF00587415>
- Gomes-Pereira, M., Foiry, L., Nicole, A., Huguet, A., Junien, C., Munnich, A., & Gourdon, G. (2007). CTG trinucleotide repeat “big jumps”: Large expansions, small mice. *PLoS Genetics*, 3(4), 0488–0491. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030052>
- Gomes-Pereira, M., Fortune, M. T., & Monckton, D. G. (2001). Mouse tissue culture models of unstable triplet repeats: In vitro selection for larger alleles, mutational expansion bias and tissue specificity, but no association with cell division rates. *Human Molecular Genetics*, 10(8),

- 845–854. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.8.845>
- Gomes-Pereira, M., & Monckton, D. G. (2004). Chemically induced increases and decreases in the rate of expansion of a CAG·CTG triplet repeat. *Nucleic Acids Research*, *32*(9), 2865–2872. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh612>
- Goodwin, M., Mohan, A., Batra, R., Lee, K. Y., Charizanis, K., Fernández Gómez, F. J., Eddarkaoui, S., Sergeant, N., Buée, L., Kimura, T., Clark, H. B., Dalton, J., Takamura, K., Weyn-Vanhenenryck, S. M., Zhang, C., Reid, T., Ranum, L. P. W., Day, J. W., & Swanson, M. S. (2015). MBNL Sequestration by Toxic RNAs and RNA Misprocessing in the Myotonic Dystrophy Brain. *Cell Reports*, *12*(7), 1159–1168. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.029>
- Goudriaan, M., Shuman, B. R., Steele, K. M., Van Den Hauwe, M., Goemans, N., Molenaers, G., & Desloovere, K. (2018). Non-neural muscle weakness has limited influence on complexity of motor control during gait. *Frontiers in Human Neuroscience*, *12*, 5. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2018.00005>
- Gourdon, G., Radvanyi, F., Lia, A. S., Duros, C., Blanche, M., Abitbol, M., Junien, C., & Hofmann-Radvanyi, H. (1997). Moderate intergenerational and somatic instability of a 55-CTG repeat in transgenic mice. *Nature Genetics*, *15*(2), 190–192. <https://doi.org/10.1038/ng0297-190>
- Grammatikakis, I., Goo, Y. H., Echeverria, G. V., & Cooper, T. A. (2011). Identification of MBNL1 and MBNL3 domains required for splicing activation and repression. *Nucleic Acids Research*, *39*(7), 2769–2780. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1155>
- Grant, R., Sutton, D. L., Behan, P. O., & Ballantyne, J. P. (1987). Nifedipine in the treatment of myotonia in myotonic dystrophy. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, *50*(2), 199–206. <https://doi.org/10.1136/jnnp.50.2.199>
- Greco, S., Perfetti, A., Fasanaro, P., Cardani, R., Capogrossi, M. C., Meola, G., & Martelli, F. (2012). Deregulated microRNAs in myotonic dystrophy type 2. *PLoS ONE*, *7*(6), e39732. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039732>
- GRIMBY, G., HEDBERG, M., HENRIKSSON, K. -G., JOHANSSON, G., WIGERSTAD-LOSSING, I., SELLDÉN, U., & ÖRNDAHL, G. (1988). Muscle Function and Morphology in Myotonic Dystrophy. *Acta Medica Scandinavica*, *224*(4), 349–356. <https://doi.org/10.1111/j.0954-6820.1988.tb19594.x>
- Groh, W. J., Groh, M. R., Saha, C., Kincaid, J. C., Simmons, Z., Ciafaloni, E., Pourmand, R., Otten, R. F., Bhakta, D., Nair, G. V., Marashdeh, M. M., Zipes, D. P., & Pascuzzi, R. M. (2008). Electrocardiographic Abnormalities and Sudden Death in Myotonic Dystrophy Type 1. *New England Journal of Medicine*, *358*(25), 2688–2697. <https://doi.org/10.1056/nejmoa062800>
- Gu, Y., & Hall, Z. W. (1988). Immunological evidence for a change in subunits of the acetylcholine receptor in developing and denervated rat muscle. *Neuron*, *1*(2), 117–125. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(88\)90195-X](https://doi.org/10.1016/0896-6273(88)90195-X)
- Gudde, A. E. E. G., van Heeringen, S. J., de Oude, A. I., van Kessel, I. D. G., Estabrook, J., Wang, E. T., Wieringa, B., & Wansink, D. G. (2017). Antisense transcription of the myotonic dystrophy locus yields low-abundant RNAs with and without (CAG)_n repeat. *RNA Biology*, *14*(10), 1374–1388. <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1279787>
- Gudde, A. E. E. G., van Kessel, I. D. G., André, L. M., Wieringa, B., & Wansink, D. G. (2017). Trinucleotide-repeat expanded and normal DMPK transcripts contain unusually long poly(A) tails despite differential nuclear residence. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, *1860*(6), 740–749. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2017.04.002>
- Gutman, C. R., Ajmera, M. K., & Hollyday, M. (1993). Organization of motor pools supplying

- axial muscles in the chicken. *Brain Research*, 609(1–2), 129–136.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90865-K](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90865-K)
- Haase, G., Dessaud, E., Garcès, A., De Bovis, B., Birling, M. C., Filippi, P., Schmalbruch, H., Arber, S., & DeLapeyrière, O. (2002). GDNF acts through PEA3 to regulate cell body positioning and muscle innervation of specific motor neuron pools. *Neuron*, 35(5), 893–905.
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00864-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00864-4)
- Hale, M. A., Richardson, J. I., Day, R. C., McConnell, O. L., Arboleda, J., Wang, E. T., & Andrew Berglund, J. (2018). An engineered RNA binding protein with improved splicing regulation. *Nucleic Acids Research*, 46(6), 3152–3168. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1304>
- Hallock, P. T., Chin, S., Blais, S., Neubert, T. A., & Glass, D. J. (2016). Sorbs1 and -2 Interact with CrkL and Are Required for Acetylcholine Receptor Cluster Formation. *Molecular and Cellular Biology*, 36(2), 262–270. <https://doi.org/10.1128/mcb.00775-15>
- Hallock, P. T., Xu, C. F., Park, T. J., Neubert, T. A., & Burden, T. C. S. J. (2010). Dok-7 regulates neuromuscular synapse formation by recruiting Crk and Crk-L. *Genes and Development*, 24(21), 2451–2461. <https://doi.org/10.1101/gad.1977710>
- Hamel-Roy, J., Devroede, G., Arhan, P., Tétreault, J. P., Lemieux, B., & Scott, H. (1984). Functional Abnormalities of the Anal Sphincters in Patients With Myotonic Dystrophy. *Gastroenterology*, 86(6), 1469–1474. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(84\)80160-2](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(84)80160-2)
- Hammer, J. A., & Sellers, J. R. (2012). Walking to work: Roles for class v myosins as cargo transporters. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 13, Issue 1, pp. 13–26). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm3248>
- Han, H., Irimia, M., Ross, P. J., Sung, H. K., Alipanahi, B., David, L., Golipour, A., Gabut, M., Michael, I. P., Nachman, E. N., Wang, E., Trcka, D., Thompson, T., O'Hanlon, D., Slobodeniuc, V., Barbosa-Morais, N. L., Burge, C. B., Moffat, J., Frey, B. J., ... Blencowe, B. J. (2013). MBNL proteins repress ES-cell-specific alternative splicing and reprogramming. *Nature*, 498(7453), 241–245. <https://doi.org/10.1038/nature12270>
- Han, S., Nam, J., Li, Y., Kim, S., Cho, S. H., Cho, Y. S., Choi, S. Y., Choi, J., Han, K., Kim, Y., Na, M., Kim, H., Bae, Y. C., Choi, S. Y., & Kim, E. (2010). Regulation of dendritic spines, spatial memory, and embryonic development by the TANC family of PSD-95-interacting proteins. *Journal of Neuroscience*, 30(45), 15102–15112.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3128-10.2010>
- Hao, M., Akrami, K., Wei, K., De Diego, C., Che, N., Ku, J.-H. H., Tidball, J., Graves, M. C., Shieh, P. B., & Chen, F. (2008). Muscleblind-like 2 (Mbnl2) -deficient mice as a model for myotonic dystrophy. *Developmental Dynamics*, 237(2), 403–410.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.21428>
- Harley, H. G., Rundle, S. A., MacMillan, J. C., Myring, J., Brook, J. D., Crow, S., Reardon, W., Fenton, I., Shaw, D. J., & Harper, P. S. (1993). Size of the unstable CTG repeat sequence in relation to phenotype and parental transmission in myotonic dystrophy. *American Journal of Human Genetics*, 52(6), 1164–1174.
- Harmon, E. B., Harmon, M. L., Larsen, T. D., Paulson, A. F., & Perryman, M. B. (2008). Myotonic dystrophy protein kinase is expressed in embryonic myocytes and is required for myotube formation. *Developmental Dynamics*, 237(9), 2353–2366.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.21653>
- Harmon, E. B., Harmon, M. L., Larsen, T. D., Yang, J., Glasford, J. W., & Perryman, M. B. (2011). Myotonic dystrophy protein kinase is critical for nuclear envelope integrity. *Journal of Biological Chemistry*, 286(46), 40296–40306. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.241455>
- Harper. (2001). Myotonic dystrophy, 3rd edition. In *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*.
<https://doi.org/10.1136/jnnp.72.3.422-a>

- Hart, P. C., Mao, M., De Abreu, A. L. P., Ansenberger-Fricano, K., Ekoue, D. N., Ganini, D., Kajdacsy-Balla, A., Diamond, A. M., Minshall, R. D., Consolaro, M. E. L., Santos, J. H., & Bonini, M. G. (2015). MnSOD upregulation sustains the Warburg effect via mitochondrial ROS and AMPK-dependent signalling in cancer. *Nature Communications*, *6*, 6053. <https://doi.org/10.1038/ncomms7053>
- Harvey, J. C., Sherbourne, D. H., & Siegel, C. I. (1965). Smooth muscle involvement in myotonic dystrophy. *The American Journal of Medicine*, *39*(1), 81–90. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(65\)90247-0](https://doi.org/10.1016/0002-9343(65)90247-0)
- Hashem, V. I., & Sinden, R. R. (2002). Chemotherapeutically induced deletion of expanded triplet repeats. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *508*(1–2), 107–119. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(02\)00190-2](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(02)00190-2)
- Hasuike, Y., Mochizuki, H., & Nakamori, M. (2022). Cellular Senescence and Aging in Myotonic Dystrophy. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 4, p. 2339). <https://doi.org/10.3390/ijms23042339>
- Heasley, L. E., & Winn, R. A. (2008). Analysis of Wnt7a-stimulated JNK activity and cJun phosphorylation in non-small cell lung cancer cells. *Methods in Molecular Biology*, *468*, 187–196. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-249-6_14
- Henderson, C. E., Phillips, H. S., Pollock, R. A., Davies, A. M., Lemeulle, C., Armanini, M., Simpson, L. C., Moffet, B., Vandlen, R. A., Koliatsos, V. E., & Rosenthal, A. (1994). GDNF: A potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science*, *266*(5187), 1062–1064. <https://doi.org/10.1126/science.7973664>
- Henriquez, J. P., Webb, A., Bence, M., Bildsoe, H., Sahores, M., Hughes, S. M., & Salinas, P. C. (2008). Wnt signaling promotes AChR aggregation at the neuromuscular synapse in collaboration with agrin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(48), 18812–18817. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806300105>
- Hernández-Hernández, O., Guiraud-Dogan, C., Sicot, G., Huguet, A., Luillier, S., Steidl, E., Saenger, S., Marciniak, E., Obriot, H., Chevarin, C., Nicole, A., Revillod, L., Charizanis, K., Lee, K. Y., Suzuki, Y., Kimura, T., Matsuura, T., Cisneros, B., Swanson, M. S., ... Gomes-Pereira, M. (2013). Myotonic dystrophy CTG expansion affects synaptic vesicle proteins, neurotransmission and mouse behaviour. *Brain*, *136*(3), 957–970. <https://doi.org/10.1093/brain/aws367>
- Heumann, R., Korsching, S., Bandtlow, C., & Thoenen, H. (1987). Changes of nerve growth factor synthesis in nonneuronal cells in response to sciatic nerve transection. *Journal of Cell Biology*, *104*(6), 1623–1631. <https://doi.org/10.1083/jcb.104.6.1623>
- Hilbert, J. E., Barohn, R. J., Clemens, P. R., Luebke, E. A., Martens, W. B., McDermott, M. P., Parkhill, A. L., Tawil, R., Thornton, C. A., & Moxley, R. T. (2017). High frequency of gastrointestinal manifestations in myotonic dystrophy type 1 and type 2. *Neurology*, *89*(13), 1348–1354. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004420>
- Hildebrandt, R. P., Moss, K. R., Janusz-kaminska, A., Knudson, L. A., Denes, L. T., Saxena, T., Boggupalli, D. P., Li, Z., Lin, K., Bassell, G. J., & Wang, E. T. (2022). *Muscleblind-like proteins use modular domains to localize RNAs by riding kinesins and docking to membranes*.
- Hino, S. I., Kondo, S., Sekiya, H., Saito, A., Kanemoto, S., Murakami, T., Chihara, K., Aoki, Y., Nakamori, M., Takahashi, M. P., & Imaizumi, K. (2007). Molecular mechanisms responsible for aberrant splicing of SERCA1 in myotonic dystrophy type 1. *Human Molecular Genetics*, *16*(23), 2834–2843. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm239>
- Hirokawa, N., Niwa, S., & Tanaka, Y. (2010). Molecular motors in neurons: Transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. In *Neuron* (Vol. 68, Issue 4, pp. 610–638). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.039>

- Hirokawa, N., Sato-Yoshitake, R., Yoshida, T., & Kawashima, T. (1990). Brain dynein (MAP1C) localizes on both anterogradely and retrogradely transported membranous organelles in vivo. *Journal of Cell Biology*, *111*(3), 1027–1037. <https://doi.org/10.1083/jcb.111.3.1027>
- Ho, T. H., Bundman, D., Armstrong, D. L., & Cooper, T. A. (2005). Transgenic mice expressing CUG-BP1 reproduce splicing mis-regulation observed in myotonic dystrophy. *Human Molecular Genetics*, *14*(11), 1539–1547. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi162>
- Ho, T. H., Charlet-B, N., Poulos, M. G., Singh, G., Swanson, M. S., & Cooper, T. A. (2004). Muscleblind proteins regulate alternative splicing. *EMBO Journal*, *23*(15), 3103–3112. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600300>
- Ho, T. H., Savkur, R. S., Poulos, M. G., Mancini, M. A., Swanson, M. S., & Cooper, T. A. (2005). Colocalization of muscleblind with RNA foci is separable from mis-regulation of alternative splicing in myotonic dystrophy. *Journal of Cell Science*, *118*(13), 2923–2933. <https://doi.org/10.1242/jcs.02404>
- Hoch, W., Ferns, M., Campanelli, J. T., Hall, Z. W., & Scheller, R. H. (1993). Developmental regulation of highly active alternatively spliced forms of agrin. *Neuron*, *11*(3), 479–490. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90152-H](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90152-H)
- Holt, I., Jacquemin, V., Fardaei, M., Sewry, C. A., Butler-Browne, G. S., Furling, D., Brook, J. D., & Morris, G. E. (2009). Muscleblind-like proteins: Similarities and differences in normal and myotonic dystrophy muscle. *American Journal of Pathology*, *174*(1), 216–227. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080520>
- Horrigan, J., Gomes, T. B., Snape, M., Nikolenko, N., McMorn, A., Evans, S., Yaroshinsky, A., Della Pasqua, O., Oosterholt, S., & Lochmüller, H. (2020). A Phase 2 Study of AMO-02 (Tideglusib) in Congenital and Childhood-Onset Myotonic Dystrophy Type 1 (DM1). *Pediatric Neurology*, *112*, 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2020.08.001>
- Houseley, J. M., Garcia-Casado, Z., Pascual, M., Paricio, N., O'Dell, K. M. C., Monckton, D. G., & Artero, R. D. (2006). Noncanonical RNAs from transcripts of the *Drosophila* muscleblind gene. *Journal of Heredity*, *97*(3), 253–260. <https://doi.org/10.1093/jhered/esj037>
- Höweler, C. J., Busch, H. F. M., Geraedts, J. P. M., Niermeijer, M. F., & Staal, A. (1989). Anticipation in myotonic dystrophy: Fact or fiction? *Brain*, *112*(3), 779–797. <https://doi.org/10.1093/brain/112.3.779>
- Hsiao, K. M., Chen, S. S., Li, S. Y., Chiang, S. Y., Lin, H. M., Pan, H., Huang, C. C., Kuo, H. C., Jou, S. B., Su, C. C., Ro, L. S., Liu, C. S., Lo, M. C., Chen, C. M., & Lin, C. C. (2003). Epidemiological and genetic studies of myotonic dystrophy type 1 in Taiwan. *Neuroepidemiology*, *22*(5), 283–289. <https://doi.org/10.1159/000071191>
- Hsieh, W. C., Bahal, R., Thadke, S. A., Bhatt, K., Sobczak, K., Thornton, C., & Ly, D. H. (2018). Design of a “mini” Nucleic Acid Probe for Cooperative Binding of an RNA-Repeated Transcript Associated with Myotonic Dystrophy Type 1. *Biochemistry*, *57*(6), 907–911. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01239>
- Hudson, A. J., Ebers, G. C., & Bulman, D. E. (1995). The skeletal muscle sodium and chloride channel diseases. In *Brain* (Vol. 118, Issue 2, pp. 547–563). Oxford Academic. <https://doi.org/10.1093/brain/118.2.547>
- Huguet, A., Medja, F., Nicole, A., Vignaud, A., Guiraud-Dogan, C., Ferry, A., Decostre, V., Hogrel, J. Y., Metzger, F., Hoeflich, A., Baraibar, M., Gomes-Pereira, M., Puymirat, J., Bassez, G., Furling, D., Munnich, A., & Gourdon, G. (2012). Molecular, Physiological, and Motor Performance Defects in DMSXL Mice Carrying >1,000 CTG Repeats from the Human DM1 Locus. *PLoS Genetics*, *8*(11), e1003043. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003043>
- Hunter, A., Tsilfidis, C., Mettler, G., Jacob, P., Mahadevan, M., Surh, L., & Korneluk, R. (1992).

- The correlation of age of onset with CTG trinucleotide repeat amplification in myotonic dystrophy. *Journal of Medical Genetics*, 29(11), 774–779.
<https://doi.org/10.1136/jmg.29.11.774>
- Huxley, H. E. (1964). Evidence for continuity between the central elements of the triads and extracellular space in frog sartorius muscle. *Nature*, 202(4937), 1067–1071.
<https://doi.org/10.1038/2021067b0>
- Huxley, H. E. (1969). The mechanism of muscular contraction. *Science*, 164(3886), 1356–1366.
<https://doi.org/10.1126/science.164.3886.1356>
- Ikezoe, K., Nakamori, M., Furuya, H., Arahata, H., Kanemoto, S., Kimura, T., Imaizumi, K., Takahashi, M. P., Sakoda, S., Fujii, N., & Kira, J. I. (2007). Endoplasmic reticulum stress in myotonic dystrophy type 1 muscle. *Acta Neuropathologica*, 114(5), 527–535.
<https://doi.org/10.1007/s00401-007-0267-9>
- Ito, K., & Enomoto, H. (2016). Retrograde transport of neurotrophic factor signaling: implications in neuronal development and pathogenesis. *Journal of Biochemistry*, 160(2), 77–85.
<https://doi.org/10.1093/JPB/MVW037>
- Itoh, K., Mitani, M., Kawamoto, K., Futamura, N., Funakawa, I., Jinnai, K., & Fushiki, S. (2010). Neuropathology does not correlate with regional differences in the extent of expansion of CTG repeats in the brain with myotonic dystrophy type 1. *Acta Histochemica et Cytochemica*, 43(6), 149–156. <https://doi.org/10.1267/ahc.10019>
- Ivanhoe, C. B., & Reistetter, T. A. (2004). Spasticity: The misunderstood part of the upper motor neuron syndrome. *American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation*, 83(10 SUPPL.), S3–S9. <https://doi.org/10.1097/01.PHM.0000141125.28611.3E>
- Jacobson, S., & Marcus, E. M. (2008). Neuroanatomy for the neuroscientist. In *Neuroanatomy for the Neuroscientist*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-70971-0>
- Jauvin, D., Chrétien, J., Pandey, S. K., Martineau, L., Revillod, L., Bassez, G., Lachon, A., McLeod, A. R., Gourdon, G., Wheeler, T. M., Thornton, C. A., Bennett, C. F., & Puymirat, J. (2017). Targeting DMPK with Antisense Oligonucleotide Improves Muscle Strength in Myotonic Dystrophy Type 1 Mice. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 7, 465–474.
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.05.007>
- Jaworski, A., & Tessier-Lavigne, M. (2012). Autocrine/juxtacrine regulation of axon fasciculation by Slit-Robo signaling. *Nature Neuroscience*, 15(3), 367–369.
<https://doi.org/10.1038/nn.3037>
- Jiang, H., Mankodi, A., Swanson, M. S., Moxley, R. T., & Thornton, C. A. (2004). Myotonic dystrophy type 1 is associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of muscleblind proteins and deregulated alternative splicing in neurons. *Human Molecular Genetics*, 13(24), 3079–3088. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh327>
- Jiménez-Moreno, A. C., Raaphorst, J., Babić, H., Wood, L., van Engelen, B., Lochmüller, H., Schoser, B., & Wenninger, S. (2018). Falls and resulting fractures in Myotonic Dystrophy: Results from a multinational retrospective survey. *Neuromuscular Disorders*, 28(3), 229–235.
<https://doi.org/10.1016/j.nmd.2017.12.010>
- Johnson, K., Shelbourne, P., Davies, J., Buxton, J., Nimmo, E., Siciliano, M. J., Bachinski, L. L., Anvret, M., Harley, H., Rundle, S., Miki, T., Brunner, H., & Williamson, R. (1990). A new polymorphic probe which defines the region of chromosome 19 containing the myotonic dystrophy locus. *American Journal of Human Genetics*, 46(6), 1073–1081.
- Johnson, N. E., Butterfield, R. J., Mayne, K., Newcomb, T., Imburgia, C., Dunn, D., Duval, B., Feldkamp, M. L., & Weiss, R. B. (2021). Population-Based Prevalence of Myotonic Dystrophy Type 1 Using Genetic Analysis of Statewide Blood Screening Program. *Neurology*, 96(7), e1045–e1053. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000011425>

- Jones, K., Wei, C., Iakova, P., Bugiardini, E., Schneider-Gold, C., Meola, G., Woodgett, J., Killian, J., Timchenko, N. A., & Timchenko, L. T. (2012). GSK3 β mediates muscle pathology in myotonic dystrophy. *Journal of Clinical Investigation*, *122*(12), 4461–4472. <https://doi.org/10.1172/JCI64081>
- Jones, K., Wei, C., Schoser, B., Meola, G., Timchenko, N., & Timchenko, L. (2015). Reduction of toxic RNAs in myotonic dystrophies type 1 and type 2 by the RNA helicase p68/DDX5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(26), 8041–8045. <https://doi.org/10.1073/pnas.1422273112>
- Jones, R. A., Harrison, C., Eaton, S. L., Llaverro Hurtado, M., Graham, L. C., Alkhamash, L., Oladiran, O. A., Gale, A., Lamont, D. J., Simpson, H., Simmen, M. W., Soeller, C., Wishart, T. M., & Gillingwater, T. H. (2017). Cellular and Molecular Anatomy of the Human Neuromuscular Junction. *Cell Reports*, *21*(9), 2348–2356. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.008>
- Kahn, A. J., & Sandow, A. (1950). The potentiation of muscular contraction by the nitrate-ion. *Science*, *112*(2918), 647–649. <https://doi.org/10.1126/science.112.2918.647>
- Kalsotra, A., Singh, R. K., Gurha, P., Ward, A. J., Creighton, C. J., & Cooper, T. A. (2014). The Mef2 transcription network is disrupted in myotonic dystrophy heart tissue, dramatically altering miRNA and mRNA expression. *Cell Reports*, *6*(2), 336–345. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.025>
- Kalsotra, A., Xiao, X., Ward, A. J., Castle, J. C., Johnson, J. M., Burge, C. B., & Cooper, T. A. (2008). A postnatal switch of CELF and MBNL proteins reprograms alternative splicing in the developing heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(51), 20333–20338. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809045105>
- Kaminsky, P., Lesesve, J. F., Jonveaux, P., & Pruna, L. (2011). IgG deficiency and expansion of CTG repeats in myotonic dystrophy. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, *113*(6), 464–468. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2011.02.003>
- Kanadia, R. N., Johnstone, K. A., Mankodi, A., Lungu, C., Thornton, C. A., Esson, D., Timmers, A. M., Hauswirth, W. W., & Swanson, M. S. (2003). A Muscleblind Knockout Model for Myotonic Dystrophy. *Science*, *302*(5652), 1978–1980. <https://doi.org/10.1126/science.1088583>
- Kanadia, R. N., Shin, J., Yuan, Y., Beattie, S. G., Wheeler, T. M., Thornton, C. A., & Swanson, M. S. (2006). Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscleblind overexpression in a mouse poly(CUG) model for myotonic dystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(31), 11748–11753. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604970103>
- Kanadia, R. N., Urbinati, C. R., Crusselle, V. J., Luo, D., Lee, Y. J., Harrison, J. K., Oh, S. P., & Swanson, M. S. (2003). Developmental expression of mouse muscleblind genes Mbnl1, Mbnl2 and Mbnl3. *Gene Expression Patterns*, *3*(4), 459–462. [https://doi.org/10.1016/S1567-133X\(03\)00064-4](https://doi.org/10.1016/S1567-133X(03)00064-4)
- Kanai, Y., Dohmae, N., & Hirokawa, N. (2004). Kinesin transports RNA: Isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron*, *43*(4), 513–525. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.07.022>
- Kang, H., Tian, L., Mikesh, M., Lichtman, J. W., & Thompson, W. J. (2014). Terminal schwann cells participate in neuromuscular synapse remodeling during reinnervation following nerve injury. *Journal of Neuroscience*, *34*(18), 6323–6333. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4673-13.2014>
- Kania, A. (2014). *Spinal Motor Neuron Migration and the Significance of Topographic Organization in the Nervous System* (pp. 133–148). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7687-6_8

- Katagiri, T., & Watabe, T. (2016). Bone morphogenetic proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021899>
- Keller-Peck, C. R., Feng, G., Sanes, J. R., Yan, Q., Lichtman, J. W., & Snider, W. D. (2001). Glial cell line-derived neurotrophic factor administration in postnatal life results in motor unit enlargement and continuous synaptic remodeling at the neuromuscular junction. *Journal of Neuroscience*, 21(16), 6136–6146. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-16-06136.2001>
- Kelley, K. W., Ben Haim, L., Schirmer, L., Tyzack, G. E., Tolman, M., Miller, J. G., Tsai, H. H., Chang, S. M., Molofsky, A. V., Yang, Y., Patani, R., Lakatos, A., Ullian, E. M., & Rowitch, D. H. (2018). Kir4.1-Dependent Astrocyte-Fast Motor Neuron Interactions Are Required for Peak Strength. *Neuron*, 98(2), 306-319.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.03.010>
- Khakh, B. S., & McCarthy, K. D. (2015). Astrocyte calcium signaling: From observations to functions and the challenges therein. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(4), a020404. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020404>
- Khan, M. M., Lustrino, D., Silveira, W. A., Wild, F., Straka, T., Issop, Y., O'Connor, E., Cox, D., Reischl, M., Marquardt, T., Labeit, D., Labeit, S., Benoit, E., Molgó, J., Lochmüller, H., Witzemann, V., Kettelhut, I. C., Navegantes, L. C. C., Pozzan, T., & Rudolf, R. (2016). Sympathetic innervation controls homeostasis of neuromuscular junctions in health and disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(3), 746–750. <https://doi.org/10.1073/pnas.1524272113>
- Khvorova, A., & Watts, J. K. (2017). The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. *Nature Biotechnology*, 35(3), 238–248. <https://doi.org/10.1038/nbt.3765>
- Kierdorf, K., & Prinz, M. (2017). Microglia in steady state. *Journal of Clinical Investigation*, 127(9), 3201–3209. <https://doi.org/10.1172/JCI90602>
- Kiliszek, A., Kierzek, R., Krzyzosiak, W. J., & Rypniewski, W. (2009). Structural insights into CUG repeats containing the “stretched U-U wobble”: Implications for myotonic dystrophy. *Nucleic Acids Research*, 37(12), 4149–4156. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp350>
- Kiliszek, A., Kierzek, R., Krzyzosiak, W. J., & Rypniewski, W. (2011). Crystal structures of CGG RNA repeats with implications for fragile X-associated tremor ataxia syndrome. *Nucleic Acids Research*, 39(16), 7308–7315. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr368>
- Kim, D. H., Langlois, M. A., Lee, K. B., Riggs, A. D., Puymirat, J., & Rossi, J. J. (2005). HnRNP H inhibits nuclear export of mRNA containing expanded CUG repeats and a distal branch point sequence. *Nucleic Acids Research*, 33(12), 3866–3874. <https://doi.org/10.1093/nar/gki698>
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., & Guan, K. L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biology*, 13(2), 132–141. <https://doi.org/10.1038/ncb2152>
- Kimura, T., Nakamori, M., Lueck, J. D., Pouliquin, P., Aoike, F., Fujimura, H., Dirksen, R. T., Takahashi, M. P., Dulhunty, A. F., & Sakoda, S. (2005). Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in myotonic dystrophy type 1. *Human Molecular Genetics*, 14(15), 2189–2200. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi223>
- Kimura, T., & Saito, T. (2011). Myotonic dystrophy type 2. *Brain and Nerve*, 63(11), 1151–1160. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000054481.84978.f9>
- Kino, Y., Daisuke, M., Oma, Y., Takeshita, Y., Sasagawa, N., & Ishiura, S. (2004). Muscleblind protein, MBNL1/EXP, binds specifically to CHHG repeats. *Human Molecular Genetics*, 13(5), 495–507. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh056>
- Kino, Y., Washizu, C., Kurosawa, M., Oma, Y., Hattori, N., Ishiura, S., & Nukina, N. (2015). Nuclear localization of MBNL1: Splicing-mediated autoregulation and repression of repeat-

- derived aberrant proteins. *Human Molecular Genetics*, 24(3), 740–756.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddu492>
- Kino, Y., Washizu, C., Oma, Y., Onishi, H., Nezu, Y., Sasagawa, N., Nukina, N., & Ishiura, S. (2009). MBNL and CELF proteins regulate alternative splicing of the skeletal muscle chloride channel CLCN1. *Nucleic Acids Research*, 37(19), 6477–6490.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkp681>
- Kiuchi, A., Otsuka, N., Namba, Y., Nakano, I., & Tomonaga, M. (1991). Presenile appearance of abundant Alzheimer's neurofibrillary tangles without senile plaques in the brain in myotonic dystrophy. *Acta Neuropathologica*, 82(1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/BF00310916>
- Klein, A. F., Gasnier, E., & Furling, D. (2011). Gain of RNA function in pathological cases: Focus on myotonic dystrophy. In *Biochimie* (Vol. 93, Issue 11, pp. 2006–2012). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.06.028>
- Klein, A. F., Varela, M. A., Arandel, L., Holland, A., Naouar, N., Arzumanov, A., Seoane, D., Revillod, L., Bassez, G., Ferry, A., Jauvin, D., Gourdon, G., Puymirat, J., Gait, M. J., Furling, D., & Wood, M. J. A. (2019). Peptide-conjugated oligonucleotides evoke long-lasting myotonic dystrophy correction in patient-derived cells and mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 129(11), 4739–4744. <https://doi.org/10.1172/JCI128205>
- Klesert, T. R., Cho, D. H., Clark, J. I., Maylie, J., Adelman, J., Snider, L., Yuen, E. C., Soriano, P., & Tapscott, S. J. (2000). Mice deficient in Six5 develop cataracts: Implications for myotonic dystrophy. *Nature Genetics*, 25(1), 105–109. <https://doi.org/10.1038/75490>
- Klesert, T. R., Otten, A. D., Bird, T. D., & Tapscott, S. J. (1997). Trinucleotide repeat expansion at the myotonic dystrophy locus reduces expression of DMAHP. *Nature Genetics*, 16(4), 402–406. <https://doi.org/10.1038/ng0897-402>
- Klinck, R., Fourrier, A., Thibault, P., Toutant, J., Durand, M., Lapointe, E., Caillet-Boudin, M. L., Sergeant, N., Gourdon, G., Meola, G., Furling, D., Puymirat, J., & Chabot, B. (2014). RBFox1 cooperates with MBNL1 to control splicing in muscle, including events altered in myotonic dystrophy type 1. *PLoS ONE*, 9(9), 18–21.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107324>
- Koehorst, E., Núñez-manchón, J., Ballester-lópez, A., Almendrote, M., Lucente, G., Arbex, A., Chojnacki, J., Vázquez-manrique, R. P., Gómez-escibano, A. P., Pintos-morell, G., Collcantí, J., Ramos-fransi, A., Martínez-piñeiro, A., Suelves, M., & Nogales-gadea, G. (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).
<https://doi.org/10.3390/jcm10235520>
- Koelle, G. B., & Friedenwald, J. S. (1949). A Histochemical Method for Localizing Cholinesterase Activity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 70(4), 617–622.
<https://doi.org/10.3181/00379727-70-17013>
- Koenig, J., & Vigny, M. (1978). Neural induction of the 16S acetylcholinesterase in muscle cell cultures. *Nature*, 271(5640), 75–77. <https://doi.org/10.1038/271075a0>
- Kolodkin, A. L., & Pasterkamp, R. J. (2013). SnapShot: Axon guidance II. *Cell*, 153(3), 722–722.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.004>
- Kolodkin, A. L., & Tessier-Lavigne, M. (2011). Mechanisms and molecules of neuronal wiring: A primer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(6), 1–14.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001727>
- Komiya, Y., & Habas, R. (2008). *Wnt signal transduction pathways*. 4(2), 68–75.
www.landesbioscience.com
- Kong, X. C., Barzaghi, P., & Rugg, M. A. (2004). Inhibition of synapse assembly in mammalian muscle in vivo by RNA interference. *EMBO Reports*, 5(2), 183–188.

- <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400065>
- Konieczny, P., Stepniak-Konieczna, E., & Sobczak, K. (2014). MBNL proteins and their target RNAs, interaction and splicing regulation. *Nucleic Acids Research*, *42*(17), 10873–10887. <https://doi.org/10.1093/nar/gku767>
- Konieczny, P., Stepniak-Konieczna, E., Taylor, K., Sznajder, L. J., & Sobczak, K. (2017). Autoregulation of MBNL1 function by exon 1 exclusion from MBNL1 transcript. *Nucleic Acids Research*, *45*(4), 1760–1775. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1158>
- Kornblum, C., Reul, J., Kress, W., Grothe, C., Amanatidis, N., Klockgether, T., & Schröder, R. (2004). Cranial magnetic resonance imaging in genetically proven myotonic dystrophy type 1 and 2. *Journal of Neurology*, *251*(6), 710–714. <https://doi.org/10.1007/s00415-004-0408-1>
- Koshelev, M., Sarma, S., Price, R. E., Wehrens, X. H. T., & Cooper, T. A. (2010). Heart-specific overexpression of CUGBP1 reproduces functional and molecular abnormalities of myotonic dystrophy type 1. *Human Molecular Genetics*, *19*(6), 1066–1075. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp570>
- Krejci, E., Martinez-Pena Y Valenzuela, I., Ameziane, R., & Akaaboune, M. (2006). Acetylcholinesterase dynamics at the neuromuscular junction of live animals. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(15), 10347–10354. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507502200>
- Krishnan, A. V., & Kiernan, M. C. (2006). Axonal function and activity-dependent excitability changes in myotonic dystrophy. *Muscle and Nerve*, *33*(5), 627–636. <https://doi.org/10.1002/mus.20516>
- Krol, J., Fiszler, A., Mykowska, A., Sobczak, K., de Mezer, M., & Krzyzosiak, W. J. (2007). Ribonuclease Dicer Cleaves Triplet Repeat Hairpins into Shorter Repeats that Silence Specific Targets. *Molecular Cell*, *25*(4), 575–586. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.01.031>
- Kumar, A., Agarwal, S., & Pradhan, S. (2014). Assessment of premutation in myotonic dystrophy type 1 affected family members by TP-PCR and genetic counseling. *Case Reports in Medicine*, *2014*. <https://doi.org/10.1155/2014/289643>
- Kummer, T. T., Misgeld, T., & Sanes, J. R. (2006). Assembly of the postsynaptic membrane at the neuromuscular junction: Paradigm lost. *Current Opinion in Neurobiology*, *16*(1), 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.12.003>
- Kuyumcu-Martinez, N. M., Wang, G. S., & Cooper, T. A. (2007). Increased Steady-State Levels of CUGBP1 in Myotonic Dystrophy 1 Are Due to PKC-Mediated Hyperphosphorylation. *Molecular Cell*, *28*(1), 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.07.027>
- La Cognata, V., Iemmolo, R., D'Agata, V., Scuderi, S., Drago, F., Zappia, M., & Cavallaro, S. (2014). Increasing the Coding Potential of Genomes Through Alternative Splicing: The Case of PARK2 Gene. *Current Genomics*, *15*(3), 203–216. <https://doi.org/10.2174/1389202915666140426003342>
- Laforce, R. J., Dallaire-Thérroux, C., Racine, A. M., Dent, G., Salinas-Valenzuela, C., Poulin, E., Cayer, A. M., Bédard-Tremblay, D., Rouleau-Bonenfant, T., St-Onge, F., Schraen-Maschke, S., Beauregard, J. M., Sergeant, N., & Puymirat, J. (2022). Tau positron emission tomography, cerebrospinal fluid and plasma biomarkers of neurodegeneration, and neurocognitive testing: an exploratory study of participants with myotonic dystrophy type 1. *Journal of Neurology*, *269*(7), 3579–3587. <https://doi.org/10.1007/s00415-022-10970-x>
- Lambert, N., Robertson, A., Jangi, M., McGeary, S., Sharp, P. A., & Burge, C. B. (2014). RNA Bind-n-Seq: Quantitative Assessment of the Sequence and Structural Binding Specificity of RNA Binding Proteins. *Molecular Cell*, *54*(5), 887–900. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.04.016>
- Landmesser, L. T. (2001). The acquisition of motoneuron subtype identity and motor circuit

- formation. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 19(2), 175–182.
[https://doi.org/10.1016/S0736-5748\(00\)00090-3](https://doi.org/10.1016/S0736-5748(00)00090-3)
- Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149(2), 274–293. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017>
- Laurent, F. X., Sureau, A., Klein, A. F., Trouslard, F., Gasnier, E., Furling, D., & Marie, J. (2012). New function for the RNA helicase p68/DDX5 as a modifier of MBNL1 activity on expanded CUG repeats. *Nucleic Acids Research*, 40(7), 3159–3171.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkr1228>
- Lavedan, C., Hofmann-Radvanyi, H., Shelbourne, P., Rabes, J. P., Duros, C., Savoy, D., Dehaupas, I., Luce, S., Johnson, K., & Junien, C. (1993). Myotonic dystrophy: Size- and sex-dependent dynamics of CTG meiotic instability, and somatic mosaicism. *American Journal of Human Genetics*, 52(5), 875–883.
- Lee, Y. Il, Li, Y., Mikesh, M., Smith, I., Nave, K. A., Schwab, M. H., & Thompson, W. J. (2016). Neuregulin1 displayed on motor axons regulates terminal Schwann cell-mediated synapse elimination at developing neuromuscular junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(4), E479–E487.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1519156113>
- Lee, K.-Y., Seah, C., Li, C., Chen, Y.-F., Chen, C.-Y., Wu, C.-I., Liao, P.-C., Shyu, Y.-C., Olafson, H. R., McKee, K. K., Wang, E. T., Yeh, C.-H., & Wang, C.-H. (2022). Mice lacking MBNL1 and MBNL2 exhibit sudden cardiac death and molecular signatures recapitulating myotonic dystrophy. *Human Molecular Genetics*, 5–6. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddac108>
- Lee, K. Y., Chang, H. C., Seah, C., & Lee, L. J. (2019). Deprivation of Muscleblind-Like Proteins Causes Deficits in Cortical Neuron Distribution and Morphological Changes in Dendritic Spines and Postsynaptic Densities. *Frontiers in Neuroanatomy*, 13, 75.
<https://doi.org/10.3389/fnana.2019.00075>
- Lee, K. Y., Li, M., Manchanda, M., Batra, R., Charizanis, K., Mohan, A., Warren, S. A., Chamberlain, C. M., Finn, D., Hong, H., Ashraf, H., Kasahara, H., Ranum, L. P. W., & Swanson, M. S. (2013). Compound loss of muscleblind-like function in myotonic dystrophy. *EMBO Molecular Medicine*, 5(12), 1887–1900. <https://doi.org/10.1002/emmm.201303275>
- Lee, M. M., Pushechnikov, A., & Disney, M. D. (2009). Rational and modular design of potent ligands targeting the RNA that causes myotonic dystrophy 2. *ACS Chemical Biology*, 4(5), 345–355. <https://doi.org/10.1021/cb900025w>
- Lee, S., Lee, B., Lee, J. W., & Lee, S. K. (2009). Retinoid Signaling and Neurogenin2 Function Are Coupled for the Specification of Spinal Motor Neurons through a Chromatin Modifier CBP. *Neuron*, 62(5), 641–654. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.04.025>
- Leroy, O., Dhaenens, C. M., Schraen-Maschke, S., Belarbi, K., Delacourte, A., Andreadis, A., Sablonnière, B., Buée, L., Sergeant, N., & Caillet-Boudin, M. L. (2006). ETR-3 represses Tau exons 2/3 inclusion, a splicing event abnormally enhanced in myotonic dystrophy type I. *Journal of Neuroscience Research*, 84(4), 852–859. <https://doi.org/10.1002/jnr.20980>
- Lewis, C. J. T., Pan, T., & Kalsotra, A. (2017). RNA modifications and structures cooperate to guide RNA-protein interactions. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 18, Issue 3, pp. 202–210). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.163>
- Leyburn, P., & Walton, J. N. (1959). The treatment of myotonia: A controlled clinical trial. *Brain*, 82(1), 81–91. <https://doi.org/10.1093/brain/82.1.81>
- Li, L., Cao, Y., Wu, H., Ye, X., Zhu, Z., Xing, G., Shen, C., Barik, A., Zhang, B., Xie, X., Zhi, W., Gan, L., Su, H., Xiong, W. C., & Mei, L. (2016). Enzymatic Activity of the Scaffold Protein Rapsyn for Synapse Formation. *Neuron*, 92(5), 1007–1019.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.10.023>

- Li, L., Zhou, J., James, G., Heller-Harrison, R., Czech, M. P., & Olson, E. N. (1992). FGF inactivates myogenic helix-loop-helix proteins through phosphorylation of a conserved protein kinase C site in their DNA-binding domains. *Cell*, *71*(7), 1181–1194. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(05\)80066-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(05)80066-2)
- Li, S., Czubryt, M. P., McAnally, J., Bassel-Duby, R., Richardson, J. A., Wiebel, F. F., Nordheim, A., & Olson, E. N. (2005). Requirement for serum response factor for skeletal muscle growth and maturation revealed by tissue-specific gene deletion in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(4), 1082–1087. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409103102>
- Li, X., Eastman, E. M., Schwartz, R. J., & Draghia-Akli, R. (1999). Synthetic muscle promoters: Activities exceeding naturally occurring regulatory sequences. *Nature Biotechnology*, *17*(3), 241–245. <https://doi.org/10.1038/6981>
- Li, X. M., Dong, X. P., Luo, S. W., Zhang, B., Lee, D. H., Ting, A. K. L., Neiswender, H., Kim, C. H., Carpenter-Hyland, E., Gao, T. M., Xiong, W. C., & Mei, L. (2008). Retrograde regulation of motoneuron differentiation by muscle β -catenin. *Nature Neuroscience*, *11*(3), 262–268. <https://doi.org/10.1038/nn2053>
- Liao, Y. C., Fernandopulle, M. S., Wang, G., Choi, H., Hao, L., Drerup, C. M., Patel, R., Qamar, S., Nixon-Abell, J., Shen, Y., Meadows, W., Vendruscolo, M., Knowles, T. P. J., Nelson, M., Czekalska, M. A., Musteikyte, G., Gachechiladze, M. A., Stephens, C. A., Pasolli, H. A., ... Ward, M. E. (2019). RNA Granules Hitchhike on Lysosomes for Long-Distance Transport, Using Annexin A11 as a Molecular Tether. *Cell*, *179*(1), 147–164.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.050>
- Lichtman, J. W., & Colman, H. (2000). Synapse elimination and indelible memory. In *Neuron* (Vol. 25, Issue 2, pp. 269–278). [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80893-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80893-4)
- Liddell, E. G. T., & Sherrington, C. S. (1925). Recruitment and some other features of reflex inhibition. In *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character* (Vol. 97, Issue 686). <https://doi.org/10.1098/rspb.1925.0016>
- Lin, W., Burgess, R. W., Dominguez, B., Pfaff, S. L., Sanes, J. R., & Lee, K. F. (2001). Distinct roles of nerve and muscle in postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse. *Nature*, *410*(6832), 1057–1064. <https://doi.org/10.1038/35074025>
- Lin, W., Dominguez, B., Yang, J., Aryal, P., Brandon, E. P., Gage, F. H., & Lee, K. F. (2005). Neurotransmitter acetylcholine negatively regulates neuromuscular synapse formation by a Cdk5-dependent mechanism. *Neuron*, *46*(4), 569–579. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.04.002>
- Lin, X., Miller, J. W., Mankodi, A., Kanadia, R. N., Yuan, Y., Moxley, R. T., Swanson, M. S., & Thornton, C. A. (2006). Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy. *Human Molecular Genetics*, *15*(13), 2087–2097. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl132>
- Lin, Y. L., Nhieu, J., Liu, P. Y., Le, G., Lee, D. J., Wei, C. W., Lin, Y. W., Oh, S. H., Lowe, D., & Wei, L. N. (2022). CRABP1-CaMKII-Agrn regulates the maintenance of neuromuscular junction in spinal motor neuron. *Cell Death and Differentiation*, February. <https://doi.org/10.1038/s41418-022-00959-4>
- Liquori, C. L., Ricker, K., Moseley, M. L., Jacobsen, J. F., Kress, W., Naylor, S. L., Day, J. W., & Ranum, L. P. W. (2001). Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron I of ZNF9. *Science*, *293*(5531), 864–867. <https://doi.org/10.1126/science.1062125>
- Liu, J., Guo, Z. N., Yan, X. L., Yang, Y., & Huang, S. (2021). Brain Pathogenesis and Potential Therapeutic Strategies in Myotonic Dystrophy Type 1. In *Frontiers in Aging Neuroscience* (Vol. 13, p. 755392). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.755392>

- Liu, J. P., Laufer, E., & Jessell, T. M. (2001). Assigning the positional identity of spinal motor neurons: Rostrocaudal patterning of Hox-c expression by FGFs, Gdf11, and retinoids. *Neuron*, *32*(6), 997–1012. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00544-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00544-X)
- Liu, Y., Padgett, D., Takahashi, M., Li, H., Sayeed, A., Teichert, R. W., Olivera, B. M., McArdle, J. J., Green, W. N., & Lin, W. (2008). Essential roles of the acetylcholine receptor γ -subunit in neuromuscular synaptic patterning. *Development*, *135*(11), 1957–1967. <https://doi.org/10.1242/dev.018119>
- Loro, E., Rinaldi, F., Malena, A., Masiero, E., Novelli, G., Angelini, C., Romeo, V., Sandri, M., Botta, A., & Vergani, L. (2010). Normal myogenesis and increased apoptosis in myotonic dystrophy type-1 muscle cells. *Cell Death and Differentiation*, *17*(8), 1315–1324. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.33>
- Lu, Q. R., Sun, T., Zhu, Z., Ma, N., Garcia, M., Stiles, C. D., & Rowitch, D. H. (2002). Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/oligodendrocyte connection. *Cell*, *109*(1), 75–86. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00678-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00678-5)
- Lunde, B. M., Moore, C., & Varani, G. (2007). RNA-binding proteins: Modular design for efficient function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *8*(6), 479–490. <https://doi.org/10.1038/nrm2178>
- Luo, Z. G., Wang, Q., Zhou, J. Z., Wang, J., Luo, Z., Liu, M., He, X., Wynshaw-Boris, A., Xiong, W. C., Lu, B., & Mei, L. (2002). Regulation of AChR clustering by Dishevelled interacting with MuSK and PAK1. *Neuron*, *35*(3), 489–505. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00783-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00783-3)
- Lye, R. J., Porter, M. E., Scholey, J. M., & McIntosh, J. R. (1987). Identification of a microtubule-based cytoplasmic motor in the nematode *C. elegans*. *Cell*, *51*(2), 309–318. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90157-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90157-7)
- Macdermot, V. (1961). The histology of the neuromuscular junction in dystrophia myotonica. *Brain*, *84*(1), 75–84. <https://doi.org/10.1093/brain/84.1.75>
- Machuca-Tzili, L. E., Buxton, S., Thorpe, A., Timson, C. M., Wigmore, P., Luther, P. K., & Brook, J. D. (2011). Zebrafish deficient for Muscleblind-like 2 exhibit features of myotonic dystrophy. *DMM Disease Models and Mechanisms*, *4*(3), 381–392. <https://doi.org/10.1242/dmm.004150>
- Macpherson, P., Kostrominova, T., Tang, H., & Goldman, D. (2002). Protein kinase C and calcium/calmodulin-activated protein kinase II (CaMK II) suppress nicotinic acetylcholine receptor gene expression in mammalian muscle. A specific role for CaMK II in activity-dependent gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(18), 15638–15646. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109864200>
- Maeda, M., Taft, C. S., Bush, E. W., Holder, E., Bailey, W. M., Neville, H., Perryman, M. B., & Bies, R. D. (1995). Identification, tissue-specific expression, and subcellular localization of the 80- and 71-kDa forms of myotonic dystrophy kinase protein. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(35), 20246–20249. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.35.20246>
- Mahadevan, M. S., Yadava, R. S., & Mandal, M. (2021). Cardiac pathology in myotonic dystrophy type 1. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 21). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms222111874>
- Mahadevan, M. S., Yadava, R. S., Yu, Q., Balijepalli, S., Frenzel-Mccardell, C. D., Bourne, T. D., & Phillips, L. H. (2006). Reversible model of RNA toxicity and cardiac conduction defects in myotonic dystrophy. *Nature Genetics*, *38*(9), 1066–1070. <https://doi.org/10.1038/ng1857>
- Mahadevan, M., Tsilfidis, C., Sabourin, L., Shutler, G., Amemiya, C., Jansen, G., Neville, C., Narang, M., Barceló, J., O'Hoy, K., Leblond, S., Earle-Macdonald, J., De Jong, P. J., Wieringa, B., & Korneluk, R. G. (1992). Myotonic dystrophy mutation: An unstable CTG

- repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science*, 255(5049), 1253–1255.
<https://doi.org/10.1126/science.1546325>
- Mankodi, A., Logigian, E., Callahan, L., McClain, C., White, R., Henderson, D., Krym, M., & Thornton, C. A. (2000). Myotonic Dystrophy in Transgenic Mice Expressing an Expanded CUG Repeat. *Science*, 289(5485), 1769–1772.
<https://doi.org/10.1126/science.289.5485.1769>
- Mankodi, A., Takahashi, M. P., Jiang, H., Beck, C. L., Bowers, W. J., Moxley, R. T., Cannon, S. C., & Thornton, C. A. (2002). Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of ClC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. *Molecular Cell*, 10(1), 35–44. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00563-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00563-4)
- Mankodi, A., Urbinati, C. R., Yuan, Q.-P., Moxley, R. T., Sansone, V., Krym, M., Henderson, D., Schalling, M., Swanson, M. S., & Thornton, C. A. (2001). Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2. *Human Molecular Genetics*, 10(19), 2165–2170. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.19.2165>
- Margolis, J. M., Schoser, B. G., Moseley, M. L., Day, J. W., & Ranum, L. P. W. (2006). DM2 intronic expansions: Evidence for CCUG accumulation without flanking sequence or effects on ZNF9 mRNA processing or protein expression. *Human Molecular Genetics*, 15(11), 1808–1815. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl103>
- Marteyn, A., Maury, Y., Gauthier, M. M., Lecuyer, C., Vernet, R., Denis, J. A., Pietu, G., Peschanski, M., & Martinat, C. (2011). Mutant Human Embryonic Stem Cells Reveal Neurite and Synapse Formation Defects in Type 1 Myotonic Dystrophy. *Cell Stem Cell*, 8(4), 434–444. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.02.004>
- Martinez-Pena y Valenzuela, I., Mouslim, C., Pires-Oliveira, M., Adams, M. E., Froehner, S. C., & Akaaboune, M. (2011). Nicotinic acetylcholine receptor stability at the NMJ deficient in α -syntrophin in vivo. *Journal of Neuroscience*, 31(43), 15586–15596.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4038-11.2011>
- Martinez-Pena Y Valenzuela, I., Pires-Oliveira, M., & Akaaboune, M. (2013). PKC and PKA regulate AChR dynamics at the neuromuscular junction of living mice. *PLoS ONE*, 8(11), e81311. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081311>
- Martorell, L., Johnson, K., Boucher, C. A., & Baiget, M. (1997). Somatic instability of the myotonic dystrophy (CTG)(n) repeat during human fetal development. *Human Molecular Genetics*, 6(6), 877–880. <https://doi.org/10.1093/hmg/6.6.877>
- Martorell, L., Monckton, D. G., Gamez, J., Johnson, K. J., Gich, I., Lopez De Munain, A., & Baiget, M. (1998). Progression of somatic CTG repeat length heterogeneity in the blood cells of myotonic dystrophy patients. *Human Molecular Genetics*, 7(2), 307–312.
<https://doi.org/10.1093/hmg/7.2.307>
- Martorell, L., Monckton, D. G., Sanchez, A., Lopez de Munain, A., & Baiget, M. (2001). Frequency and stability of the myotonic dystrophy type 1 premutation. *Neurology*, 56(3), 328–335. <https://doi.org/10.1212/WNL.56.3.328>
- Massa, R., Panico, M. B., Caldarola, S., Fusco, F. R., Sabatelli, P., Terracciano, C., Botta, A., Novelli, G., Bernardi, G., & Loreni, F. (2010). The myotonic dystrophy type 2 (DM2) gene product zinc finger protein 9 (ZNF9) is associated with sarcomeres and normally localized in DM2 patients' muscles. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 36(4), 275–284.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2010.01068.x>
- Masuda, A., Andersen, H. S., Doktor, T. K., Okamoto, T., Ito, M., Andresen, B. S., & Ohno, K. (2012). CUGBP1 and MBNL1 preferentially bind to 3' UTRs and facilitate mRNA decay. *Scientific Reports*, 2(1), 209. <https://doi.org/10.1038/srep00209>
- Mateos-Aierdi, A. J., Goicoechea, M., Aiastui, A., Torrón, R. F., Garcia-Puga, M., Matheu, A., &

- de Munain, A. L. (2015). Muscle wasting in myotonic dystrophies: A model of premature aging. In *Frontiers in Aging Neuroscience* (Vol. 7, Issue JUN, p. 125). Front Aging Neurosci. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00125>
- Mathieu, J., Allard, P., Potvin, L., Prévost, C., & Begin, P. (1999). A 10-year study of mortality in a cohort of patients with myotonic dystrophy. *Neurology*, *52*(8), 1658–1662. <https://doi.org/10.1212/wnl.52.8.1658>
- Mathieu, J., De Braekeleer, M., & Prévost, C. (1990). Genealogical reconstruction of myotonic dystrophy in the saguenay-lac-saint-jean area (Quebec, Canada). *Neurology*, *40*(5), 839–842. <https://doi.org/10.1212/wnl.40.5.839>
- Mattioli, C. C., Rom, A., Franke, V., Imami, K., Arrey, G., Terne, M., Woehler, A., Akalin, A., Ulitsky, I., & Chekulaeva, M. (2019). Alternative 3 UTRs direct localization of functionally diverse protein isoforms in neuronal compartments. *Nucleic Acids Research*, *47*(5), 2560–2573. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1270>
- Maurage, C. A., Udd, B., Ruchoux, M. M., Vermersch, P., Kalimo, H., Krahe, R., Delacourte, A., & Sergeant, N. (2005). Similar brain tau pathology in DM2/PROMM and DM1/Steinert disease. *Neurology*, *65*(10), 1636–1638. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000184585.93864.4e>
- McKinney, B. C., Sze, W., Lee, B., & Murphy, G. G. (2009). Impaired long-term potentiation and enhanced neuronal excitability in the amygdala of CaV1.3 knockout mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, *92*(4), 519–528. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2009.06.012>
- McMahan, U. J. (1990). The agrin hypothesis. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *55*, 407–418. <https://doi.org/10.1101/SQB.1990.055.01.041>
- McNally, E. M., Mann, D. L., Pinto, Y., Bhakta, D., Tomaselli, G., Nazarian, S., Groh, W. J., Tamura, T., Duboc, D., Itoh, H., Hellerstein, L., & Mammen, P. P. A. (2020). Clinical Care Recommendations for Cardiologists Treating Adults With Myotonic Dystrophy. *Journal of the American Heart Association*, *9*(4), e014006. <https://doi.org/10.1161/JAHA.119.014006>
- Mehler, M. F., Mabie, P. C., Zhang, D., & Kessler, J. A. (1997). Bone morphogenetic proteins in the nervous system. *Trends in Neurosciences*, *20*(7), 309–317. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(96\)01046-6](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(96)01046-6)
- Meola, G. (2020). Myotonic dystrophy type 2: The 2020 update. In *Acta Myologica* (Vol. 39, Issue 4, pp. 222–234). Pacini Editore. <https://doi.org/10.36185/2532-1900-026>
- Meola, G., & Cardani, R. (2015). Myotonic dystrophies : An update on clinical aspects , genetic , pathology , and molecular pathomechanisms. *BBA - Molecular Basis of Disease*, *1852*(4), 594–606. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.05.019>
- Meola, G., & Sansone, V. (1996). A newly-described myotonic disorder (proximal myotonic myopathy - PROMM): Personal experience and review of the literature. *Italian Journal of Neurological Sciences*, *17*(5), 347–353. <https://doi.org/10.1007/BF01999897>
- Messéant, J., Dobbertin, A., Girard, E., Delers, P., Manuel, M., Mangione, F., Schmitt, A., Le Denmat, D., Molgó, J., Zytnicki, D., Schaeffer, L., Legay, C., & Strochlic, L. (2015). Musk frizzled-like domain is critical for mammalian neuromuscular junction formation and maintenance. *Journal of Neuroscience*, *35*(12), 4926–4941. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3381-14.2015>
- Meyer, M., Matsuoka, I., Wetmore, C., Olson, L., & Thoenen, H. (1992). Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: Different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA. *Journal of Cell Biology*, *119*(1), 45–54. <https://doi.org/10.1083/jcb.119.1.45>
- Miller, J. N., Van Der Plas, E., Hamilton, M., Kosciuk, T. R., Gutmann, L., Cumming, S. A., Monckton, D. G., & Nopoulos, P. C. (2020). Variant repeats within the DMPK CTG expansion protect function in myotonic dystrophy type 1. *Neurology: Genetics*, *6*(5), e504.

<https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000504>

- Miller, J. W., Urbinati, C. R., Teng-Umnuay, P., Stenberg, M. G., Byrne, B. J., Thornton, C. A., & Swanson, M. S. (2000). Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)_n expansions associated with myotonic dystrophy. *EMBO Journal*, *19*(17), 4439–4448. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.17.4439>
- Minnerop, M., Gliem, C., & Kornblum, C. (2018). Current progress in CNS imaging of myotonic dystrophy. In *Frontiers in Neurology* (Vol. 9, Issue AUG, p. 646). Frontiers. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00646>
- Minocha, S., Valloton, D., Ypsilanti, A. R., Fiumelli, H., Allen, E. A., Yanagawa, Y., Marin, O., Chédotal, A., Hornung, J. P., & Lebrand, C. (2015). Nkx2.1-derived astrocytes and neurons together with Slit2 are indispensable for anterior commissure formation. *Nature Communications*, *6*(1), 6887. <https://doi.org/10.1038/ncomms7887>
- Misra, C., Bangru, S., Lin, F., Lam, K., Koenig, S. N., Lubbers, E. R., Hedhli, J., Murphy, N. P., Parker, D. J., Dobrucki, L. W., Cooper, T. A., Tajkhorshid, E., Mohler, P. J., & Kalsotra, A. (2020). Aberrant Expression of a Non-muscle RBFOX2 Isoform Triggers Cardiac Conduction Defects in Myotonic Dystrophy. *Developmental Cell*, *52*(6), 748–763.e6. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.01.037>
- Missias, A. C., Chu, G. C., Klocke, B. J., Sanes, J. R., & Merlie, J. P. (1996). Maturation of the acetylcholine receptor in skeletal muscle: Regulation of the AChR γ -to- ϵ switch. *Developmental Biology*, *179*(1), 223–238. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0253>
- Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y., & Unwin, N. (2003). Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature*, *423*(6943), 949–955. <https://doi.org/10.1038/nature01748>
- Mizuguchi, R., Sugimori, M., Takebayashi, H., Kosako, H., Nagao, M., Yoshida, S., Nabeshima, Y. I., Shimamura, K., & Nakafuku, M. (2001). Combinatorial roles of Olig2 and Neurogenin2 in the coordinated induction of pan-neuronal and subtype-specific properties of motoneurons. *Neuron*, *31*(5), 757–771. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00413-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00413-5)
- Monckton, D. G., & Caskey, C. T. (1995). Unstable triplet repeat diseases. *Circulation*, *91*(2), 513–520. <https://doi.org/10.1161/01.cir.91.2.513>
- Monckton, D. G., Coolbaugh, M. I., Ashizawa, K. T., Siciliano, M. J., & Caskey, C. T. (1997). Hypermutable myotonic dystrophy CTG repeats in transgenic mice. *Nature Genetics*, *15*(2), 193–196. <https://doi.org/10.1038/ng0297-193>
- Montagnese, F., Mondello, S., Wenninger, S., Kress, W., & Schoser, B. (2017). Assessing the influence of age and gender on the phenotype of myotonic dystrophy type 2. *Journal of Neurology*, *264*(12), 2472–2480. <https://doi.org/10.1007/s00415-017-8653-2>
- Mooers, B. H. M., Logue, J. S., & Berglund, J. A. (2005). The structural basis of myotonic dystrophy from the crystal structure of CUG repeats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(46), 16626–16631. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505873102>
- Morales, F., Couto, J. M., Higham, C. F., Hogg, G., Cuenca, P., Braidia, C., Wilson, R. H., Adam, B., Del Valle, G., Brian, R., Sittenfeld, M., Ashizawa, T., Wilcox, A., Wilcox, D. E., & Monckton, D. G. (2012). Somatic instability of the expanded CTG triplet repeat in myotonic dystrophy type 1 is a heritable quantitative trait and modifier of disease severity. *Human Molecular Genetics*, *21*(16), 3558–3567. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds185>
- Morales, F., Vásquez, M., Corrales, E., Vindas-Smith, R., Santamaría-Ulloa, C., Zhang, B., Sirito, M., Estecio, M. R., Krahe, R., & Monckton, D. G. (2020). Longitudinal increases in somatic mosaicism of the expanded CTG repeat in myotonic dystrophy type 1 are associated with variation in age-at-onset. *Human Molecular Genetics*, *29*(15), 2496–2507.

<https://doi.org/10.1093/hmg/ddaa123>

- Moransard, M., Borges, L. S., Willmann, R., Marangi, P. A., Brenner, H. R., Ferns, M. J., & Fuhrer, C. (2003). Agrin regulates rapsyn interaction with surface acetylcholine receptors, and this underlies cytoskeletal anchoring and clustering. *Journal of Biological Chemistry*, 278(9), 7350–7359. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210865200>
- Morgan, N. V., Brueton, L. A., Cox, P., Grealley, M. T., Tolmie, J., Pasha, S., Aligianis, I. A., Van Bokhoven, H., Marton, T., Al-Gazali, L., Morton, J. E. V., Oley, C., Johnson, C. A., Trembath, R. C., Brunner, H. G., & Maher, E. R. (2006). Mutations in the embryonal subunit of the acetylcholine receptor (CHRNA3) cause lethal and escobar variants of multiple pterygium syndrome. *American Journal of Human Genetics*, 79(2), 390–395. <https://doi.org/10.1086/506256>
- Morriss, G. R., Rajapakshe, K., Huang, S., Coarfa, C., & Cooper, T. A. (2018). Mechanisms of skeletal muscle wasting in a mouse model for myotonic dystrophy type 1. *Human Molecular Genetics*, 27(16), 2789–2804. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy192>
- Mousslim, C., Aittaleb, M., Hume, R. I., & Akaaboune, M. (2012). A role for the calmodulin kinase II-related anchoring protein (α kap) in maintaining the stability of nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Neuroscience*, 32(15), 5177–5185. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6477-11.2012>
- Mulders, S. A. M., Van Den Broek, W. J. A. A., Wheeler, T. M., Croes, H. J. E., Van Kuik-Romeijn, P., De Kimpe, S. J., Furling, D., Platenburg, G. J., Gourdon, G., Thornton, C. A., Wieringa, B., & Wansink, D. G. (2009). Triplet-repeat oligonucleotide-mediated reversal of RNA toxicity in myotonic dystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(33), 13915–13920. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905780106>
- Muraine, L., Bensalah, M., Dhiab, J., Cordova, G., Arandel, L., Marhic, A., Chapart, M., Vasseur, S., Benkhelifa-Ziyyat, S., Bigot, A., Butler-Browne, G., Mouly, V., Negroni, E., & Trollet, C. (2020). Transduction Efficiency of Adeno-Associated Virus Serotypes after Local Injection in Mouse and Human Skeletal Muscle. *Human Gene Therapy*, 31(3–4), 233–240. <https://doi.org/10.1089/hum.2019.173>
- Musova, Z., Mazanec, R., Krepelova, A., Ehler, E., Vales, J., Jaklova, R., Prochazka, T., Koukal, P., Marikova, T., Kraus, J., Havlovicova, M., & Sedlacek, Z. (2009). Highly unstable sequence interruptions of the CTG repeat in the myotonic dystrophy gene. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 149(7), 1365–1374. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32987>
- Myotonic Dystrophy Foundation. (n.d.). *DM1 Muscle*. Retrieved May 23, 2020, from <https://www.myotonic.org/muscle-dm1>
- Nachmansohn, D., & Machado, A. L. (1943). THE FORMATION OF ACETYLCHOLINE. A NEW ENZYME: “CHOLINE ACETYLASE.” *Journal of Neurophysiology*, 6(5), 397–403. <https://doi.org/10.1152/jn.1943.6.5.397>
- Nakamori, M., Gourdon, G., & Thornton, C. A. (2011). Stabilization of expanded (CTG)_n(CAG)_n repeats by antisense oligonucleotides. *Molecular Therapy*, 19(12), 2222–2227. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.191>
- Nakamori, M., Pearson, C. E., & Thornton, C. A. (2011). Bidirectional transcription stimulates expansion and contraction of expanded (CTG)_n(CAG)_n repeats. *Human Molecular Genetics*, 20(3), 580–588. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq501>
- Nakamori, M., Shimizu, H., Ogawa, K., Hasuike, Y., Nakajima, T., Sakurai, H., Araki, T., Okada, Y., Kakita, A., & Mochizuki, H. (2022). Cell type-specific abnormalities of central nervous system in myotonic dystrophy type 1. *Brain Communications*, 4(3), 1–17. <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcac154>
- Nakamori, M., Sobczak, K., Puwanant, A., Welle, S., Eichinger, K., Pandya, S., Dekdebrun, J.,

- Heatwole, C. R., McDermott, M. P., Chen, T., Cline, M., Tawil, R., Osborne, R. J., Wheeler, T. M., Swanson, M. S., Moxley, R. T., & Thornton, C. A. (2013). Splicing biomarkers of disease severity in myotonic dystrophy. *Annals of Neurology*, *74*(6), 862–872. <https://doi.org/10.1002/ana.23992>
- Nakamori, M., Taylor, K., Mochizuki, H., Sobczak, K., & Takahashi, M. P. (2016). Oral administration of erythromycin decreases RNA toxicity in myotonic dystrophy. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, *3*(1), 42–54. <https://doi.org/10.1002/acn3.271>
- Naro, A., Portaro, S., Milardi, D., Billeri, L., Leo, A., Militi, D., Bramanti, P., & Calabrò, R. S. (2019). Paving the way for a better understanding of the pathophysiology of gait impairment in myotonic dystrophy: A pilot study focusing on muscle networks. *Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation*, *16*(1), 116. <https://doi.org/10.1186/s12984-019-0590-0>
- Naveilhan, P., EiShamy, W. M., & Ernfors, P. (1997). Differential regulation of mRNAs for GDNF and its receptors Ret and GDNFR α after sciatic nerve lesion in the mouse. *European Journal of Neuroscience*, *9*(7), 1450–1460. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1997.tb01499.x>
- Nguyen, L., Lee, J. Y., Wong, C. H., & Zimmerman, S. C. (2014). Small Molecules that Target the Toxic RNA in Myotonic Dystrophy Type 2. *ChemMedChem*, *9*(11), 2455–2462. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201402095>
- Nguyen, Q. T., Sanes, J. R., & Lichtman, J. W. (2002). Pre-existing pathways promote precise projection patterns. *Nature Neuroscience*, *5*(9), 861–867. <https://doi.org/10.1038/nn905>
- Niblock, M., Smith, B. N., Lee, Y. B., Sardone, V., Topp, S., Troakes, C., Al-Sarraj, S., Leblond, C. S., Dion, P. A., Rouleau, G. A., Shaw, C. E., & Gallo, J. M. (2016). Retention of hexanucleotide repeat-containing intron in C9orf72 mRNA: implications for the pathogenesis of ALS/FTD. *Acta Neuropathologica Communications*, *4*, 18. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0289-4>
- Niedergerke, R. (1955). Local muscular shortening by intracellularly applied calcium. *J Physiol*, *128*(Suppl), 12P-13P. [https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Local muscle shortening by intracellularly applied calcium&journal=J Physiol&volume=128&pages=12-13P&publication_year=1955&author=Niedergerke%2CR](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Local+muscle+shortening+by+intracellularly+applied+calcium&journal=J+Physiol&volume=128&pages=12-13P&publication_year=1955&author=Niedergerke%2CR)
- Niewiadomski, P., Kong, J. H., Ahrends, R., Ma, Y., Humke, E. W., Khan, S., Teruel, M. N., Novitsch, B. G., & Rohatgi, R. (2014). Gli protein activity is controlled by multisite phosphorylation in vertebrate hedgehog signaling. *Cell Reports*, *6*(1), 168–181. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.003>
- Noakes, P. G., Gautam, M., Mudd, J., Sanes, J. R., & Merlie, J. P. (1995). Aberrant differentiation of neuromuscular junctions in mice lacking s-laminin/laminin β 2. *Nature*, *374*(6519), 258–262. <https://doi.org/10.1038/374258a0>
- Novelli, A., Reilly, J. A., Lysko, P. G., & Henneberry, R. C. (1988). Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-d-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Research*, *451*(1–2), 205–212. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)90765-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)90765-2)
- Novitsch, B. G., Chen, A. I., & Jessell, T. M. (2001). Coordinate regulation of motor neuron subtype identity and pan-neuronal properties by the bHLH repressor Olig2. *Neuron*, *31*(5), 773–789. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00407-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00407-X)
- Novitsch, B. G., Wichterle, H., Jessell, T. M., & Sockanathan, S. (2003). A requirement for retinoic acid-mediated transcriptional activation in ventral neural patterning and motor neuron specification. *Neuron*, *40*(1), 81–95. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2003.08.006>
- Ohkawara, B., Kobayakawa, A., Kanbara, S., Hattori, T., Kubota, S., Ito, M., Masuda, A., Takigawa, M., Lyons, K. M., Ishiguro, N., & Ohno, K. (2020). CTGF/CCN2 facilitates LRP4-mediated formation of the embryonic neuromuscular junction. *EMBO Reports*, *21*(8), e48462. <https://doi.org/10.15252/embr.201948462>

- Ohno, K., Brengman, J., Tsujino, A., & Engel, A. G. (1998). Human endplate acetylcholinesterase deficiency caused by mutations in the collagen-like tail subunit (ColQ) of the asymmetric enzyme. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Vol. 95, Issue 16). <https://doi.org/10.1073/pnas.95.16.9654>
- Okada, K., Inoue, A., Okada, M., Murata, Y., Kakuta, S., Jigami, T., Kubo, S., Shiraishi, H., Eguchi, K., Motomura, M., Akiyama, T., Iwakura, Y., Higuchi, O., & Yamanashi, Y. (2006). The muscle protein Dok-7 is essential for neuromuscular synaptogenesis. *Science*, *312*(5781), 1802–1805. <https://doi.org/10.1126/science.1127142>
- Omar, A., & Bollu, P. C. (2019). Physiology, Neuromuscular Junction. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29261907>
- Orengo, J. P., Chambon, P., Metzger, D., Mosier, D. R., Snipes, G. J., & Cooper, T. A. (2008). Expanded CTG repeats within the DMPK 3' UTR causes severe skeletal muscle wasting in an inducible mouse model for myotonic dystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(7), 2646–2651. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708519105>
- Osborne, R. J., & Thornton, C. A. (2008). Cell-free cloning of highly expanded CTG repeats by amplification of dimerized expanded repeats. *Nucleic Acids Research*, *36*(4), e24. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn025>
- Osman, N. I., & Chapple, C. R. (2014). Contemporary concepts in the aetiopathogenesis of detrusor underactivity. In *Nature Reviews Urology* (Vol. 11, Issue 11, pp. 639–648). Nat Rev Urol. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2014.286>
- Otero, B. A., Poukalov, K., Hildebrandt, R. P., Thornton, C. A., Jinnai, K., Fujimura, H., Kimura, T., Hagerman, K. A., Sampson, J. B., Day, J. W., & Wang, E. T. (2021). Transcriptome alterations in myotonic dystrophy frontal cortex. *Cell Reports*, *34*(3), 108634. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108634>
- Otten, A. D., & Tapscott, S. J. (1995). Triplet repeat expansion in myotonic dystrophy alters the adjacent chromatin structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(12), 5465–5469. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.12.5465>
- Ozimski, L. L., Sabater-Arcis, M., Bargiela, A., & Artero, R. (2021). The hallmarks of myotonic dystrophy type 1 muscle dysfunction. *Biological Reviews*, *96*(2), 716–730. <https://doi.org/10.1111/brv.12674>
- Pamudurti, N. R., Konakondla-Jacob, V. V., Krishnamoorthy, A., Ashwal-Fluss, R., Bartok, O., Wüst, S., Seitz, K., Maya, R., Lerner, N., Patop, I. L., Rizzoli, S., Beautus, T., & Kadener, S. (2018). An in vivo knockdown strategy reveals multiple functions for circMbl. *BioRxiv*, 483271. <https://doi.org/10.1101/483271>
- Panaite, P.-A., Kuntzer, T., Gourdon, G., Lobrinus, J. A., & Barakat-Walter, I. (2013). Functional and histopathological identification of the respiratory failure in a DMSXL transgenic mouse model of myotonic dystrophy. *Disease Models & Mechanisms*, *6*(3), 622–631. <https://doi.org/10.1242/dmm.010512>
- Park, S., Phukan, P. D., Zeeb, M., Martinez-Yamout, M. A., Dyson, H. J., & Wright, P. E. (2017). Structural Basis for Interaction of the Tandem Zinc Finger Domains of Human Muscleblind with Cognate RNA from Human Cardiac Troponin T. *Biochemistry*, *56*(32), 4154–4168. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00484>
- Pascual, M., Vicente, M., Monferrer, L., & Artero, R. (2006). The Muscleblind family of proteins: An emerging class of regulators of developmentally programmed alternative splicing. In *Differentiation* (Vol. 74, Issues 2–3, pp. 65–80). <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2006.00060.x>
- Pasterkamp, R. J., & Burk, K. (2021). Axon guidance receptors: Endocytosis, trafficking and

- downstream signaling from endosomes. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 198, p. 101916). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101916>
- Patrick, G. N., Zukerberg, L., Nikolic, M., De La Monte, S., Dikkes, P., & Tsai, L. H. (1999). Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature*, *402*(6762), 615–622. <https://doi.org/10.1038/45159>
- Paul, S., Dansithong, W., Jog, S. P., Holt, I., Mittal, S., Brook, J. D., Morris, G. E., Comai, L., & Reddy, S. (2011). Expanded CUG repeats dysregulate RNA splicing by altering the stoichiometry of the muscleblind 1 complex. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(44), 38427–38438. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.255224>
- Peachey, L. D. (1965). The sarcoplasmic reticulum and transverse tubules of the frog's sartorius. *The Journal of Cell Biology*, *25*(3), 209. <https://doi.org/10.1083/jcb.25.3.209>
- Pelechano, V., & Steinmetz, L. M. (2013). Gene regulation by antisense transcription. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 14, Issue 12, pp. 880–893). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg3594>
- Pelletier, R., Hamel, F., Beaulieu, D., Patry, L., Haineault, C., Tarnopolsky, M., Schoser, B., & Puymirat, J. (2009). Absence of a differentiation defect in muscle satellite cells from DM2 patients. *Neurobiology of Disease*, *36*(1), 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.009>
- Perbellini, R., Greco, S., Sarra-Ferraris, G., Cardani, R., Capogrossi, M. C., Meola, G., & Martelli, F. (2011). Dysregulation and cellular mislocalization of specific miRNAs in myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscular Disorders*, *21*(2), 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2010.11.012>
- Perdoni, F., Malatesta, M., Cardani, R., Giagnacovo, M., Mancinelli, E., Meola, G., & Pellicciari, C. (2009). RNA/MBNL1-containing foci in myoblast nuclei from patients affected by myotonic dystrophy type 2: An immunocytochemical study. *European Journal of Histochemistry*, *53*(3), 151–158. <https://doi.org/10.4081/ejh.2009.e18>
- Pešović, J., Perić, S., Brkušanić, M., Brajušković, G., Rakočević-Stojanović, V., & Savić-Pavić Ević, D. (2018). Repeat interruptions modify age at onset in myotonic dystrophy type 1 by stabilizing DMPK expansions in somatic cells. *Frontiers in Genetics*, *9*(November), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00601>
- Pešović, J., Perić, S., Brkušanić, M., Brajušković, G., Rakočević-Stojanović, V., & Savić-Pavićević, D. (2017). Molecular genetic and clinical characterization of myotonic dystrophy type 1 patients carrying variant repeats within DMPK expansions. *Neurogenetics*, *18*(4), 207–218. <https://doi.org/10.1007/s10048-017-0523-7>
- Petri, H., Witting, N., Ersbøll, M. K., Sajadieh, A., Dunø, M., Helweg-Larsen, S., Vissing, J., Køber, L., & Bundgaard, H. (2014). High prevalence of cardiac involvement in patients with myotonic dystrophy type 1: A cross-sectional study. *International Journal of Cardiology*, *174*(1), 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.03.088>
- Pettersson, O. J., Aagaard, L., Andrejeva, D., Thomsen, R., Jensen, T. G., & Damgaard, C. K. (2014). DDX6 regulates sequestered nuclear CUG-expanded DMPK-mRNA in dystrophia myotonica type 1. *Nucleic Acids Research*, *42*(11), 7186–7200. <https://doi.org/10.1093/nar/gku352>
- Philippidou, P., & Dasen, J. S. (2013). Hox Genes: Choreographers in Neural Development, Architects of Circuit Organization. In *Neuron* (Vol. 80, Issue 1, pp. 12–34). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.09.020>
- Philips, A. V., Timchenko, L. T., & Cooper, T. A. (1998). Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science*, *280*(5364), 737–741. <https://doi.org/10.1126/science.280.5364.737>
- Phillips, M. F., & Harper, P. S. (1997). Cardiac disease in myotonic dystrophy. *Cardiovascular*

- Research*, 33(1), 13–22. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(96\)00163-0](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(96)00163-0)
- Picchio, L., Plantie, E., Renaud, Y., Poovthumkadavil, P., & Jagla, K. (2013). Novel drosophila model of myotonic dystrophy type 1: Phenotypic characterization and genome-wide view of altered gene expression. *Human Molecular Genetics*, 22(14), 2795–2810. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt127>
- Pinto, B. S., Saxena, T., Oliveira, R., Méndez-Gómez, H. R., Cleary, J. D., Denes, L. T., McConnell, O., Arboleda, J., Xia, G., Swanson, M. S., & Wang, E. T. (2017). Impeding Transcription of Expanded Microsatellite Repeats by Deactivated Cas9. *Molecular Cell*, 68(3), 479–490.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.09.033>
- Popot, J. L., & Changeux, J. P. (1984). Nicotinic receptor of acetylcholine: Structure of an oligomeric integral membrane protein. *Physiological Reviews*, 64(4), 1162–1239. <https://doi.org/10.1152/physrev.1984.64.4.1162>
- Potier, B., Lallemand, L., Parrot, S., Huguet-Lachon, A., Gourdon, G., Dutar, P., & Gomes-Pereira, M. (2022). DM1 Transgenic Mice Exhibit Abnormal Neurotransmitter Homeostasis and Synaptic Plasticity in Association with RNA Foci and Mis-splicing in the Hippocampus. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms23020592>
- Poulos, M. G., Batra, R., Li, M., Yuan, Y., Zhang, C., Darnell, R. B., & Swanson, M. S. (2013). Progressive impairment of muscle regeneration in muscleblind-like 3 isoform knockout mice. *Human Molecular Genetics*, 22(17), 3547–3558. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt209>
- Protasi, F. (2002). Structural interaction between RYRs and DHPRs in calcium release units of cardiac and skeletal muscle cells. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 7, d650–8. <https://doi.org/10.2741/a801>
- Purcell, J., Oddo, J. C., Wang, E. T., & Berglund, J. A. (2012). Combinatorial Mutagenesis of MBNL1 Zinc Fingers Elucidates Distinct Classes of Regulatory Events. *Molecular and Cellular Biology*, 32(20), 4155–4167. <https://doi.org/10.1128/mcb.00274-12>
- Qawasmi, L., Braun, M., Guberman, I., Cohen, E., Naddaf, L., Mellul, A., Matilainen, O., Roitenberg, N., Share, D., Stupp, D., Chahine, H., Cohen, E., Garcia, S. M. D. A., & Tabach, Y. (2019). Expanded CUG Repeats Trigger Disease Phenotype and Expression Changes through the RNAi Machinery in *C. elegans*. In *Journal of Molecular Biology* (Vol. 431, Issue 9, pp. 1711–1728). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.03.003>
- Querido, E., Gallardo, F., Beaudoin, M., Ménard, C., & Chartrand, P. (2011). Stochastic and reversible aggregation of mRNA with expanded CUG-triplet repeats. *Journal of Cell Science*, 124(10), 1703–1714. <https://doi.org/10.1242/jcs.073270>
- Quirk, J., van den Heuvel, M., Henrique, D., Marigo, V., Jones, T., Tabin, C., & Ingham, P. W. (1997). The smoothed gene and hedgehog signal transduction in *Drosophila* and vertebrate development. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 62, 217–226.
- Raheem, O., Huovinen, S., Suominen, T., Haapasalo, H., & Udd, B. (2010). Novel myosin heavy chain immunohistochemical double staining developed for the routine diagnostic separation of I, IIA and IIX fibers. *Acta Neuropathologica*, 119(4), 495–500. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0643-8>
- Rajgor, D., Welle, T. M., & Smith, K. R. (2021). The Coordination of Local Translation, Membranous Organelle Trafficking, and Synaptic Plasticity in Neurons. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 9, p. 711446). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.711446>
- Rakocevic-Stojanovic, V., Pavlović, S., Seferović, P., Vasiljević, J., Lavrnić, D., Marinković, Z., & Apostolski, S. (1999). Pathohistological changes in endomyocardial biopsy specimens in patients with myotonic dystrophy. *Panminerva Medica*, 41(1), 27–30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10230253>

- Ramaswami, M., Taylor, J. P., & Parker, R. (2013). XAltered ribostasis: RNA-protein granules in degenerative disorders. *Cell*, *154*(4). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.038>
- Raney, M. A., & Turcotte, L. P. (2008). Evidence for the involvement of CaMKII and AMPK in Ca²⁺- dependent signaling pathways regulating FA uptake and oxidation in contracting rodent muscle. *Journal of Applied Physiology*, *104*(5), 1366–1373. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01282.2007>
- Ranum, L. P. W., Rasmussen, P. F., Benzow, K. A., Koob, M. D., & Day, J. W. (1998). Genetic mapping of a second myotonic dystrophy locus. *Nature Genetics*, *19*(2), 196–198. <https://doi.org/10.1038/570>
- Ratliff, W. A., Saykally, J. N., Kane, M. J., & Citron, B. A. (2018). Neuromuscular Junction Morphology and Gene Dysregulation in the Wobbler Model of Spinal Neurodegeneration. *Journal of Molecular Neuroscience*, *66*(1), 114–120. <https://doi.org/10.1007/s12031-018-1153-8>
- Rattenbacher, B., Beisang, D., Wiesner, D. L., Jeschke, J. C., von Hohenberg, M., St. Louis-Vlasova, I. A., & Bohjanen, P. R. (2010). Analysis of CUGBP1 Targets Identifies GU-Repeat Sequences That Mediate Rapid mRNA Decay. *Molecular and Cellular Biology*, *30*(16), 3970–3980. <https://doi.org/10.1128/mcb.00624-10>
- Rau, F., Freyermuth, F., Fugier, C., Villemin, J. P., Fischer, M. C., Jost, B., Dembele, D., Gourdon, G., Nicole, A., Duboc, D., Wahbi, K., Day, J. W., Fujimura, H., Takahashi, M. P., Auboeuf, D., Dreumont, N., Furling, D., & Charlet-Berguerand, N. (2011). Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy. *Nature Structural and Molecular Biology*, *18*(7), 840–845. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2067>
- Rau, F., Lainé, J., Ramanoudjame, L., Ferry, A., Arandel, L., Delalande, O., Jollet, A., Dingli, F., Lee, K. Y., Peccate, C., Lorain, S., Kabashi, E., Athanasopoulos, T., Koo, T., Loew, D., Swanson, M. S., Le Rumeur, E., Dickson, G., Allamand, V., ... Furling, D. (2015). Abnormal splicing switch of DMD's penultimate exon compromises muscle fibre maintenance in myotonic dystrophy. *Nature Communications*, *6*(1), 7205. <https://doi.org/10.1038/ncomms8205>
- Ravel-Chapuis, A., Al-Rewashdy, A., Bélanger, G., & Jasmin, B. J. (2018). Pharmacological and physiological activation of AMPK improves the spliceopathy in DM1 mouse muscles. *Human Molecular Genetics*, *27*(19), 3361–3376. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy245>
- Ravel-Chapuis, A., Bélanger, G., Yadava, R. S., Mahadevan, M. S., DesGroseillers, L., Côté, J., & Jasmin, B. J. (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. <https://doi.org/10.1083/jcb.201108113>
- Reddy, K., Jenquin, J. R., McConnell, O. L., Cleary, J. D., Richardson, J. I., Pinto, B. S., Haerle, M. C., Delgado, E., Planco, L., Nakamori, M., Wang, E. T., & Berglund, J. A. (2019). A CTG repeat-selective chemical screen identifies microtubule inhibitors as selective modulators of toxic CUG RNA levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(42), 20991–21000. <https://doi.org/10.1073/pnas.1901893116>
- Reddy, S., Smith, D. B. J., Rich, M. M., Leferovich, J. M., Reilly, P., Davis, B. M., Tran, K., Rayburn, H., Bronson, R., Cros, D., Balice-Gordon, R. J., & Housman, D. (1996). Mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase develop a late onset progressive myopathy. *Nature Genetics*, *13*(3), 325–335. <https://doi.org/10.1038/ng0796-325>
- Reemst, K., Noctor, S. C., Lucassen, P. J., & Hol, E. M. (2016). The indispensable roles of microglia and astrocytes during brain development. *Frontiers in Human Neuroscience*, *10*(NOV2016), 566. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2016.00566>
- Rexed, B. (1954). A cytoarchitectonic atlas of the spinal coed in the cat. *Journal of Comparative Neurology*, *100*(2), 297–379. <https://doi.org/10.1002/cne.901000205>

- Ricker, K. (1999). Myotonic dystrophy and proximal myotonic myopathy. *Journal of Neurology*, 246(5), 334–338. <https://doi.org/10.1007/s004150050359>
- Ricker, K., Koch, M., Lehmann-Horn, F., Pongratz, D., Otto, M., Heine, R., & Moxley, R. I. (1994). Proximal myotonic myopathy : a new dominant disorder with myotonia, muscle weakness, and cataracts. *Neurology*, 44, 1448–1452. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1997.tb00282.x>
- Ries, R. J., Zaccara, S., Klein, P., Olarerin-George, A., Namkoong, S., Pickering, B. F., Patil, D. P., Kwak, H., Lee, J. H., & Jaffrey, S. R. (2019). m6A enhances the phase separation potential of mRNA. *Nature*, 571(7765), 424–428. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1374-1>
- Roberts, R., Timchenko, N. A., Miller, J. W., Reddy, S., Caskey, C. T., Swanson, M. S., & Timchenko, L. T. (1997). Altered phosphorylation and intracellular distribution of a (CUG)_n triplet repeat RNA-binding protein in patients with myotonic dystrophy and in myotonin protein kinase knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(24), 13221–13226. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.24.13221>
- Roche, S. L., Sherman, D. L., Dissanayake, K., Soucy, G., Desmazieres, A., Lamont, D. J., Peles, E., Julien, J. P., Wishart, T. M., Ribchester, R. R., Brophy, P. J., & Gillingwater, T. H. (2014). Loss of glial Neurofascin155 delays developmental synapse elimination at the neuromuscular junction. *Journal of Neuroscience*, 34(38), 12904–12918. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1725-14.2014>
- Roelink, H., Augsburger, A., Heemskerk, J., Korzh, V., Norlin, S., Ruiz i Altaba, A., Tanabe, Y., Placzek, M., Edlund, T., Jessell, T. M., & Dodd, J. (1994). Floor plate and motor neuron induction by vhh-1, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the notochord. *Cell*, 76(4), 761–775. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90514-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90514-2)
- Romanes, G. J. (1941). The development and significance of the cell columns in the ventral horn of the cervical and upper thoracic spinal cord of the rabbit. *Journal of Anatomy*, 76(Pt 1), 112–130.5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17104877> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1252719>
- Romeo, V. (2012). Myotonic Dystrophy Type 1 or Steinert's disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 724, 239–257. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0653-2_18
- Romeo, V., Pegoraro, E., Ferrati, C., Squarzanti, F., Sorarù, G., Palmieri, A., Zucchetta, P., Antunovic, L., Bonifazi, E., Novelli, G., Trevisan, C. P., Ermani, M., Manara, R., & Angelini, C. (2010). Brain involvement in myotonic dystrophies: Neuroimaging and neuropsychological comparative study in DM1 and DM2. *Journal of Neurology*, 257(8), 1246–1255. <https://doi.org/10.1007/s00415-010-5498-3>
- Rönblom, A., Forsberg, H., & Danielsson, Å. (1996). Gastrointestinal symptoms in myotonic dystrophy. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 31(7), 654–657. <https://doi.org/10.3109/00365529609009145>
- Rosenberry, T. L. (1979). Quantitative simulation of endplate currents at neuromuscular junctions based on the reaction of acetylcholine with acetylcholine receptor and acetylcholinesterase. *Biophysical Journal*, 26(2), 263–289. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(79\)85249-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(79)85249-2)
- Ross, A. J., Ruiz-Perez, V., Wang, Y., Hagan, D. M., Scherer, S., Lynch, S. A., Lindsay, S., Custard, E., Belloni, E., Wilson, D. I., Wadey, R., Goodman, F., Orstavik, K. H., Monclair, T., Robson, S., Reardon, W., Burn, J., Scambler, P., & Strachan, T. (1998). A homeobox gene, HLXB9, is the major locus for dominantly inherited sacral agenesis. *Nature Genetics*, 20(4), 358–361. <https://doi.org/10.1038/3828>
- Rouso, D. L., Pearson, C. A., Gaber, Z. B., Miquelajauregui, A., Li, S., Portera-Cailliau, C.,

- Morrissey, E. E., & Novitsch, B. G. (2012). Foxp-Mediated Suppression of N-Cadherin Regulates Neuroepithelial Character and Progenitor Maintenance in the CNS. *Neuron*, 74(2), 314–330. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.024>
- Rubinsztein, J. S., Rubinsztein, D. C., Goodburn, S., & Holland, A. J. (1998). Apathy and hypersomnia are common features of myotonic dystrophy. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, 64(4), 510–515. <https://doi.org/10.1136/jnnp.64.4.510>
- Ruegg, M. A., & Bixby, J. L. (1998). Agrin orchestrates synaptic differentiation at the vertebrate neuromuscular junction. *Trends in Neurosciences*, 21(1), 22–27. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(97\)01154-5](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(97)01154-5)
- Ruggiu, M., Herbst, R., Kim, N., Jevsek, M., Fak, J. J., Mann, M. A., Fischbach, G., Burden, S. J., & Darnell, R. B. (2009). Rescuing Z+ agrin splicing in Nova null mice restores synapse formation and unmasks a physiologic defect in motor neuron firing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(9), 3513–3518. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813112106>
- Saba, S., Vanderbrenk, B. A., Luciano, B., Aronovitz, M. J., Berul, C. I., Reddy, S., Housman, D., Mendelsohn, M. E., Estes, N. A. M., & Wang, P. J. (1999). Localization of the sites of conduction abnormalities in a mouse model of myotonic dystrophy. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 10(9), 1214–1220. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8167.1999.tb00298.x>
- Sabater-Arcis, M., Bargiela, A., Furling, D., & Artero, R. (2020). miR-7 Restores Phenotypes in Myotonic Dystrophy Muscle Cells by Repressing Hyperactivated Autophagy. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 19(March), 278–292. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.11.012>
- Sabater-Arcis, M., Bargiela, A., Moreno, N., Poyatos-Garcia, J., Vilchez, J. J., & Artero, R. (2021). Musashi-2 contributes to myotonic dystrophy muscle dysfunction by promoting excessive autophagy through miR-7 biogenesis repression. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 25, 652–667. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.08.010>
- Sabouri, L. A., Mahadevan, M. S., Narang, M., Lee, D. S. C., Surh, L. C., & Korneluk, R. G. (1993). Effect of the myotonic dystrophy (DM) mutation on mRNA levels of the DM gene. *Nature Genetics*, 4(3), 233–238. <https://doi.org/10.1038/ng0793-233>
- Salisbury, E., Schoser, B., Schneider-Gold, C., Wang, G. L., Huichalaf, C., Jin, B., Sirito, M., Sarkar, P., Krahe, R., Timchenko, N. A., & Timchenko, L. T. (2009). Expression of RNA CCUG repeats dysregulates translation and degradation of proteins in myotonic dystrophy 2 patients. *American Journal of Pathology*, 175(2), 748–762. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.090047>
- Salter, M. W., & Stevens, B. (2017). Microglia emerge as central players in brain disease. *Nature Medicine*, 23(9), 1018–1027. <https://doi.org/10.1038/nm.4397>
- Salzman, J., Chen, R. E., Olsen, M. N., Wang, P. L., & Brown, P. O. (2013). Cell-Type Specific Features of Circular RNA Expression. *PLoS Genetics*, 9(9), e1003777. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003777>
- Samuel, M. A., Valdez, G., Tapia, J. C., Lichtman, J. W., & Sanes, J. R. (2012). Agrin and Synaptic Laminin Are Required to Maintain Adult Neuromuscular Junctions. *PLoS ONE*, 7(10), 46663. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046663>
- Sandow, A. (1952). Excitation-contraction coupling in muscular response. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 25(3), 176–201. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13015950>
- Sanes, J. R. (2003). The basement membrane/basal lamina of skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 278(15), 12601–12604. <https://doi.org/10.1074/jbc.R200027200>
- Santoro, M., Masciullo, M., Pietrobono, R., Conte, G., Modoni, A., Bianchi, M. L. E., Rizzo, V., Pomponi, M. G., Tasca, G., Neri, G., & Silvestri, G. (2013). Molecular, clinical, and muscle studies in myotonic dystrophy type 1 (DM1) associated with novel variant CCG expansions.

- Journal of Neurology*, 260(5), 1245–1257. <https://doi.org/10.1007/s00415-012-6779-9>
- Santosa, K. B., Keane, A. M., Jablonka-Shariff, A., Vannucci, B., & Snyder-Warwick, A. K. (2018). Clinical relevance of terminal Schwann cells: An overlooked component of the neuromuscular junction. In *Journal of Neuroscience Research* (Vol. 96, Issue 7, pp. 1125–1135). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1002/jnr.24231>
- Sarkar, P. S., Appukuttan, B., Han, J., Ito, Y., Ai, C., Tsai, W., Chai, Y., Stout, J. T., & Reddy, S. (2000). Heterozygous loss of Six5 in mice is sufficient to cause ocular cataracts. *Nature Genetics*, 25(1), 110–114. <https://doi.org/10.1038/75500>
- Sarkar, P. S., Paul, S., Han, J., & Reddy, S. (2004). Six5 is required for spermatogenic cell survival and spermiogenesis. *Human Molecular Genetics*, 13(14), 1421–1431. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh161>
- Savkur, R. S., Philips, A. V., & Cooper, T. A. (2001). Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nature Genetics*, 29(1), 40–47. <https://doi.org/10.1038/ng704>
- Schaeffer, L., De Kerchove D'Exaerde, A., & Changeux, J. P. (2001). Targeting transcription to the neuromuscular synapse. *Neuron*, 31(1), 15–22. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00353-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00353-1)
- Schiaffino, S., & Reggiani, C. (2011). Fiber types in Mammalian skeletal muscles. *Physiological Reviews*, 91(4), 1447–1531. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2010>
- Schmidt, N., Akaaboune, M., Gajendran, N., Martinez-Pena y Valenzuela, I., Wakefield, S., Thurnheer, R., & Brenner, H. R. (2011). Neuregulin/ErbB regulate neuromuscular junction development by phosphorylation of α -dystrobrevin. *Journal of Cell Biology*, 195(7), 1171–1184. <https://doi.org/10.1083/jcb.201107083>
- Schröder, J. M., & Adams, R. D. (1968). The ultrastructural morphology of the muscle fiber in myotonic dystrophy. *Acta Neuropathologica*, 10(3), 218–241. <https://doi.org/10.1007/BF00687725>
- Schuman, B. M., Rinaldo, J. A., & Darnley, J. D. (1965). Visceral changes in myotonic dystrophy. *Annals of Internal Medicine*, 63(5), 793–799. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-63-5-793>
- Seeburg, P. H. (1993). The TINS/TiPS Lecture the molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends in Neurosciences*, 16(9), 359–365. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(93\)90093-2](https://doi.org/10.1016/0166-2236(93)90093-2)
- Sellier, C., Cerro-Herrerros, E., Blatter, M., Freyermuth, F., Gaucherot, A., Ruffenach, F., Sarkar, P., Puymirat, J., Udd, B., Day, J. W., Meola, G., Bassez, G., Fujimura, H., Takahashi, M. P., Schoser, B., Furling, D., Artero, R., Allain, F. H. T., Llamusi, B., & Charlet-Berguerand, N. (2018). RbFOX1/MBNL1 competition for CCUG RNA repeats binding contributes to myotonic dystrophy type 1/type 2 differences. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04370-x>
- Selvin, E., Burnett, A. L., & Platz, E. A. (2007). Prevalence and Risk Factors for Erectile Dysfunction in the US. *American Journal of Medicine*, 120(2), 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.06.010>
- Sen, S., Talukdar, I., Liu, Y., Tam, J., Reddy, S., & Webster, N. J. G. (2010). Muscleblind-like 1 (Mbnl1) promotes insulin receptor exon 11 inclusion via binding to a downstream evolutionarily conserved intronic enhancer. *Journal of Biological Chemistry*, 285(33), 25426–25437. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.095224>
- Sergeant, N., Sablonnière, B., Schraen-Maschke, S., Ghestem, A., Muraige, C. A., Wattez, A., Vermersch, P., & Delacourte, A. (2001). Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Human Molecular Genetics*, 10(19), 2143–2155. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.19.2143>

- Seznec, H., Agbulut, O., Sergeant, N., Savouret, C., Ghestem, A., Tabti, N., Willer, J. C., Ourth, L., Duros, C., Brisson, E., Fouquet, C., Butler-Browne, G., Delacourte, A., Junien, C., & Gourdon, G. (2001). Mice transgenic for the human myotonic dystrophy region with expanded CTG repeats display muscular and brain abnormalities. *Human Molecular Genetics*, *10*(23), 2717–2726. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.23.2717>
- Seznec, H., Lia-Baldini, A. S., Duros, C., Fouquet, C., Lacroix, C., Hofmann-Radvanyi, H., Junien, C., & Gourdon, G. (2000). Transgenic mice carrying large human genomic sequences with expanded CTG repeat mimic closely the DM CTG repeat intergenerational and somatic instability. *Human Molecular Genetics*, *9*(8), 1185–1194. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.8.1185>
- Shafer, B., Onishi, K., Lo, C., Colakoglu, G., & Zou, Y. (2011). Vangl2 Promotes Wnt/Planar Cell Polarity-like Signaling by Antagonizing Dvl1-Mediated Feedback Inhibition in Growth Cone Guidance. *Developmental Cell*, *20*(2), 177–191. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.01.002>
- Shen, C., Li, L., Zhao, K., Bai, L., Wang, A., Shu, X., Xiao, Y., Zhang, J., Zhang, K., Hui, T., Chen, W., Zhang, B., Hsu, W., Xiong, W. C., & Mei, L. (2018). Motoneuron Wnts regulate neuromuscular junction development. *ELife*, *7*. <https://doi.org/10.7554/eLife.34625>
- Sherman, D. L., & Brophy, P. J. (2005). Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 6, Issue 9, pp. 683–690). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrn1743>
- Shi, L., Fu, A. K. Y., & Ip, N. Y. (2012). Molecular mechanisms underlying maturation and maintenance of the vertebrate neuromuscular junction. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 35, Issue 7, pp. 441–453). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.04.005>
- Shimizu, E., Tang, Y. P., Rampon, C., & Tsien, J. Z. (2000). NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. *Science*, *290*(5494), 1170–1174. <https://doi.org/10.1126/science.290.5494.1170>
- Shirasaki, R., & Pfaff, S. L. (2002). Transcriptional codes and the control of neuronal identity. In *Annual Review of Neuroscience* (Vol. 25, pp. 251–281). Annu Rev Neurosci. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.25.112701.142916>
- Siboni, R. B., Nakamori, M., Wagner, S. D., Struck, A. J., Coonrod, L. A., Harriott, S. A., Cass, D. M., Tanner, M. K., & Berglund, J. A. (2015). Actinomycin D Specifically Reduces Expanded CUG Repeat RNA in Myotonic Dystrophy Models. *Cell Reports*, *13*(11), 2386–2394. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.11.028>
- Sicot, G., Servais, L., Dinca, D. M., Leroy, A., Prigogine, C., Medja, F., Braz, S. O., Huguet-Lachon, A., Chhuon, C., Nicole, A., Gueriba, N., Oliveira, R., Dan, B., Furling, D., Swanson, M. S., Guerrera, I. C., Cheron, G., Gourdon, G., & Gomes-Pereira, M. (2017). Downregulation of the Glial GLT1 Glutamate Transporter and Purkinje Cell Dysfunction in a Mouse Model of Myotonic Dystrophy. *Cell Reports*, *19*(13), 2718–2729. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.006>
- Slater, C. R. (1982). Postnatal maturation of nerve-muscle junctions in hindlimb muscles of the mouse. *Developmental Biology*, *94*(1), 11–22. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(82\)90063-X](https://doi.org/10.1016/0012-1606(82)90063-X)
- Slater, C. R. (2017). The structure of human neuromuscular junctions: Some unanswered molecular questions. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 18, Issue 10). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms18102183>
- Smith, J. S., Imagawa, T., Ma, J., Fill, M., Campbell, K. P., & Coronado, R. (1988). Purified ryanodine receptor from rabbit skeletal muscle is the calcium-release channel of sarcoplasmic reticulum. *Journal of General Physiology*, *92*(1), 1–26. <https://doi.org/10.1085/jgp.92.1.1>

- Sochala, M., Porcher, R., Stojkovic, T., Bécane, H. M., Béhin, A., Laforêt, P., Bassez, G., Leonard-Louis, S., Eymard, B., Furling, D., Duboc, D., & Wahbi, K. (2018). High risk of fatal and nonfatal venous thromboembolism in myotonic dystrophy. In *Circulation* (Vol. 138, Issue 11, pp. 1169–1171). Lippincott Williams & Wilkins Hagerstown, MD. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.035035>
- Sommer, L., Ma, Q., & Anderson, D. J. (1996). Neurogenins, a novel family of atonal-related bHLH transcription factors, are putative mammalian neuronal determination genes that reveal progenitor cell heterogeneity in the developing CNS and PNS. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 8(4), 221–241. <https://doi.org/10.1006/mcne.1996.0060>
- Son, Y. J., & Thompson, W. J. (1995). Nerve sprouting in muscle is induced and guided by processes extended by Schwann cells. In *Neuron* (Vol. 14, Issue 1). Cell Press. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90247-3](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90247-3)
- Spilker, K. A., Wang, G. J., Tugizova, M. S., & Shen, K. (2012). Caenorhabditis elegans muscleblind homolog mbl-1 functions in neurons to regulate synapse formation. *Neural Development*, 7(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-7-7>
- Sta Maria, N. S., Zhou, C., Lee, S. J., Valiulahi, P., Li, X., Choi, J., Liu, X., Jacobs, R., Comai, L., & Reddy, S. (2021). Mbnl1 and Mbnl2 regulate brain structural integrity in mice. *Communications Biology*, 4(1), 1342. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02845-0>
- Stanga, S., Zanou, N., Audouard, E., Tasiaux, B., Contino, S., Vandermeulen, G., René, F., Loeffler, J. P., Clotman, F., Gailly, P., Dewachter, I., Octave, J. N., & Kienlen-Campard, P. (2016). APP-dependent glial cell line-derived neurotrophic factor gene expression drives neuromuscular junction formation. *FASEB Journal*, 30(5), 1696–1711. <https://doi.org/10.1096/fj.15-278739>
- Steinbach, P., Gläser, D., Vogel, W., Wolf, M., & Schwemmler, S. (1998). The DMPK gene of severely affected myotonic dystrophy patients is hypermethylated proximal to the largely expanded CTG repeat. *American Journal of Human Genetics*, 62(2), 278–285. <https://doi.org/10.1086/301711>
- Steinert, H. (1909). Über das klinische und anatomische bild des muscelschwundes der myotoniker. *Deutsche Zeitschrift Für Neurologie*, 37, 58–104. <https://ci.nii.ac.jp/naid/10012615352/>
- Stifani, N. (2014). Motor neurons and the generation of spinal motor neuron diversity. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 8, Issue OCT, p. 293). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00293>
- Stone, D. M., Hynes, M., Armanini, M., Swanson, T. A., Gu, Q., Johnson, R. L., Scott, M. P., Pennica, D., Goddard, A., Phillips, H., Noll, M., Hooper, J. E., De Sauvage, F., & Rosenthal, A. (1996). The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature*, 384(6605), 129–134. <https://doi.org/10.1038/384129a0>
- Strochlic, L., Falk, J., Goillot, E., Sigoillot, S., Bourgeois, F., Delers, P., Rouvière, J., Swain, A., Castellani, V., Schaeffer, L., & Legay, C. (2012). Wnt4 participates in the formation of vertebrate neuromuscular junction. *PLoS ONE*, 7(1), 29976. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029976>
- Südhof, T. C. (2012). The presynaptic active zone. In *Neuron* (Vol. 75, Issue 1, pp. 11–25). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.06.012>
- Suenaga, K., Lee, K. Y., Nakamori, M., Tatsumi, Y., Takahashi, M. P., Fujimura, H., Jinnai, K., Yoshikawa, H., Du, H., Ares, M., Swanson, M. S., & Kimura, T. (2012). Muscleblind-like 1 knockout mice reveal novel splicing defects in the myotonic dystrophy brain. *PLoS ONE*, 7(3), e33218. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033218>
- Sullivan, G. E. (1962). Anatomy and embryology of the wing musculature of the domestic fowl

- (Gallus). *Australian Journal of Zoology*, 10(3), 458–518. <https://doi.org/10.1071/ZO9620458>
- Suominen, T., Bachinski, L. L., Auvinen, S., Hackman, P., Baggerly, K. A., Angelini, C., Peltonen, L., Krahe, R., & Udd, B. (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), 776–782. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2011.23>
- Sznajder, L. J., Michalak, M., Taylor, K., Cywoniuk, P., Kabza, M., Wojtkowiak-Szlachcic, A., Matloka, M., Konieczny, P., & Sobczak, K. (2016). Mechanistic determinants of MBNL activity. *Nucleic Acids Research*, 44(21), 10326–10342. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw915>
- Sznajder, L. J., Scotti, M. M., Shin, J., Taylor, K., Ivankovic, F., Nutter, C. A., Aslam, F. N., Subramony, S. H., Ranum, L. P. W., & Swanson, M. S. (2020). Loss of MBNL1 induces RNA misprocessing in the thymus and peripheral blood. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15962-x>
- Taliaferro, J. M., Vidaki, M., Oliveira, R., Olson, S., Zhan, L., Saxena, T., Wang, E. T., Graveley, B. R., Gertler, F. B., Swanson, M. S., & Burge, C. B. (2016). Distal Alternative Last Exons Localize mRNAs to Neural Projections. *Molecular Cell*, 61(6), 821–833. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.01.020>
- Tanabe, Y., William, C., & Jessell, T. M. (1998). Specification of motor neuron identity by the MNR2 homeodomain protein. *Cell*, 95(1), 67–80. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81783-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81783-3)
- Taneja, K. L., McCurrach, M., Schalling, M., Housman, D., & Singer, R. H. (1995). Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues. *Journal of Cell Biology*, 128(6), 995–1002. <https://doi.org/10.1083/jcb.128.6.995>
- Tang, Z. Z., Yarotsky, V., Wei, L., Sobczak, K., Nakamori, M., Eichinger, K., Moxley, R. T., Dirksen, R. T., & Thornton, C. A. (2012). Muscle weakness in myotonic dystrophy associated with misregulated splicing and altered gating of Ca v1.1 calcium channel. *Human Molecular Genetics*, 21(6), 1312–1324. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr568>
- Tanner, M. K., Tang, Z., & Thornton, C. A. (2021). Targeted splice sequencing reveals RNA toxicity and therapeutic response in myotonic dystrophy. *Nucleic Acids Research*, 49(4), 2240–2254. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab022>
- Taylor, K., Sznajder, L. J., Cywoniuk, P., Thomas, J. D., Swanson, M. S., & Sobczak, K. (2018). MBNL splicing activity depends on RNA binding site structural context. *Nucleic Acids Research*, 46(17), 9119–9133. <https://doi.org/10.1093/nar/gky565>
- Teplova, M., & Patel, D. J. (2008). Structural insights into RNA recognition by the alternative-splicing regulator muscleblind-like MBNL1. *Nature Structural and Molecular Biology*, 15(12), 1343–1351. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1519>
- Teplova, M., Song, J., Gaw, H. Y., Teplov, A., & Patel, D. J. (2010). Structural Insights into RNA Recognition by the Alternate-Splicing Regulator CUG-Binding Protein 1. *Structure*, 18(10), 1364–1377. <https://doi.org/10.1016/j.str.2010.06.018>
- Terenzi, F., & Ladd, A. N. (2010). Conserved developmental alternative splicing of muscleblind-like (MBNL) transcripts regulates MBNL localization and activity. *RNA Biology*, 7(1), 43–55. <https://doi.org/10.4161/rna.7.1.10401>
- Thomas, J. D., Oliveira, R., Sznajder, L. J., & Swanson, M. S. (2018). Myotonic dystrophy and developmental regulation of RNA processing. *Comprehensive Physiology*, 8(2), 509–553. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170002>
- Thomas, J. D., Sznajder, L. J., Bardhi, O., Aslam, F. N., Anastasiadis, Z. P., Scotti, M. M., Nishino, I., Nakamori, M., Wang, E. T., & Swanson, M. S. (2017). Disrupted prenatal RNA processing and myogenesis in congenital myotonic dystrophy. *Genes and Development*, 31(11), 1122–1133. <https://doi.org/10.1101/gad.300590.117>

- Thompson, D. M., & Buettner, H. M. (2006). Neurite outgrowth is directed by Schwann cell alignment in the absence of other guidance cues. *Annals of Biomedical Engineering*, *34*(1), 161–168. <https://doi.org/10.1007/s10439-005-9013-4>
- Thornton, C. (1999). The Myotonic dystrophies. *Seminars in Neurology*, *19*, 25–33.
- Thornton, C. A., Griggs, R. C., & Moxley, R. T. (1994). Myotonic dystrophy with no trinucleotide repeat expansion. *Annals of Neurology*, *35*(3), 269–272. <https://doi.org/10.1002/ana.410350305>
- Thornton, C. A., Wymer, J. P., Simmons, Z., McClain, C., & Moxley, R. T. (1997). Expansion of the myotonic dystrophy CTG repeat reduces expression of the flanking DMAHP gene. *Nature Genetics*, *16*(4), 407–409. <https://doi.org/10.1038/ng0897-407>
- Tian, B., White, R. J., Xia, T., Welle, S., Turner, D. H., Mathews, M. B., & Thornton, C. A. (2000). Expanded CUG repeat RNAs form hairpins that activate the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *RNA*, *6*(1), 79–87. <https://doi.org/10.1017/S1355838200991544>
- Tieleman, A. A., Den Broeder, A. A., Van De Logt, A. E., & Van Engelen, B. G. M. (2009). Strong association between myotonic dystrophy type 2 and autoimmune diseases. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, *80*(11), 1293–1295. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2008.156562>
- Timchenko, L. (2013). Molecular mechanisms of muscle atrophy in myotonic dystrophies. In *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (Vol. 45, Issue 10, pp. 2280–2287). Int J Biochem Cell Biol. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.06.010>
- Timchenko, L. T. (1999). Human genetics '99: Trinucleotide repeats: Myotonic dystrophy: The role of RNA CUG triplet repeats. *American Journal of Human Genetics*, *64*(2), 360–364. <https://doi.org/10.1086/302268>
- Timchenko, L. T., Miller, J. W., Timchenko, N. A., Devore, D. R., Datar, K. V., Lin, L., Roberts, R., Thomas Caskey, C., & Swanson, M. S. (1996). Identification of a (CUG)(n) triplet repeat RNA-binding protein and its expression in myotonic dystrophy. *Nucleic Acids Research*, *24*(22), 4407–4414. <https://doi.org/10.1093/nar/24.22.4407>
- Timchenko, L. T., Tapscott, S. J., Cooper, T. A., & Monckton, D. G. (2002). Myotonic dystrophy: Discussion of molecular basis. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 516, pp. 27–45). Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0117-6_2
- Timchenko, N. A., Iakova, P., Cai, Z.-J., Smith, J. R., & Timchenko, L. T. (2001). Molecular Basis for Impaired Muscle Differentiation in Myotonic Dystrophy. *Molecular and Cellular Biology*, *21*(20), 6927–6938. <https://doi.org/10.1128/mcb.21.20.6927-6938.2001>
- Timchenko, N. A., Patel, R., Iakova, P., Cai, Z. J., Quan, L., & Timchenko, L. T. (2004). Overexpression of CUG Triplet Repeat-binding Protein, CUGBP1, in Mice Inhibits Myogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(13), 13129–13139. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312923200>
- Todd, P. K., Ackall, F. Y., Hur, J., Sharma, K., Paulson, H. L., & Dowling, J. J. (2014). Transcriptional changes and developmental abnormalities in a zebrafish model of myotonic dystrophy type 1. *DMM Disease Models and Mechanisms*, *7*(1), 143–155. <https://doi.org/10.1242/dmm.012427>
- Tournadre, A., Vial, G., Capel, F., Soubrier, M., & Boirie, Y. (2019). Sarcopenia. *Joint Bone Spine*, *86*(3), 309–314. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2018.08.001>
- Tran-Ladam, H. (2010). *Mécanismes moléculaires associés aux changements d'épissage de Tau dans une tauopathie, la dystrophie myotonique de type 1*. <https://pepite-depot.univ-lille.fr/LIBRE/EDBSL/2010/2010LIL2S037.pdf>

- Tran, H., Gourrier, N., Lemerrier-Neuillet, C., Dhaenens, C. M., Vautrin, A., Fernandez-Gomez, F. J., Arandel, L., Carpentier, C., Obriot, H., Eddarkaoui, S., Delattre, L., Van Brussels, E., Holt, I., Morris, G. E., Sablonnie, B., Buée, L., Charlet-Berguerand, N., Schraen-Maschke, S., Furling, D., ... Sergeant, N. (2011). Analysis of exonic regions involved in nuclear localization, splicing activity, and dimerization of muscleblind-like-1 isoforms. *Journal of Biological Chemistry*, 286(18), 16435–16446. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.194928>
- Turney, S. G., & Lichtman, J. W. (2012). Reversing the outcome of synapse elimination at developing neuromuscular junctions in vivo: Evidence for synaptic competition and its mechanism. *PLoS Biology*, 10(6), e1001352. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001352>
- Udd, B., & Krahe, R. (2012). The myotonic dystrophies: Molecular, clinical, and therapeutic challenges. *The Lancet Neurology*, 11(10), 891–905. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70204-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70204-1)
- Ueda, H., Shimokawa, M., Yamamoto, M., Kameda, N., Mizusawa, H., Baba, T., Terada, N., Fujii, Y., Ohno, S., Ishiura, S., & Kobayashi, T. (1999). Decreased expression of myotonic dystrophy protein kinase and disorganization of sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle of myotonic dystrophy. *Journal of the Neurological Sciences*, 162(1), 38–50. [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(98\)00290-1](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(98)00290-1)
- Ulloa, F., & Martí, E. (2010). Wnt won the war: Antagonistic role of Wnt over Shh controls dorso-ventral patterning of the vertebrate neural tube. *Developmental Dynamics*, 239(1), 69–76. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22058>
- Vainchtein, I. D., Chin, G., Cho, F. S., Kelley, K. W., Miller, J. G., Chien, E. C., Liddelow, S. A., Nguyen, P. T., Nakao-Inoue, H., Dorman, L. C., Akil, O., Joshita, S., Barres, B. A., Paz, J. T., Molofsky, A. B., & Molofsky, A. V. (2018). Astrocyte-derived interleukin-33 promotes microglial synapse engulfment and neural circuit development. *Science*, 359(6381), 1269–1273. <https://doi.org/10.1126/science.aal3589>
- Vaiserman, A., & Lushchak, O. (2019). Geroscience. In *Encyclopedia of Biomedical Gerontology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.62132-3>
- Valdez, G., Tapia, J. C., Kang, H., Clemenson, G. D., Gage, F. H., Lichtman, J. W., & Sanes, J. R. (2010). Attenuation of age-related changes in mouse neuromuscular synapses by caloric restriction and exercise. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(33), 14863–14868. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002220107>
- Vale, R. D., Reese, T. S., & Sheetz, M. P. (1985). Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell*, 42(1), 39–50. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(85\)80099-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(85)80099-4)
- Van Den Bosch, L., Van Damme, P., Bogaert, E., & Robberecht, W. (2006). The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (Vol. 1762, Issues 11–12, pp. 1068–1082). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2006.05.002>
- Venables, J. P., Lapasset, L., Gadea, G., Fort, P., Klinck, R., Irimia, M., Vignal, E., Thibault, P., Prinos, P., Chabot, B., Abou Elela, S., Roux, P., Lemaitre, J. M., & Tazi, J. (2013). MBNL1 and RBFOX2 cooperate to establish a splicing programme involved in pluripotent stem cell differentiation. *Nature Communications*, 4(1), 2480. <https://doi.org/10.1038/ncomms3480>
- Vignaud, A., Ferry, A., Hugué, A., Baraibar, M., Trollet, C., Hyzewicz, J., Butler-Browne, G., Puymirat, J., Gourdon, G., & Furling, D. (2010). Progressive skeletal muscle weakness in transgenic mice expressing CTG expansions is associated with the activation of the ubiquitin-proteasome pathway. *Neuromuscular Disorders*, 20(5), 319–325. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2010.03.006>
- Vihola, A., Bassez, G., Meola, G., Zhang, S., Haapasalo, H., Paetau, A., Mancinelli, E., Rouche, A., Hogrel, J. Y., Laforêt, P., Maisonobe, T., Pellissier, J. F., Krahe, R., Eymard, B., & Udd,

- B. (2003). Histopathological differences of myotonic dystrophy type 1 (DM1) and PROMM/DM2. *Neurology*, *60*(11), 1854–1857. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000065898.61358.09>
- Vlasova-St. Louis, I., Dickson, A. M., Bohjanen, P. R., & Wilusz, C. J. (2013). CELFish ways to modulate mRNA decay. In *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* (Vol. 1829, Issues 6–7, pp. 695–707). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.01.001>
- Vlasova, I. A., Tahoe, N. M., Fan, D., Larsson, O., Rattenbacher, B., SternJohn, J. R., Vasdewani, J., Karypis, G., Reilly, C. S., Bitterman, P. B., & Bohjanen, P. R. (2008). Conserved GU-Rich Elements Mediate mRNA Decay by Binding to CUG-Binding Protein 1. *Molecular Cell*, *29*(2), 263–270. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.024>
- Vohánka, S., Parmová, O., & Strenková, J. (2014). Lower Urinary Tract and Bowel Dysfunction in Patients with Myotonic Dystrophy. *13th International Congress on Neuromuscular Diseases*.
- von Bartheld, C. S., Bahney, J., & Herculano-Houzel, S. (2016). The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *Journal of Comparative Neurology*, *524*(18), 3865–3895. <https://doi.org/10.1002/cne.24040>
- Wakimoto, H., Maguire, C. T., Sherwood, M. C., Vargas, M. M., Sarkar, P. S., Han, J., Reddy, S., & Berul, C. I. (2002). Characterization of cardiac conduction system abnormalities in mice with targeted disruption of Six5 gene. *Journal of Interventional Cardiac Electrophysiology*, *7*(2), 127–135. <https://doi.org/10.1023/A:1020881520353>
- Waldron, D. (2016). Differential regulation of APA isoforms. *Nature Reviews Genetics*, *17*(2), 66–66. <https://doi.org/10.1038/nrg.2015.30>
- Walton, J. N., Irving, D., & Tomlinson, B. E. (1977). Spinal cord limb motor neurons in dystrophin myotonia. *Journal of the Neurological Sciences*, *34*(2), 199–211. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(77\)90068-5](https://doi.org/10.1016/0022-510X(77)90068-5)
- Wang, B., Fallon, J. F., & Beachy, P. A. (2000). Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell*, *100*(4), 423–434. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80678-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80678-9)
- Wang, E. T., Cody, N. A. L., Jog, S., Biancolella, M., Wang, T. T., Treacy, D. J., Luo, S., Schroth, G. P., Housman, D. E., Reddy, S., Lécuyer, E., & Burge, C. B. (2012). Transcriptome-wide regulation of pre-mRNA splicing and mRNA localization by muscleblind proteins. *Cell*, *150*(4), 710–724. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.041>
- Wang, E. T., Ward, A. J., Cherone, J. M., Giudice, J., Wang, T. T., Treacy, D. J., Lambert, N. J., Freese, P., Saxena, T., Cooper, T. A., & Burge, C. B. (2015). Antagonistic regulation of mRNA expression and splicing by CELF and MBNL proteins. *Genome Research*, *25*(6), 858–871. <https://doi.org/10.1101/gr.184390.114>
- Wang, G. S., Kearney, D. L., De Biasi, M., Taffet, G., & Cooper, T. A. (2007). Elevation of RNA-binding protein CUGBP1 is an early event in an inducible heart-specific mouse model of myotonic dystrophy. *Journal of Clinical Investigation*, *117*(10), 2802–2811. <https://doi.org/10.1172/JCI32308>
- Wang, G. S., Kuyumcu-Martinez, M. N., Sarma, S., Mathur, N., Wehrens, X. H. T., & Cooper, T. A. (2009). PKC inhibition ameliorates the cardiac phenotype in a mouse model of myotonic dystrophy type 1. *Journal of Clinical Investigation*, *119*(12), 3797–3806. <https://doi.org/10.1172/JCI37976>
- Wang, J. Y., Chen, F., Fu, X. Q., Ding, C. S., Zhou, L., Zhang, X. H., & Luo, Z. G. (2014). Caspase-3 cleavage of dishevelled induces elimination of postsynaptic structures. *Developmental Cell*, *28*(6), 670–684. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.02.009>
- Wang, L.-H., Lin, C.-Y., Lin, Y.-M., Buée, L., Sergeant, N., Blum, D., Chern, Y., & Wang, G.-S.

- (2022). Calpain-2 Mediates MBNL2 Degradation and a Developmental RNA Processing Program in Neurodegeneration. *The Journal of Neuroscience*, 42(25), 5102–5114. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2006-21.2022>
- Wang, L. C., Chen, K. Y., Pan, H., Wu, C. C., Chen, P. H., Liao, Y. T., Li, C., Huang, M. L., & Hsiao, K. M. (2011). Muscleblind participates in RNA toxicity of expanded CAG and CUG repeats in *Caenorhabditis elegans*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(7), 1255–1267. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0522-4>
- Wang, P. Y., Chang, K. T., Lin, Y. M., Kuo, T. Y., & Wang, G. S. (2018). Ubiquitination of MBNL1 Is Required for Its Cytoplasmic Localization and Function in Promoting Neurite Outgrowth. *Cell Reports*, 22(9), 2294–2306. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.025>
- Wang, P. Y., Lin, Y. M., Wang, L. H., Kuo, T. Y., Cheng, S. J., & Wang, G. S. (2017). Reduced cytoplasmic MBNL1 is an early event in a brain-specific mouse model of myotonic dystrophy. *Human Molecular Genetics*, 26(12), 2247–2257. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx115>
- Wang, W., Li, X., Lee, M., Jun, S., Aziz, K. E., Feng, L., Tran, M. K., Li, N., McCrea, P. D., Park, J. Il, & Chen, J. (2015). FOXKs promote Wnt/ β -catenin signaling by translocating DVL into the nucleus. *Developmental Cell*, 32(6), 707–718. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.01.031>
- Wang, Z. J., & Huang, X. S. (2011). Myotonia of the tongue: Commentary. *New England Journal of Medicine*, 365(15). <https://doi.org/10.1007/bf03369196>
- Ward, A. J., Rimer, M., Killian, J. M., Dowling, J. J., & Cooper, T. A. (2010). CUGBP1 overexpression in mouse skeletal muscle reproduces features of myotonic dystrophy type 1. *Human Molecular Genetics*, 19(18), 3614–3622. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq277>
- Warf, M. B., & Berglund, J. A. (2007). MBNL binds similar RNA structures in the CUG repeats of myotonic dystrophy and its pre-mRNA substrate cardiac troponin T. *RNA (New York, N.Y.)*, 13(12), 2238–2251. <https://doi.org/10.1261/rna.610607>
- Warf, M. B., Diegel, J. V., Von Hippel, P. H., & Berglund, J. A. (2009). The protein factors MBNL1 and U2AF65 bind alternative RNA structures to regulate splicing. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Vol. 106, Issue 23). <https://doi.org/10.1073/pnas.0900342106>
- Webber, C. L., & Pleschka, K. (1976). Structural and functional characteristics of individual phrenic motoneurons. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 364(2), 113–121. <https://doi.org/10.1007/BF00585178>
- Weijts, R., Okkersen, K., van Engelen, B., Küsters, B., Lammens, M., Aronica, E., Raaphorst, J., & van Cappellen van Walsum, A. M. (2021). Human brain pathology in myotonic dystrophy type 1: A systematic review. In *Neuropathology* (Vol. 41, Issue 1, pp. 3–20). <https://doi.org/10.1111/neup.12721>
- Wenninger, S., Montagnese, F., & Schoser, B. (2018). Core clinical phenotypes in Myotonic Dystrophies. In *Frontiers in Neurology* (Vol. 9, Issue MAY, p. 303). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00303>
- Wheeler, T. M., Krym, M. C., & Thornton, C. A. (2007). Ribonuclear foci at the neuromuscular junction in myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul Disorders*, 17(3), 242–247. [https://doi.org/S0960-8966\(07\)00004-1](https://doi.org/S0960-8966(07)00004-1) [pii]\r10.1016/j.nmd.2006.12.015
- Wheeler, T. M., Leger, A. J., Pandey, S. K., MacLeod, A. R., Wheeler, T. M., Cheng, S. H., Wentworth, B. M., Bennett, C. F., & Thornton, C. A. (2012). Targeting nuclear RNA for in vivo correction of myotonic dystrophy. *Nature*, 488(7409), 111–117. <https://doi.org/10.1038/nature11362>
- Wheeler, T. M., Lueck, J. D., Swanson, M. S., Dirksen, R. T., & Thornton, C. A. (2007).

- Correction of CIC-1 splicing eliminates chloride channelopathy and myotonia in mouse models of myotonic dystrophy. *Journal of Clinical Investigation*, 117(12), 3952–3957. <https://doi.org/10.1172/JCI33355>
- Wheeler, T. M., Sobczak, K., Lueck, J. D., Osborne, R. J., Lin, X., Dirksen, R. T., & Thornton, C. A. (2009). Reversal of RNA dominance by displacement of protein sequestered on triplet repeat RNA. *Science*, 325(5938), 336–339. <https://doi.org/10.1126/science.1173110>
- White, E., Schlackow, M., Kamieniarz-Gdula, K., Proudfoot, N. J., & Gullerova, M. (2014). Human nuclear Dicer restricts the deleterious accumulation of endogenous double-stranded RNA. *Nature Structural and Molecular Biology*, 21(6), 552–559. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2827>
- Wilkinson, M. E., Charenton, C., & Nagai, K. (2020). RNA Splicing by the Spliceosome. In *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 89, pp. 359–388). Annu Rev Biochem. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-091719-064225>
- Winegrad, S. (1968). Intracellular calcium movements of frog skeletal muscle during recovery from tetanus. *The Journal of General Physiology*, 51(1), 65–83. <https://doi.org/10.1085/jgp.51.1.65>
- Winters, S. J. (2021). Endocrine Dysfunction in Patients with Myotonic Dystrophy. In *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (Vol. 106, Issue 10, pp. 2819–2827). Oxford Academic. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgab430>
- Witten, J. T., & Ule, J. (2011). Understanding splicing regulation through RNA splicing maps. *Trends in Genetics*, 27(3), 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2010.12.001>
- Wong, C. H., Fu, Y., Ramisetty, S. R., Baranger, A. M., & Zimmerman, S. C. (2011). Selective inhibition of MBNL1-CCUG interaction by small molecules toward potential therapeutic agents for myotonic dystrophy type 2 (DM2). *Nucleic Acids Research*, 39(20), 8881–8890. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr415>
- Wong, L. J. C., Ashizawa, T., Monckton, D. G., Caskey, C. T., & Richards, C. S. (1995). Somatic heterogeneity of the CTG repeat in myotonic dystrophy is age and size dependent. *American Journal of Human Genetics*, 56(1), 114–122.
- Wood, S. J., & R. Slater, C. (2001). Safety factor at the neuromuscular junction. *Progress in Neurobiology*, 64(4), 393–429. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(00\)00055-1](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(00)00055-1)
- Wright, M. C., Potluri, S., Wang, X., Dentcheva, E., Gautam, D., Tessler, A., Wess, J., Rich, M. M., & Son, Y. J. (2009). Distinct muscarinic acetylcholine receptor subtypes contribute to stability and growth, but not compensatory plasticity, of neuromuscular synapses. *Journal of Neuroscience*, 29(47), 14942–14955. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2276-09.2009>
- Wright, R. B., Yoder, D. M., Costa, J. L., & Andriacchi, T. P. (1995). Characterization of gait parameters in adult-onset myotonic dystrophy: Abnormal hip motion. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 76(1), 33–38. [https://doi.org/10.1016/S0003-9993\(95\)80039-5](https://doi.org/10.1016/S0003-9993(95)80039-5)
- Xie, Z., Samuels, B. A., & Tsai, L. H. (2006). Cyclin-dependent kinase 5 permits efficient cytoskeletal remodeling - A hypothesis on neuronal migration. *Cerebral Cortex*, 16(SUPPL. 1), i64–i68. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhj170>
- Yadava, R. S., Frenzel-McCardell, C. D., Yu, Q., Srinivasan, V., Tucker, A. L., Puymirat, J., Thornton, C. A., Prall, O. W., Harvey, R. P., & Mahadevan, M. S. (2008). RNA toxicity in myotonic muscular dystrophy induces NKX2-5 expression. *Nature Genetics*, 40(1), 61–68. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.28>
- Yadava, R. S., Yu, Q., Mandal, M., Rigo, F., Bennett, C. F., & Mahadevan, M. S. (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), 1440–1453. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddaa060>

- Yamagata, H., Miki, T., Sakoda, S. Ichi, Yamanaka, N., Davies, J., Shelbourne, P., Kubota, R., Takenaga, S., Nakagawa, M., Ogihara, T., & Johnson, K. (1994). Detection of a premutation in Japanese myotonic dystrophy. *Human Molecular Genetics*, 3(5), 819–820. <https://doi.org/10.1093/hmg/3.5.819>
- Yilmaz, A., Kattamuri, C., Ozdeslik, R. N., Schmiedel, C., Mentzer, S., Schorl, C., Oancea, E., Thompson, T. B., & Fallon, J. R. (2016). MuSK is a BMP co-receptor that shapes BMP responses and calcium signaling in muscle cells. *Science Signaling*, 9(444), ra87. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaf0890>
- Yin, Q., Wang, H., Li, N., Ding, Y., Xie, Z., Jin, L., Li, Y., Wang, Q., Liu, X., Xu, L., Li, Q., Ma, Y., Cheng, Y., Wang, K., Zhong, C., Yu, Q., Tang, W., Chen, W., Yang, W., ... Li, J. (2019). Dosage effect of multiple genes accounts for multisystem disorder of myotonic dystrophy type 1. *Cell Research*, November. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0264-2>
- Yoshida, K., Aburakawa, Y., Suzuki, Y., Kuroda, K., & Kimura, T. (2018). The Frequency and Risk Factors for Ischemic Stroke in Myotonic Dystrophy Type 1 Patients. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 27(4), 914–918. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.10.030>
- Young, N. P., Daube, J. R., Sorenson, E. J., & Milone, M. (2010). Absent, unrecognized, and minimal myotonic discharges in myotonic dystrophy type 2. *Muscle and Nerve*, 41(6), 758–762. <https://doi.org/10.1002/mus.21615>
- Yu, H., Laberge, L., Jaussent, I., Bayard, S., Scholtz, S., Morales, R., Pages, M., & Dauvilliers, Y. (2011). Daytime sleepiness and REM sleep characteristics in myotonic dystrophy: A case-control study. *Sleep*, 34(2), 165–170. <https://doi.org/10.1093/sleep/34.2.165>
- Yu, Z., & Bonini, N. M. (2011). Modeling human trinucleotide repeat diseases in drosophila. *International Review of Neurobiology*, 99, 191–212. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387003-2.00008-2>
- Yuan, Y., Compton, S. A., Sobczak, K., Stenberg, M. G., Thornton, C. A., Griffith, J. D., & Swanson, M. S. (2007). Muscleblind-like 1 interacts with RNA hairpins in splicing target and pathogenic RNAs. *Nucleic Acids Research*, 35(16), 5474–5486. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm601>
- Yumoto, N., Kim, N., & Burden, S. J. (2012). Lrp4 is a retrograde signal for presynaptic differentiation at neuromuscular synapses. *Nature*, 489(7416), 438–442. <https://doi.org/10.1038/nature11348>
- Zatz, M., Passos-bueno, M. R., Cerqueira, A., Marie, S. K., Vainzof, M., & Pavanello, R. C. M. (1995). Analysis of the CTG repeat in skeletal muscle of young and adult myotonic dystrophy patients: When does the expansion occur? *Human Molecular Genetics*, 4(3), 401–406. <https://doi.org/10.1093/hmg/4.3.401>
- Zhang, B., Liang, C., Bates, R., Yin, Y., Xiong, W.-C., & Mei, L. (2012). Wnt proteins regulate acetylcholine receptor clustering in muscle cells. *Molecular Brain*, 5(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-5-7>
- Zhang, B., Luo, S., Wang, Q., Suzuki, T., Xiong, W. C., & Mei, L. (2008). LRP4 Serves as a Coreceptor of Agrin. *Neuron*, 60(2), 285–297. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.006>
- Zhang, F., Bodycombe, N. E., Haskell, K. M., Sun, Y. L., Wang, E. T., Morris, C. A., Jones, L. H., Wood, L. D., & Pletcher, M. T. (2017). A flow cytometry-based screen identifies MBNL1 modulators that rescue splicing defects in myotonic dystrophy type I. *Human Molecular Genetics*, 26(16), 3056–3068. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx190>
- Zhou, H., Glass, D. J., Yancopoulos, G. D., & Sanes, J. R. (1999). Distinct domains of MuSK mediate its abilities to induce and to associate with postsynaptic specializations. *Journal of Cell Biology*, 146(5), 1133–1146. <https://doi.org/10.1083/jcb.146.5.1133>

- Zhou, Q., & Anderson, D. J. (2002). The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification. *Cell*, *109*(1), 61–73. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00677-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00677-3)
- Zong, Y., Zhang, B., Gu, S., Lee, K., Zhou, J., Yao, G., Figueiredo, D., Perry, K., Mei, L., & Jin, R. (2012). Structural basis of agrin-LRP4-MuSK signaling. *Genes and Development*, *26*(3), 247–258. <https://doi.org/10.1101/gad.180885.111>
- Zu, T., Cleary, J. D., Liu, Y., Bañez-Coronel, M., Bubenik, J. L., Ayhan, F., Ashizawa, T., Xia, G., Clark, H. B., Yachnis, A. T., Swanson, M. S., & Ranum, L. P. W. (2017). RAN Translation Regulated by Muscleblind Proteins in Myotonic Dystrophy Type 2. *Neuron*, *95*(6), 1292–1305.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.08.039>
- Zu, T., Gibbens, B., Doty, N. S., Gomes-Pereira, M., Huguet, A., Stone, M. D., Margolis, J., Peterson, M., Markowski, T. W., Ingram, M. A. C., Nan, Z., Forster, C., Low, W. C., Schoser, B., Somia, N. V., Clark, H. B., Schmechel, S., Bitterman, P. B., Gourdon, G., ... Ranum, L. P. W. (2011). Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(1), 260–265. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013343108>

Annexes à l'article en préparation

Annexe – Vidéos de locomotion des souris

- 1) Vidéo de la locomotion d'une souris CTL âgée de 2 mois – CatWalk
- 2) Vidéo de la locomotion d'une souris Mbnl1-KO âgée de 2 mois – CatWalk
- 3) Vidéo de la locomotion d'une souris dKO âgée de 2 mois – CatWalk
- 4) Vidéo de la locomotion d'une souris CTL âgée de 4 mois – Catwalk
- 5) Vidéo de la locomotion d'une souris Mbnl1-KO âgée de 4 mois – CatWalk
- 6) Vidéo de la locomotion d'une souris dKO âgée de 4 mois – CatWalk

Annexe – Tables supplémentaires

- 1) Tables supplémentaires S1 à S4 – Analyse de l'épissage alternatif associée au séquençage ARN
- 2) Tables supplémentaires S5 à S7 – Analyse EnrichR

Table des figures

Figure 1 : Représentation schématique du gène <i>DMPK</i>	8
Figure 2 : Catégories de patients DM1 et principaux symptômes associés.....	9
Figure 3 : Phénomène d'anticipation entre les générations mis en évidence par une famille atteinte de DM1.....	10
Figure 4 : Représentation schématique du gène <i>CNBP</i>	11
Figure 5 : Principaux symptômes associés à la DM2.....	12
Figure 6 : Symptômes plurisystémiques de la DM.....	13
Figure 7 : La myotonie chez les patients DM.....	14
Figure 8 : Défauts histologiques du muscle squelettique chez les patients DM1 et DM2.....	16
Figure 9 : Foci ARN dans la DM1 et la DM2.....	22
Figure 10 : MBNL est séquestré par les foci ARN dans le noyau des cellules DM.....	25
Figure 11 : Mécanismes pathologiques principaux de la DM.....	27
Figure 12 : Gènes <i>MBNL1</i> , <i>MBNL2</i> et <i>MBNL3</i> et transcrits associés chez les vertébrés.....	43
Figure 13 : Niveaux relatifs d'expression des ARNm des gènes <i>MBNL1</i> , <i>MBNL2</i> et <i>MBNL3</i> dans différents tissus.....	44
Figure 14 : Représentation schématique du mécanisme d'épissage alternatif.....	52
Figure 15 : Représentation schématique de l'effet de la liaison de MBNL sur l'épissage alternatif de ses cibles.....	53
Figure 16 : Représentation schématique de l'effet de la liaison de MBNL sur le choix du site de polyadénylation de ses cibles.....	55
Figure 17 : Représentation schématique du rôle de MBNL sur la localisation des ARNm.....	57
Figure 18 : Représentation schématique du faisceau corticospinal.....	60
Figure 19 : Connexions synaptiques d'un MN somatique.....	62
Figure 20 : Génération des domaines progéniteurs du tube neural.....	63
Figure 21 : Segmentation en colonnes des domaines motoneuronaux de la moelle épinière...65	
Figure 22 : Représentation schématique de la transmission synaptique entre un MN supérieur et un MN spinal.....	68
Figure 23 : Représentation schématique de la génération du potentiel de plaque à la JNM....	72
Figure 24 : Marquages de la JNM de la souris.....	75
Figure 25 : Représentation schématique du déclenchement de la voie de signalisation Agrine-Lrp4-MuSK.....	77

Figure 26 : Evolution morphologique de la JNM au cours du développement	80
Figure 27 : Représentation schématique du couplage excitation-contraction	84
Figure 28 : JNM des souris Hb9Cre-Mbnl2-KO de 1 an	123
Figure 29 : L'injection d'AAV-shMBNL provoque la diminution importante de Mbnl1 et Mbnl2 spécifiquement dans le muscle squelettique.....	126
Figure 30 : La déplétion simultanée de Mbnl1 et Mbnl2 dans le muscle squelettique adulte induit des défauts structuraux progressifs de la JNM.....	128
Figure 31 : La perte de MBNL dans le muscle squelettique n'induit pas de défauts manifestes de la communication neuromusculaire.....	130
Figure 32 : Les JNM des souris HSA ^{LR} reproduisent certains défauts postsynaptiques des souris déplétées de MBNL dans le muscle squelettique	132
Figure 33 : La perte de Mbnl1 et Mbnl2 spécifiquement dans les MNs induit l'inclusion de l'exon 35 de l'agrine.....	143
Figure 34 : La perte de MBNL dans l'unité motrice n'altère pas l'homéostasie de l'AChE .	149

Table des tableaux

Tableau 1 : Événements d'épissage alternatif altérés et associés aux symptômes de la DM.	29
Tableau 2 : Modèles murins avec répétitions CTG.....	38
Tableau 3 : Modèles murins d'expression de MBNL et CELF1.....	39
Tableau 4 : Stratégies thérapeutiques pour la DM1.....	41

Abréviations

α -BTX : α -bungarotoxine
AAV : Adénovirus adéno-associé
ACh : Acétylcholine
AChE : Acétylcholine estérase
ALE : Exons terminaux alternatifs
AMP : Adénosine monophosphate
AMPA : Acide propionique α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole
AMPK : Kinase activée par l'AMP
APA : *Alternative cleavage and polyadenylation*
APP : Protéines précurseurs de l'amyloïde
ASO : Oligonucléotides antisens
ATP : Adénosine triphosphate
BIN1 : Protéine 1 d'interaction dépendante de la boîte myc
BMP : *bone morphogenetic protein family*
CACNA1C : Sous-unité alpha 1C du canal calcique voltage-dépendant
CACNA1D : Sous-unité alpha 1D du canal calcique voltage-dépendant
CACNA1S : Sous-unité alpha 1S du canal calcique voltage-dépendant
CaMKII : Kinase II dépendant de Ca^{2+} /calmoduline
CAPN2 : Calpain-2
CDK : kinase cycline-dépendante
CELF : CUGBP Elav-like family member
ChAT : Choline acétyltransférase
CHRNE : Sous-unité epsilon du RACH
CHRNG : Sous-unité gamma du RACH
CLASP : Cytoplasmic Linker Associated Protein
CLC-1/CLCN1 : Canal chlorure 1 voltage-dépendant
CLIP-Seq : Cross-linking and immunoprecipitation sequencing
CMAP : *Compound muscle action potential*
CNBP : CCHC-type zinc finger nucleic acid binding
CNS : Système nerveux central
ColQ : Collagène Q
CRISPR : Clustered, regularly interspersed palindromic repeats
CSEs : Cellules souches embryonnaires
CTL : Contrôle
DDX : DEAD box protein
DGC : Complexe glycoprotéique associé à la dystrophine
DHPR : Récepteur à la dihydropyridine
dKO : Double KO
DM : Dystrophie myotonique
DM1 : Dystrophie myotonique de type 1
DM2 : Dystrophie myotonique de type 2
DMD : Dystrophine ou dystrophie musculaire de Duchenne
DMPK : Dystrophia myotonia protein kinase
DMWD : DM1 locus, WD repeat containing
Dok7 : *Docking Protein 7*
Dvl1 : *Dishevelled Segment Polarity Protein 1*
ECG : Électrocardiogramme
EGFP : Enhanced green fluorescent protein

eIF2 : Facteur eukaryote d'initiation 2
 EMG : Électromyogramme
 Ex. : Exon
 Ex. alt : Exon alternatif
 FDR : *False discovery rate*
 FISH : Hybridation fluorescente *in situ*
 FOXP1 : Forkhead box protein 1
 GDNF : Facteur extrinsèque neurotrophique des cellules gliales
 GJA1 : Protéine alpha-1 des jonctions communicantes
 GLI : *GLI-Kruppel family*
 GRIN 1 : Glutamate Receptor Ionotropic N-Methyl D-Aspartate de type 1
 GRP1 : Glutamate Receptor Interacting Protein 1
 GSK3 β : Glycogène kinase synthase 3 beta
 Hb9 : Homeobox 9
 hcTnT : Troponine cardiaque humaine
 HDAC : Histone deacetylase
 HMC : Colonne hypaxiale motrice
 hnRNP : heterogeneous nuclear ribonucleoproteine
 HOX : Famille homeobox
 HSA^{LR} : Actine squelettique humaine longues répétitions
 INSR : Récepteur à l'insuline
 JNM : Jonction neuromusculaire
 KA : Kainate
 KIF : Kinesin-like protein
 KO : Knockout
 LDB3 : Protéine à domaine de liaison LIM 3
 LIF : Facteur inhibiteur de la leucémie
 LMC : Colonne latérale motrice
 Lrp4 : *low-density lipoprotein receptor-related protein 4*
 MAPT : Protéine Tau associée aux microtubules
 Mbl : Muscleblind
 MBNL : Muscleblind-like
 MEF2 : Myocyte enhancer factor-2
 MET/TEM : Microscopie électronique à transmission
 MMC : Colonne médiane motrice
 MN : Motoneurone
 MT : Microtubule
 mTORC1 : *Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase complex 1*
 MuSK : Kinase muscle-spécifique
 MYH6 : Chaîne lourde de la myosine
 Myo : Myogénine
 MyoD : Myoblast determination protein 1
 NEUROG2 : Neurogénine 2
 NF : Neurofilament
 NKK2-5 : NK2 homeobox 5
 NMD : *nonsense-mediated mRNA decay*

NMDA : Acide N-méthyl-D-aspartique
NMDAR : Récepteur au NMDA
Nrg1 : Neuréguline 1
OLIG1&2 : Protéines 1 et 2 facteurs de transcription des oligodendrocytes
OPCs : Progéniteurs d'oligodendrocytes
pA : Polyadénylation
PCP : *Planar cell polarity*
PGC : Colonne préganglionique motrice
PH : Domaine d'homologie aux pleckstrines
PI : Post-injection
PITCH1 : *patched homolog 1 receptor*
PKC : Protéine kinase C
PKM2 : Pyruvate kinase musculaire 2
PMC : Colonne phrénique motrice
PMO : Morpholino oligonucleotides phosphorodiamidate
PROMM : Dystrophie myotonique proximale
PTB : Domaine de liaison aux phosphotyrosines
PTIX2 : Paired like homeodomain 2
RA : Acide rétinoïque
RACH/AChR : Récepteur à l'acétylcholine
RAR γ : Récepteur gamma à l'acide rétinoïque
RBFOX : RNA binding Fox-1 homolog
RBP : Protéine de liaison à l'ARN
RGS4 : *regulator of G protein signaling 4*
RNP : Ribonucléoprotéine
RS : Réticulum sarcoplasmique
RYR1 : Récepteur à la ryanodine
SAC : Colonne spinale accessoire
SC : Moelle épinière
SCIA : Nerf sciatique
SCN5A : Sous-unité alpha du canal sodique voltage dépendant V
SERCA/ATP2A1 : Pompe ATPase calcique du réticulum sarcoplasmique
SHARP : Protéine de répression associée à SMRT/HDAC1
SHH : *Sonic hedgehog morphogen*
shmiR : Petit miARN en épingle à cheveux
SIX5 : SIX homeobox 5
SLA : Sclérose latérale amyotrophique
SMO : *smoothened homolog*
SMRT : Silencing mediator for retinoid and thyroid receptors
SNARE : *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptor*
SNP : Système nerveux périphérique
SORBS : *Sorbin And SH3 Domain Containing*
SP1 : Specificity protein 1
Spag9 : kinase c-jun-amino-terminale
STAUFEN1 : Staufen homolog 1
SUPT4H1 : SPT4 Homolog, DSIF Elongation Factor Subunit
Syn : Synaptophysine
TA : Tibialis antérieur
TALEN : Transcription activator-like effector nucleases
TANC2 : Tetratricopeptide Repeat, Ankyrin Repeat And Coiled-Coil Containing 2
tSC : Cellule de Schwann terminale

Tubules T : Tubules transverses

Wls : Médiateur de sécrétion du ligand Wnt

Wnt : wntless-type MMTV integration site family

ZnF : Doigt-de-zinc

ZNF9 : CNBP

Résumé :

La dystrophie myotonique de type 1 (DM1) est une maladie rare héréditaire avec des atteintes musculaires, cardiaques et cognitives. La DM1 est due à des expansions de répétitions CTG dans la partie 3'UTR du gène *DMPK*. Les ARN *DMPK* mutés s'agrègent et séquestrent les protéines de liaison à l'ARN Muscleblind-like (MBNL), menant à des anomalies du métabolisme des ARNs dans plusieurs tissus. La famille MBNL est composée de MBNL1, 2 et 3 mais seuls MBNL1 et 2 sont exprimés dans le système nerveux. Alors que le muscle est largement étudié dans la DM1, des études antérieures suggèrent également une altération de la communication entre les motoneurons (MNs) et le muscle squelettique via la jonction neuromusculaire (JNM). Pour déterminer le rôle des protéines MBNL dans les MNs, nous avons généré des souris MN-dKO invalidées pour *Mbnl2* spécifiquement dans les MNs (MN-*Mbnl2*-KO) avec une déplétion constitutive de *Mbnl1* (*Mbnl1*-KO). Les souris MN-*Mbnl2*-KO ne présentent pas de phénotype, cependant les souris MN-dKO développent progressivement des défauts de coordination par rapport aux souris *Mbnl1*-KO. Chez les souris âgées de 4 mois, les troubles moteurs des souris MN-dKO s'accompagnent d'anomalies structurales et ultrastructurales sévères et globales de la JNM. A contrario, les altérations de la JNM des souris *Mbnl1*-KO semblent cantonnées à la partie post-synaptique. Ainsi, la perte de *Mbnl1* et *Mbnl2* dans les MNs aggrave les altérations de la JNM causées par la perte de *Mbnl1* seul. Une analyse plus précoce chez des souris âgées de 2 mois a permis de montrer que les JNM des souris MN-dKO présentent des défauts structuraux par rapport aux JNM des souris contrôles mais aussi *Mbnl1*-KO. En revanche, et malgré leur aspect anormal, les JNM des souris MN-dKO de 2 mois sont matures. Ces résultats suggèrent que les protéines MBNL1 et MBNL2 jouent un rôle dans le maintien des JNM et que les conséquences de la perte de *Mbnl1* et *Mbnl2* dans les MNs sont plus sévères, globales et se manifestent plus précocement que celles de la perte de *Mbnl1* seul.

Afin d'identifier les cibles dérégulées par la perte de *Mbnl1* et/ou *Mbnl2* dans les MNs, un séquençage ARN à haut-débit, associé à une analyse bio-informatique de l'épissage alternatif, a été réalisé à partir d'ARN extrait de moelles épinières lombaires des souris MN-dKO, MN-*Mbnl2*-KO, *Mbnl1*-KO et contrôles âgées de 4 mois. Cette analyse a mis en évidence de nombreuses cibles spécifiques aux souris MN-dKO, et donc à la perte conjointe de *Mbnl1* et *Mbnl2*. De manière intéressante, l'analyse GO-Term des ARN cibles communs aux souris MN-dKO et MN-*Mbnl2*-KO ou *Mbnl1*-KO a permis de montrer que la perte de MBNL2 affecte la maturation de gènes impliqués dans le transport de neurotransmetteurs ou l'amarrage des vésicules synaptiques alors que la perte de MBNL1 affecte la maturation de gènes impliqués dans les processus d'endocytose. Ainsi, MBNL1 et MBNL2 seraient impliqués dans des processus différents au sein des MN.

Afin de compléter l'étude du rôle des protéines MBNL dans la maintenance de la JNM et de la communication neuromusculaire, des souris WT adultes ont été injectées avec des *adeno-associated adenovirus*

exprimant un shmiR ciblant Mbnl1 et Mbnl2 spécifiquement dans le muscle squelettique. 2 mois post-injection (PI), les JNMs de ces souris récapitulent en partie les anomalies observées chez les souris Mbnl1-KO âgées de 4 mois, confirmant un rôle de Mbnl1 dans le muscle squelettique sur le maintien de la JNM. Ces anomalies post-synaptiques s'étendent progressivement au côté présynaptique de la jonction 4 mois PI. Cette aggravation confirme le rôle de MBNL1 dans le muscle squelettique sur le maintien de la JNM.

L'ensemble de mes travaux de thèse soulignent l'importance des protéines MBNL dans les MNs pour la communication neuromusculaire et suggèrent, pour la première fois, que la perte de MBNL dans les MNs pourrait contribuer à la physiopathologie musculaire de la DM1.

Mots clés : MBNL – Motoneurone – Dystrophie myotonique – Jonction neuromusculaire – Modèle de souris – ARN

MBNL loss in motoneurons: impact on motor unit function in Myotonic Dystrophy

Abstract:

Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is a rare inherited disease with muscle, heart and cognitive impairments. DM1 is caused by CTG repeat expansions in the 3'UTR of the DMPK gene. DMPK mutated RNAs aggregate and sequester Muscleblind-like RNA (MBNL) binding proteins, leading to RNA metabolism abnormalities in several tissues. The MBNL family is composed of MBNL1, 2 and 3 but only MBNL1 and 2 are expressed in the nervous system. While skeletal muscle has been extensively studied in DM1, previous reports also suggest an impairment of communication between motor neurons (MNs) and skeletal muscle through the neuromuscular junction (NMJ) in DM1. To determine the role of MBNL proteins in MNs, we generated MN-dKO mice invalidated for Mbnl2 specifically in MNs (MN-Mbnl2-KO) in a Mbnl1 null background (Mbnl1-KO). MN-Mbnl2-KO mice don't manifest a phenotype, however MN-dKO mice progressively develop coordination defects compared to Mbnl1-KO mice. In 4-month-old mice, MN-dKO mice motor disorders are accompanied by severe and global structural and ultrastructural abnormalities of the NMJ. In contrast, Mbnl1-KO mice NMJ alterations seem to be confined to the post-synaptic part. Thus, the loss of Mbnl1 and Mbnl2 in MNs exacerbates NMJ alterations caused by the loss of Mbnl1 alone. Interestingly, NMJs from younger MN-dKO mice exhibit early structural defects compared to NMJs from control and Mbnl1-KO mice, which are unaffected. However, and despite their abnormal appearance, NMJs of MN-dKO mice are mature at this age. These results suggest that MBNL1 and MBNL2 proteins play a role in the NMJ maintenance. Furthermore, defects caused by the Mbnl1 and Mbnl2 loss in MNs are more severe, global but also manifest earlier than those caused by the loss of Mbnl1 alone.

In order to identify RNA targets deregulated by the loss of Mbnl1 and/or Mbnl2 in MNs, we conducted high-throughput RNA sequencing, using RNA extracts from lumbar spinal cords of 4 months old MN-dKO; MN-Mbnl2-KO; Mbnl1-KO and control mice. An alternative splicing analysis revealed numerous targets specific to MN-dKO mice, thus due to the simultaneous loss of Mbnl1 and Mbnl2. Interestingly, GO-Term analysis of RNA targets common to MN-dKO and MN-Mbnl2-KO or Mbnl1-KO mice showed that MBNL2 loss in MNs affects the maturation of genes involved in neurotransmitter transport or synaptic vesicle docking whereas MBNL1 loss affects the maturation of genes involved endocytosis processes. Thus, MBNL1 and MBNL2 may be involved in different processes in MNs.

To complete the study of the role of MBNL proteins in NMJ and neuromuscular communication maintenance, adult WT mice were injected with adeno-associated adenovirus expressing a shmiR targeting Mbnl1 and Mbnl2 specifically in skeletal muscle. 2 months post-injection (PI), NMJs from these mice partly recapitulated NMJ defects observed in 4-month-old Mbnl1-KO mice, confirming a role for Mbnl1 in skeletal muscle on JNM maintenance. These postsynaptic abnormalities progressively extend to the

presynaptic side of the junction 4 months PI. This aggravation confirms the role of MBNL1 in skeletal muscle on NMJ maintenance.

The whole of my thesis work highlights the importance of MBNL proteins in MNs for neuromuscular communication. My work suggests, for the first time, that MBNL loss in MNs may contribute to DM1 muscle pathophysiology.

Keywords: MBNL – Motoneuron – Myotonic dystrophy – Neuromuscular junction – Mouse model – RNA