

UNIVERSITE D'EVRY VAL ESSONNE
Ecole doctorale « Des génomes aux organismes »



THESE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'EVRY VAL D'ESSONNE
Spécialité
Biologie Cellulaire et Moléculaire

Etudes des mécanismes moléculaires de la Dystrophie
Myotonique de type 1 à l'aide de cellules souches embryonnaires
humaines porteuses de la mutation causale

Morgane Gauthier

Dr. Javier Perea, Président
Dr. Nicolas Charlet-Berguerand, Rapporteur
Dr. John De Vos, Rapporteur
Dr. Vincent Mouly, Examineur
Dr. Patricia Gaspar, Examineur
Dr. Marc Peschanski, Co-Directeur de thèse
Dr. Cécile Martinat, Co-Directeur de thèse



Sommaire

Sommaire	1
Liste des figures et tableaux	4
Liste des abréviations	6
Avant-propos	8
Introduction	10
1. Présentation générale de la Dystrophie myotonique de type 1	11
1.1. Généralités.....	11
1.2. Epidémiologie	11
1.3. Les différentes formes de la DM1	12
1.3.1. La forme tardive	12
1.3.2. La forme adulte	13
1.3.3. La forme juvénile	13
1.3.4. La forme congénitale.....	13
1.4. Identification de la mutation responsable de la DM1	15
1.4.1. Historique	15
1.4.2. Implication du gène <i>DMPK</i>	16
1.4.3. Mécanisme d'instabilité des répétitions CTG	17
1.4.4. Anticipation génétique	19
2. Compréhension des mécanismes moléculaires de la DM1 grâce à la modélisation pathologique	20
2.1. Hypothèses du mécanisme d'action de la mutation	20
2.1.1. L'haplo-insuffisance en <i>DMPK</i>	20
2.1.2. Implication des gènes adjacents à <i>DMPK</i>	21
2.1.3. Gain de fonction toxique de l'ARNm	22
2.1.3.1. Altération des protéines de liaison à l'ARN dans la DM1	31
2.1.3.1.1. La famille des Muscleblind (MBNLs)	33
2.1.3.1.1.1. Mécanismes moléculaires des MBNLs.....	33
2.1.3.1.1.2. Altération de MBNL1 dans la DM1	33

2.1.3.1.1.3.	Les conséquences de l'altération de MBNL1 dans l'épissage alternatif.....	34
2.1.3.1.2.	Les CELFs	36
2.1.3.1.2.1.	Mécanismes moléculaires des CELFs	37
2.1.3.1.2.2.	Altération de CUGBP1 et d'ETR3 dans la DM1	37
2.1.3.1.2.2.1.	Rôle dans l'épissage alternatif.....	40
2.1.3.1.2.2.2.	Rôle dans la traduction des ARNm	40
2.1.3.1.2.2.3.	Rôle dans la stabilité des ARNm.....	41
2.1.3.1.3.	Interaction de MBNL1 et CELFs	41
2.2.	Exemple de deux atteintes de la DM1 l le muscle squelettique et le système nerveux central.....	44
2.2.1.	Le muscle squelettique	44
2.2.1.1.	Organisation générale du muscle squelettique.....	44
2.2.1.2.	La myogenèse et la réparation musculaire.....	45
2.2.1.2.1.	La myogenèse embryonnaire.....	45
2.2.1.2.2.	La réparation musculaire adulte	47
2.2.1.2.3.	Les facteurs de régulation myogénique.....	49
2.2.1.2.3.1.	Les MRFs.....	49
2.2.1.2.3.2.	Les facteurs Pax3 et Pax7	50
2.2.1.2.3.3.	Les facteurs Six1 et Six4.....	51
2.2.1.3.	Altération musculaire dans la DM1	52
2.2.2.	Altérations neurales dans la DM1	54
2.2.2.1.	Visualisation des altérations grâce à l'imagerie médicale	55
2.2.2.2.	Les modèles DM1 pour comprendre les altérations neurales	56
2.3.	Axes thérapeutiques de la DM1	58
2.3.1.	Cibler les expansions CTG de l'ADN DMPK et leurs instabilités	58
2.3.2.	Cibler les expansions CUG des ARNs DMPK mutantes.....	59
2.3.3.	Cibler la liaison protéine/ARNs	61
2.3.4.	Favoriser l'export cytoplasmique des ARNm mutés	62
2.3.5.	Restauration du niveau d'expression fonctionnel des protéines de liaison à l'ARN.....	62

2.3.5.1.	Surexpression de MBNL1	63
2.3.5.2.	Réduction de l'activité de CUGBP1	63
2.3.6.	Restauration d'épissages alternatifs spécifiques	63
2.3.7.	Symptomatologie	64
3.	Utilisation des cellules souches embryonnaires humaines pour la modélisation pathologique de la DM1	66
3.1.	Origine des hESC	66
3.1.1.	Dérivation et culture des hESC	67
3.1.2.	Facteurs de régulation de la balance auto-renouvellement/différenciation	68
3.2.	Cadre législatif français encadrant la recherche sur les cellules souches humaines pluripotentes.....	71
3.3.	Utilisation des cellules souches comme modèle pathologique	72
3.3.1.	Le diagnostique pré-implantatoire	72
3.3.2.	Revue : "Human pluripotent stem cells for genetic disease modeling and drug screening" (Gauthier <i>et al</i> 2011).....	73
3.4.	Modélisation pathologique de la DM1 à I-STEM	89
3.4.1.	Dérivation de progéniteurs d'intérêts pour DM1	90
3.4.2.	Etude transcriptomique comparative.....	92
	Résultats	94
1.	Identification d'un facteur de transcription à domaine Krab participant aux altérations myogéniques de la DM1	95
1.1.	Article 1 : " <i>A defective Krab-domain zinc finger transcription factor contributes to altered myogenesis in myotonic dystrophy type 1</i> ".Gauthier <i>et al</i>	98
2.	Identification d'un nouveau défaut d'épissage associé à la DM1 affectant l'expression du récepteur aux Ephrines A5 (EphA5)	127
2.1.	Article 2 : " <i>Abnormal expression of the axonal guidance cue Ephrin-A5 receptor in Myotonic Dystrophy Type1</i> ".Gauthier <i>et al</i>	133
	Conclusions	144
	Discussion et perspectives.....	153
	Références	161

Listes des figures et tableaux

- Figure 1** : Présentation d'une famille de malades DM1.
- Figure 2** : Les différentes formes de la DM1
- Figure 3** : Photographie du Dr. Hans Steinert
- Figure 4** : La DMPK et ses gènes adjacents
- Figure 5** : Organisation du locus *DMPK* humain
- Figure 6** : Analogie de la pathogenèse moléculaire entre la DM1 et la DM2
- Figure 7** : Les transgènes CUG des modèles de la DM1
- Figure 8** : Effet antagoniste des CUGBP1 et MBNL1 au cours du développement et dans la transition des épissages adultes/foetaux dans la DM1
- Figure 9** : Principe du « *RAN-Translation* »
- Figure 10** : Histopathologie générale de la DM1
- Figure 11** : Organisation du muscle squelettique
- Figure 12** : La myogenèse embryonnaire
- Figure 13** : L'auto-renouvellement et de la différenciation des progéniteurs Pax3/Pax7
- Figure 14** : Mécanismes de la réparation musculaire
- Figure 15** : Rôle de pax3 et pax7 dans la régulation des progéniteurs musculaires et du programme myogénique
- Figure 16** : Organisation spatio-temporel des MRFs
- Figure 17** : Comparaison de l'expression des marqueurs myogéniques dans le muscle normal en développement (step1-3) et dans les amas sarcoplasmiques DM1
- Figure 18** : Hyperarborisation neuritique dans des motoneurons DM1 issue d'hESC
- Figure 19** : Conséquences de l'insertion de répétitions CTG dans des PC12 différenciés
- Figure 20** : Les différentes stratégies thérapeutiques actuelles de la DM1
- Figure 21** : Le développement précoce de l'embryon humain au cours de la première semaine
- Figure 22** : Les voies de différenciation et de pluripotence des ESC
- Figure 23** : Modèle du réseau de signalisation de l'auto-renouvellement et de la différenciation des hESC
- Figure 24** : Stratégie de mon projet de thèse à I-STEM
- Figure 25** : Protocole de différenciation des hESC en MPC
- Figure 26** : Protocole de différenciation des hESC en NPC
- Figure 27** : Les NPC et MPC dérivés d'hESC présentent des marqueurs de la DM1
- Figure 28** : Voie de signalisation des récepteurs aux Ephrines
- Figure 29** : Premières observations de la voie de signalisation de l'EphA5 dans des biopsies corticales de patients DM1
- Figure 30** : Défaut d'expression de l'EphA5 et de son variant 1 dans des neurones cholinergiques issus de la lignée hESC-DM1 (VUB03_DM)
- Figure 31** : Expression de ZNF37A suite au traitement de PBL de patients DM1 à la Metformine
- Tableau 1** : Les symptômes de la DM1
- Tableau 2** : Les maladies à triplets corroborant le gain de fonctions toxiques des transcrits mutants

- Tableau 3** : Les épissages alternatifs altérés dans DM1 et les protéines de liaisons à l'ARNm impliquées
- Tableau 4** : Modèles murins de la DM1 et conséquences pathologiques des protéines de liaison à l'ARNm
- Tableau 5** : Expression et localisation des MBNLs chez l'Homme
- Tableau 6** : Les modèles *in vivo* de gain et de perte de fonction de MBNL1
- Tableau 7** : Nomenclature et localisation des CELFs chez l'Homme
- Tableau 8** : Les modèles *in vivo* de gain et de perte de fonction des CELFs
- Tableau 9**: Facteurs myogéniques altérés dans la DM1
- Tableau 10** : Stratégies anti-sens utilisées pour la dégradation de l'ARNm mutés
- Tableau 11**: Stratégies anti-sens utilisées pour modifier la fixation de protéines aux répétitions CUG
- Tableau 12** : Listes de gènes retrouvés dérégulés par le transcriptome différentiel DM1

Liste des abréviations

DM1: Dystrophie Myotonique de Type I
DM2: Dystrophie Myotonique de Type II
PROMM: Proximal Myotonic Myopathy
PCR: Polymerase Chain Reaction
DMPK: Dystrophia Myotonica Protein Kinase
RyR1: Récepteur à la ryanodine
PLN: Phospholamban
MSH: DNA Mismatch repair protein
HD: maladie de Huntington
HTT: Huntingtin
DMWD: Dystrophia Myotonica, WD repeat containing
SIX5: Sine oculis homeobox homolog 5.
KO: Knock-Out
ZNF9: Zinc Finger Protein 9
HSA^{LR}: Human Skeletal Actin Long Repeat
MBNLs: Muscleblind
hnRNP: heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein
RAR γ : Récepteurs gamma à l'Acide Rétinoïque
CELFs: CUG-BP and ETR3-like Factor
PKC: Protéine Kinase C
CK2: Caseine Kinase 2
Clcn1/CLC1 : Chloride Channel 1
IR: Insulin Receptor
Tnnt2/cTNT: Troponin T cardiaque
AAV: Adeno-Associated-Virus
Grin1/NMDAR: N-Methyl-D-Aspartate glutamate Receptor
APP: Amyloid beta (A4) Precursor Protein
RRM: RNA-Recognition Motifs
UTR: Untranslated region
CUGBP1: CUG-binding protein 1
MEF2A: Myocyte Enhancer Factor 2A
TNF : Tumor Necrosis Factor
PARN: Poly(A)-specific Ribonuclease
ARE: AU-Rich Element
GRE: GU-Rich Element
Wnt: Wingless-type MMTV integration site family member
FGF: Fibroblast Growth Factor
IGF: Insulin Growth Factor
BMP: Bone Morphogenetic Protein

MRFs: Muscle Regulatory Factor
bHLH: basic Helix-Loop-Helix
SIX: Sine oculis related homeobox
NGF: Neural Growth Factor
HTRF: Homogeneous Time-Resolved Fluorescence energy transfer
HTS: High Throughput screening
OAN: Oligonucleotide antisens
hESC: Human Embryonic Stem Cell
iPSC: Induced Pluripotent Stem Cell
MOE: 2'O-methyl-modified OAN
PMO: Phosphorodiamidate Morpholino antisense molecules
WRPE: Woodchuck post-transcriptional Regulatory Element
hTERT: Human Telomerase Reverse Transcriptase
FGF2: Fibroblasts Growth Factor 2
FIV: Fécondation *In Vitro*
DPI: Diagnostic Pré-Implantatoire
SSEA: Stage Specific Embryonic Antigen
TRA: Tumour Rejection Antigen
TRF: Telomeric repeat binding factor
OCT4: Pou-domain class 5, transcription factor 1
NANOG: Nanog homeobox
SOX2: Sex Determining region Y box containing gene 2

Avant-propos

Les cellules souches pluripotentes humaines, d'origine embryonnaire (ESC) ou induites à la pluripotence (iPSC), ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques majeures. De par leur propriété d'auto-renouvellement, elles constituent, en théorie, une source illimitée de matériel biologique et leur propriété de pluripotence leur confèrent la capacité de se différencier vers tous les types cellulaires de l'organisme. Lors de la découverte de ces nouveaux outils, la première application considérée à été la thérapie cellulaire pour laquelle il serait possible de remplacer un tissu lésé par ces cellules pluripotentes qui se différencieraient en de nouvelles cellules appropriées et saines.

Depuis, une deuxième application est proposée et basée sur l'utilisation de cellules souches pluripotentes porteuses de mutation pour modéliser une pathologie. Le concept de cette application est simple : reproduire dans un modèle cellulaire, non transformé et humain, des anomalies moléculaires représentatives d'une maladie génétique parfois difficile à explorer avec les ressources biologiques existantes. L'effet d'une mutation causale peut alors être étudié au cours de la différenciation des cellules pluripotentes vers le type cellulaire spécifiquement atteint. Ce modèle cellulaire présente un potentiel inestimable pour améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le développement de maladies monogéniques mais aussi pour la recherche de nouveaux médicaments. En effet, les industries pharmaceutiques voient en ces cellules un nouvel outil pour des tests de toxicologie prédictive et la découverte de molécules thérapeutiques.

C'est dans ce contexte que j'ai effectué ma thèse au sein de l'institut I-STEM (Institut des cellules Souches pour le Traitement et l'Etude des maladies Monogéniques). Créé en 2005 par le Dr Marc Peschanski, I-STEM a pour principal objectif d'explorer le potentiel thérapeutique des cellules souches pluripotentes humaines dans le cadre de maladies monogéniques. Plusieurs pathologies ont été choisies au laboratoire pour valider cette preuve de concept notamment la Dystrophie myotonique de type 1 (DM1) dont l'étude a été initiée par l'équipe du Dr Geneviève Piétu. La pertinence des hESC porteuses de la mutation de la DM1 a été validée par la mise en évidence de sigmas moléculaires caractéristiques de la DM1 au niveau des progéniteurs neuraux et mésenchymateux, proches des types cellulaires normalement affectés dans la pathologie. Depuis, ces cellules ont été utilisés par plusieurs équipes au laboratoire notamment pour le développement d'un criblage de molécules

potentiellement thérapeutiques, capables de reverser les défauts pathologiques. L'équipe du Dr Geneviève Piétu a mis en place la base de nombreux projets à I-STEM à savoir une étude comparative par transcriptome des hESC saines et mutantes et leurs progénies. Ceci a permis de générer une liste de gènes spécifiquement dérégulés dans le modèle hESC porteuses de la mutation causale de la DM1. C'est dans ce contexte que j'ai rejoint I-STEM dans l'équipe du Dr Cécile Martinat qui avait pour objectif d'étudier certains mécanismes moléculaires à l'origine de maladie neuro-musculaires dont la DM1.

L'objectif général de ma thèse a été d'étudier et de valider les conséquences physiopathologiques de l'altération de certain des gènes de la liste du transcriptome.

Dans une première partie, nous nous sommes intéressés à la diminution d'expression d'un facteur de transcription à domaine Krab. Ce gène nous semblait d'autant plus intéressant qu'il était fortement dérégulé dans les hESC DM1 mais également dans les progéniteurs neuraux et mésenchymateux. Cette étude nous a permis d'élargir le spectre d'action de la mutation DM1 et d'identifier un nouveau mécanisme physiopathologique pouvant participer aux défauts myogéniques observés chez les patients DM1 (Article 1 Gauthier *et al* –en soumission)

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'altération d'expression du gène *EphA5* dans un contexte neural. Ce travail a été initié par une première étude de l'équipe du Dr Martinat sur l'altération DM1-spécifique de gènes impliqués dans la guidance axonale *SLITRK2* et *SLITRK4* relié à un phénotype d'hyper-arborisation neuritique (Marteyn, Maury et al. 2011). Nous nous sommes intéressés à d'autres gènes impliqués dans la guidance, les EphAs, et avons montré un défaut d'expression spécifique de l'*EphA5* lié à une modification d'épissage alternatif.

Ce travail de thèse m'a offert l'opportunité de pouvoir appréhender de nouveaux concepts et d'évaluer la pertinence et les limitations quant à l'utilisation des cellules souches embryonnaires humaines pour des applications de modélisation pathologique.

Introduction

1. Présentation générale de la Dystrophie myotonique de type 1

1.1. Généralités

On appelle dystrophie musculaire un groupe de maladies d'origine génétique, caractérisées par un ensemble de troubles musculaires dus à une dégénérescence progressive des fibres musculaires. Il existe plusieurs formes de dystrophie musculaire distinguées sur la base de plusieurs critères tels que l'âge d'apparition des symptômes, le profil musculaire, la vitesse à laquelle la maladie progresse, l'atteinte d'autres organes ou le profil héréditaire.

Ainsi, la Dystrophie myotonique de type 1 (DM1 ou maladie de Steinert) et de type 2 (DM2 ou PROMM pour *Proximal Myotonic Myopathy*) se distinguent des autres dystrophies musculaires par leur caractère multisystémique, puisqu'elles atteignent également d'autres organes comme le système oculaire, endocrinien, cardiaque ainsi que le système nerveux central (Day and Ranum 2005). La DM1 touche principalement les muscles distaux et plus particulièrement les fibres de type I c'est-à-dire les fibres « lentes » de l'endurance. Cette propriété la différencie de la DM2 qui affecte les muscles proximaux et les fibres de type II, responsables de la contraction musculaire rapide (Turner and Hilton-Jones 2010). Les patients DM1 et DM2 ont des signes cliniques similaires bien que les symptômes de la DM2 soient moins sévères et apparaissent plus tardivement. A l'inverse de la DM1, aucune forme congénitale de la DM2 n'a été décrite. Dans les signes cliniques similaires, on peut noter la présence d'une faiblesse musculaire, d'une myotonie, d'une cataracte, d'une insulino-résistance, d'une insuffisance testiculaire et des problèmes cognitifs (Ricker, Koch et al. 1994; Meola, Sansone et al. 1996; Udd, Krahe et al. 1997; Day, Ricker et al. 2003; Day and Ranum 2005). Par leurs nombreuses similitudes, beaucoup d'études valident la spécificité des mécanismes DM1 par comparaison avec la DM2.

1.2. Epidémiologie

La DM1 est l'une des dystrophies musculaires la plus fréquente de l'adulte, avec une prévalence de 1/8000 et une répartition géographique mondiale très hétérogène. Elle est relativement rare en Afrique et peut varier de 1/25000 en Europe à 1/500 dans la région du lac Saint-Jean au Québec où les patients descendraient d'un même couple immigré au Canada au XVII^e siècle (Mathieu, De Braekeleer et al. 1990). Deux facteurs auraient contribué à

l'amplification de la maladie dans cette région. Le premier est une faible migration et le second est un taux de fécondité particulièrement élevé chez la population du Saguenay qui comprenait quelques centaines d'habitants en 1840 et qui est passé à 280 000 dans les années 1980.

1.3. Les différentes formes de la DM1

La DM1 atteint aussi bien les femmes que les hommes et les symptômes sont variables d'un individu à l'autre. L'apparition de symptômes musculaires, optiques ou cardiaques permet le diagnostic de cette maladie chez l'adulte. Il est ensuite confirmé par la détection génétique de la mutation par une simple prise de sang. Ce diagnostic peut également être proposé dans le cas d'antécédents familiaux, notamment lors d'une grossesse et passe par la recherche génétique de la mutation sur le fœtus.

Quatre formes cliniques de la pathologie ont été décrites en fonction de l'âge d'apparition des symptômes et leur gravité : la forme tardive, la forme adulte, la forme juvénile et la forme congénitale.



Figure 1: Présentation d'une famille de malades DM1

Une mère au centre, et ses deux enfants présentant une forme congénitale de la DM1 (Turner and Hilton-Jones 2010)

1.3.1. La forme tardive

Elle apparaît à partir de 40 ans et est difficile à diagnostiquer puisque les symptômes peuvent être confondus avec des problèmes liés à l'âge. Les atteintes consistent en une

cataracte, des problèmes cardiaques et une calvitie précoce observée chez 80% des patients masculins corrélée à la sévérité de la maladie (Jaeger 1993).

1.3.2. La forme adulte

La forme adulte dont les signes cliniques apparaissent vers 30-40 ans a été nettement plus décrite que les autres formes. Les patients présentent un faciès figé et inexpressif, avec la bouche ouverte et des paupières tombantes, un prominauris (grandes oreilles décollées) et une tendance au retrognathisme (déformation de la mâchoire qui semble rejetée en arrière quand elle est observée de profil). Les atteintes sont nombreuses et sont détaillées dans le tableau 1. Cependant, l'atteinte principale est l'affaiblissement musculaire progressif résultant d'une atrophie musculaire (ou dystrophie). Le deuxième signe prédominant de la DM1 est une lenteur et une difficulté à la décontraction musculaire après stimulation volontaire, appelée myotonie, affectant aussi bien les muscles striés que les muscles lisses.

1.3.3. La forme juvénile

La forme juvénile se développe chez les enfants âgés de 8 à 10 ans et se caractérise par une faiblesse des muscles de la face et une myotonie notamment au niveau des mains. Cette forme est souvent remarquée par les troubles sociaux et scolaires des enfants liés à des altérations cognitives.

1.3.4. La forme congénitale

La forme congénitale de la DM1 est la plus sévère. Elle est associée à une transmission principalement maternelle, par opposition aux autres formes où la transmission peut être maternelle comme paternelle. Elle se manifeste dès la période intra-utérine par une quantité trop importante de liquide amniotique (hydramnios) et par une diminution des mouvements fœtaux. Le nouveau né souffre d'une hypotonie générale avec des problèmes de succion, de déglutition et de grande détresse respiratoire, d'arthrogrypose (articulations courbées) et de pied bot. Cette forme est létale dans 20% des cas. Les enfants qui survivent ont une espérance de vie réduite (30-40ans) et meurent à la suite d'accidents cardiaques ou d'insuffisances respiratoires (Jaeger 1993; Machuca-Tzili, Brook et al. 2005).

Système affecté	Symptômes
Visuel	Cataracte iridescente bilatérale sous-capsulaire postérieure (opacités multicolores augmentant en nombre et en taille)
	Atteinte rétinienne
	Ptosis (atteinte des muscles releveurs des paupières)
	Blépharospasme (contraction spasmodique du muscle orbiculaire des paupières)
	Diplopie (perception simultanée de deux images d'un simple objet)
	Lésions cornéennes
	Hypotension intraoculaire
Tégumentaire	Calvitie précoce temporale et frontale
Musculaire	Dystrophie (atrophie musculaire et fatigabilité à l'effort)
	Myalgie (douleur musculaire)
	Contraction utérine anormale
	Myotonie des muscles lisses (problèmes de motilité gastrique)
	Pneumopathie de déglutition
	Dysphagie (sensation de gêne ou de blocage ressentie au moment de l'alimentation)
Endocrinien	Diabète de type II
	Hypogonadisme
	Ménopause précoce
	Hypersudation et hypersalivation
Cardio-vasculaire	Problème de conduction cardiaque avec un risque de mort subite accru
	Bradycardie
	Arythmie
	Trouble vasomoteur des extrémités
	Syndrome de Raynaud (trouble de la circulation sanguine se manifestant par un engourdissement ou des douleurs des extrémités)
Respiratoire	Épisodes broncho-pulmonaires infectieux répétés
	Dyspnée (difficulté respiratoire avec une sensation subjective d'étouffement)
	Insuffisance respiratoire
	Hypoventilation alvéolaire
	Acrocyanose (trouble circulatoire provoquant des extrémités froides, bleues et moites)
Nerveux	Troubles du sommeil (hypersomnie, somnolence, inversion du rythme nyctémérale)
	Trouble des fonctions cognitives (problèmes de mémoire immédiate, de l'abstraction, de l'orientation et de la manipulation spatiale)
	Dépression et trouble de l'humeur
Ostéo-articulaire	Cervicalgie (douleur dans le cou et la nuque)
	Cyphoscoliose (double déformation de la colonne vertébrale associant une déviation latérale (scoliose) et une déformation à convexité postérieure (cyphose))
	Déformation du thorax
	Rétrognathisme (déformation de la mâchoire inférieure qui de profil semble rejetée en arrière)
Auditif	Hypoacousie (diminution de l'acuité auditive)

Tableau 1 : Les symptômes de la DM1

La myotonie ne fait pas partie des symptômes durant la première année de vie (Machuca-Tzili, Brook et al. 2005) mais une dystrophie, un retard psychomoteur et un retard mental sont observés. En grandissant les patients développent des signes cliniques similaires à la forme adulte mais beaucoup plus sévères, avec l'apparition d'une myotonie, de symptômes auditifs et intestinaux marqués. De plus, les garçons présentent une insuffisance testiculaire (Jaeger 1993). Les problèmes de cataracte ou les troubles d'hypersomnie ne se manifestent qu'à l'âge adulte (Day and Ranum 2005).



Figure 2: Les différentes formes de la DM1

(Turner and Hilton-Jones 2010) et http://www.duke.edu/~ema5/Golian/Slides/8/musculoskeletal5_files/Ms291.jpg et <http://neuromuscular.wustl.edu/pics/people/patients/myodyssm.jpg>

1.4. Identification de la mutation responsable de la DM1

1.4.1. Historique

La DM1 a été décrite en 1904 par le médecin allemand Steinert et par les médecins anglais Batten et Gibbs (Batten and Gibb 1909).



Figure 3 : Photographie du Dr. Hans Steinert

(Steinberg and Wagner 2008)

En plus des symptômes décrits précédemment, ils remarquent le caractère génétique de cette maladie en étudiant différents membres d'une famille de malades. Ces patients

présentaient tous une difficulté progressive à marcher, ainsi que des difficultés de maintien d'objets et un manque d'expression du à une altération des muscles faciaux.

Il a fallu près de 90 ans pour que l'anomalie génétique à l'origine de la DM1 soit mise en évidence par différentes équipes (Aslanidis, Jansen et al. 1992; Brook, McCurrach et al. 1992; Buxton, Shelbourne et al. 1992; Fu, Pizzuti et al. 1992; Harley, Brook et al. 1992; Mahadevan, Tsilfidis et al. 1992). La découverte de cette mutation par clonage et PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dans les années 1990, était d'autant plus surprenante qu'elle était située dans la région non codante (3'UTR) du gène affecté et non dans la région codante. Ce gène, *DMPK* (*Dystrophia Myotonica Protein Kinase*), et les mécanismes associés à son altération seront décrits dans les paragraphes suivants.

1.4.2. Implication du gène *DMPK*

Le gène *DMPK* est situé sur le chromosome 19q13.3 et code une protéine serine/thréonine kinase qui possède des homologies structurales avec la famille des kinases Rho, impliquées dans le contrôle du cytosquelette, le trafic intracellulaire et le métabolisme du glucose (Ridley 2001; Furukawa, Ongusaha et al. 2005; Llagostera, Catalucci et al. 2007). Le locus de ce gène comprend en amont le gène *DMWD* et en aval, le gène *SIX5* (Figure 4).

Bien qu'ubiquitaire, la *DMPK* est plus fortement exprimée dans les muscles squelettiques lisses et cardiaques (Sarkar, Han et al. 2004; Kaliman and Llagostera 2008). Des données suggèrent que la *DMPK* régule de nombreux processus des cellules des muscles striés. Elle est exprimée dans ces cellules pendant le développement embryonnaire de la souris et du poulet, et régulerait l'apoptose ainsi que l'expression de certains marqueurs des cellules musculaires matures comme la myogénine (Harmon, Harmon et al. 2008). La *DMPK* est enrichie dans le réticulum sarcoplasmique des myocytes cardiaques et co-localise avec le récepteur à la ryanodine (RyR1). De plus, elle interagit et phosphoryle le phospholamban (PLN), protéine régulatrice de la pompe calcique des cellules du muscles striés (Kaliman, Catalucci et al. 2005). La modification du niveau de *DMPK* peut donc entraîner une cascade d'altérations en *trans*, et ces conséquences peuvent perturber le fonctionnement normal du système cellulaire.

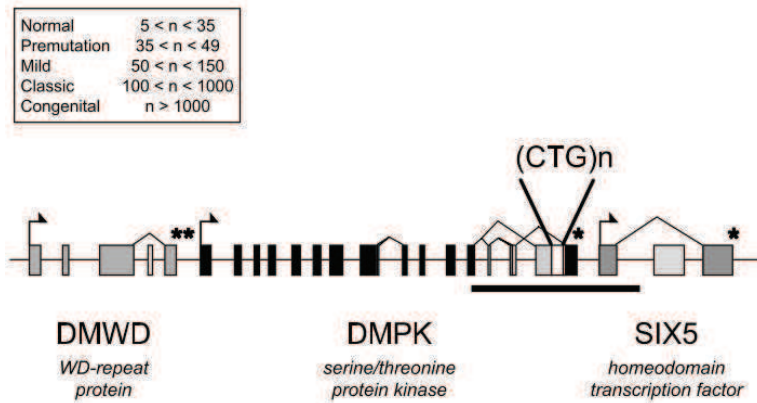


Figure 4 : La DMPK et ses gènes adjacents

Le gène *DMPK* est entouré par *DMWD* en amont et *SIX5* en aval. Les répétitions CTG sont situées dans la région 3'UTR de la *DMPK* (trait noir). L'encadré synthétise la forme de la DM1 qu'un patient développe selon le nombre de répétitions CTG présent (Wansink and Wieringa 2003)

1.4.3. Mécanisme d'instabilité des répétitions CTG

La région 3' non codante de *DMPK* est normalement constituée de 5 à 34 répétitions de trinuécléotides CTG. Dans la DM1, la mutation entraîne une amplification anormale de ces expansions microsatellites de 50 à 5000, et ce mécanisme semble se produire dès le stade embryonnaire et continuerait au moins jusqu'à la naissance (Martorell, Johnson et al. 1997). Le nombre de répétition est variable d'un patient à un autre, d'un tissu à l'autre, et également au sein d'un même tissu (Seznec, Agbulut et al. 2001) Ce mécanisme, appelé mosaïcisme, semble prédominant dans le muscle, mais est également présent dans d'autres organes notamment le cerveau (Martorell, Johnson et al. 1997). La sévérité ainsi que l'âge d'apparition des premiers symptômes ont été corrélés avec la taille des répétitions, un nombre de CTG supérieur à 1500 résultant généralement en une forme congénitale (Ranum and Cooper 2006). Pendant de nombreuses années, les répétitions CTG semblaient être une séquence continue de répétitions CTG « pures ». Il a été montré récemment qu'il y avait des insertions de motifs d'interruption « non CTG », et ceci de manière différente selon le tissu, qui pourrait participer au mosaïcisme (Leefflang and Arnheim 1995; Musova, Mazanec et al. 2009; Axford, Lopez-Castel et al. 2011).

L'évolution de l'expansion des répétitions au cours de l'âge et les différences entre les tissus suggèrent un mécanisme mutationnel continu et l'implication d'éléments tissu-spécifiques. Les mécanismes physiopathologiques associés à l'expansion des répétitions CTG sont encore peu connus, mais il semble que la modulation de l'instabilité génétique soit

causée par des protéines intervenant dans la réplication de l'ADN, la réparation des mésappariements, la transcription ou la recombinaison (Lopez Castel, Cleary et al. 2010).

Les répétitions CTG sont ancrées dans un large îlot CpG de 3,5 kb s'étendant de l'extrémité 3' du gène *DMPK* (*Dystrophia Myotonica, WD repeat containing*) jusqu'au promoteur du gène *SIX5* (*Sine oculis homeobox homolog 5*) (Boucher, King et al. 1995) et sont entourées de sites CTCF (*CCCTC-binding factor*) qui vont constituer une barrière physique ou « insulateur » et moduler la réplication ou la réparation des CTG (Figure 5).

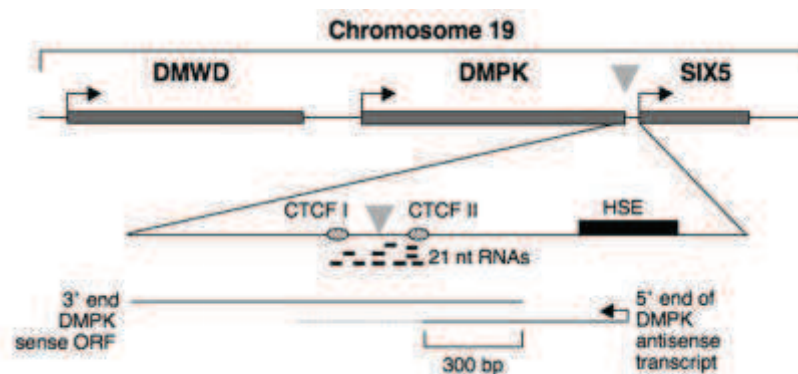


Figure 5: Organisation du locus *DMPK* humain

La région mutée est localisée entre la fin de la phase codante de *DMPK* et le début du promoteur du gène *SIX5* et contient des répétitions CTG indiquées par un triangle, et des sites CTCF adjacents aux répétitions (Kumari and Usdin 2009).

Des études récentes suggèrent que les méthylations des îlots CpG et la fixation des protéines CTCF pourraient contribuer à l'instabilité somatique observée chez les patients (Libby, Monckton et al. 2003; Gorbunova, Seluanov et al. 2004; Cleary, Tome et al. 2010). Bien qu'il n'y ait pas de méthylation allèle-spécifique ou de marques épigénétiques parentales dans la DM1, une hyperméthylation est présente dans les cellules provenant de patients atteints de forme congénitale (Steinbach, Glaser et al. 1998; Filippova, Thienes et al. 2001) et également pour les formes moins sévères, mais ne semble pas être corrélée avec la taille des expansions (Spits, Seneca et al. 2010; Lopez Castel, Nakamori et al. 2011). Les modifications épigénétiques pourraient donc participer à l'instabilité de ces répétitions.

Bien que cette instabilité soit dépendante de la prolifération et de la réplication cellulaires (Wohrle, Kennerknecht et al. 1995; Martorell, Monckton et al. 1998) (Cleary, Nichol et al. 2002; Yang, Lau et al. 2003; Farrell and Lahue 2006; Claassen and Lahue 2007), certaines études ont montré qu'elle était également présente dans des cellules non

prolifératives (Wang and Vasquez 2006; Gonitel, Moffitt et al. 2008; Wang and Vasquez 2009). Ceci suppose l'implication d'autres systèmes que la réplication dans l'instabilité, comme les mécanismes de réparation. Une famille de gènes semble requise pour l'expansion somatique et intergénérationnelle des répétitions, ce sont les *MSH (DNA mismatch repair protein)* (Manley, Shirley et al. 1999; van den Broek, Nelen et al. 2002; Savouret, Brisson et al. 2003; Savouret, Garcia-Cordier et al. 2004; Owen, Yang et al. 2005; Foiry, Dong et al. 2006; Tome, Holt et al. 2009). Il a été notamment montré que l'inactivation du gène *Msh2* dans un modèle de souris DM1 permet une contraction des répétitions CTG (Savouret, Brisson et al. 2003). Ce mécanisme a été étendu à une autre pathologie à triplet, la maladie de Huntington (HD). Cette pathologie est due à l'expansion de répétitions CAG dans la région codante du gène *HTT (Huntingtin)*, qui va donner lieu à un gain de fonction toxique de la protéine traduite, entraînant la mort des neurones du striatum. Dans un modèle murin de HD, la délétion de *Msh^{-/-}* entraîne la suppression des répétitions somatiques du striatum et l'apparition des agrégats, spécifiques de la pathologie, sont retardés (Manley, Shirley et al. 1999)

1.4.4. Anticipation génétique

La DM1 est caractérisée par un phénomène d'anticipation c'est-à-dire que l'apparition et la sévérité des symptômes augmentent au cours des générations. Il est fréquent de voir un parent développant une forme adulte de la DM1 et ses enfants développant une forme plus précoce. Cette caractéristique de la DM1 est liée à l'augmentation et à l'instabilité des répétitions CTG mais également au sexe du parent transmetteur. Des travaux épidémiologiques ont montré que la mutation est plus instable lorsqu'elle est transmise par le père (Brunner, Bruggenwirth et al. 1993). Ainsi, lorsque les répétitions sont inférieures à 100, l'amplification des CTG est plus grande si la transmission est paternelle. En revanche, au-delà de 500 CTG, les répétitions n'augmentent que si la transmission est maternelle et elles ont tendance à diminuer lorsque la transmission est paternelle (Cobo, Baiget et al. 1993; Ashizawa, Anvret et al. 1994). Ceci pourrait être expliqué par un mécanisme de sélection lors de la spermatogenèse, qui éliminerait les cellules avec de grandes expansions. Même s'il existe des cas de formes congénitales transmises par le père elles restent rares (Zeesman, Carson et al. 2002; Di Costanzo, de Cristofaro et al. 2009). Cette expansion de triplets, en plus d'être instable, est inégale c'est-à-dire que des jumeaux atteints de la maladie ne présentent pas le même nombre de répétitions (Lopez de Munain, Cobo et al. 1994).

Pour conclure, la DM1 est une maladie génétique au phénotype principalement musculaire mais également multisystémique qui se traduit par différentes formes plus ou moins sévères. Elle est due à la présence d'un nombre anormal de répétitions CTG dans la région 3'UTR du gène *DMPK*. Ces répétitions sont instables et augmentent au cours des générations, entraînant des phénotypes de plus en plus sévères. Les mécanismes par lesquels ces répétitions entraînent la pathologie seront décrits dans la section suivante.

2. Compréhension des mécanismes moléculaires de la DM1 grâce à la modélisation pathologique

Depuis la découverte de la mutation dans les années 1990, de nombreuses études basées sur l'utilisation de modèles de la DM1 ont permis de décrypter plusieurs mécanismes physiopathologiques associés. Cette mutation entraîne de nombreux défauts moléculaires notamment l'altération de protéines de liaisons à l'ARNm qui a pour conséquences des défauts d'épissages alternatifs caractéristiques de la DM1. Ces défauts seront détaillés dans cette partie.

Mais par quel mécanisme la mutation DM1 entraîne-t-elle ces altérations en *trans* ? Le caractère multisystémique rend complexe le dépistage d'un seul et unique mécanisme. En réalité, c'est l'accumulation d'effets directs et indirects de la mutation qui va provoquer une multitude de désordres cellulaires. A partir de la découverte de la mutation, plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer les mécanismes pathologiques de la DM1.

2.1. Hypothèses du mécanisme d'action de la mutation

2.1.1. L'haplo-insuffisance en *DMPK*

Lors de la transcription du gène *DMPK*, le nombre anormal de répétitions entraîne une modification conformationnelle de ses ARNm en induisant la formation de structures en épingle à cheveux dues aux interactions GC/CG. Différentes protéines vont se fixer à ces ARN double brins aboutissant à l'accumulation des ARNms de *DMPK* dans le noyau sous le terme d'inclusions ribonucléoprotéiques ou *foci* (Napierala and Krzyzosiak 1997).

La première conséquence de ces inclusions est d'interférer avec l'export dans le cytoplasme des ARNms de *DMPK* entraînant un appauvrissement protéique en dessous du seuil de fonctionnalité (Fu, Friedman et al. 1993; Maeda, Taft et al. 1995; Taneja, McCurrach

et al. 1995; Davis, McCurrach et al. 1997; Furling, Lam le et al. 2003). Il est intéressant de noter que cette diminution de DMPK, de l'ordre de 50%, n'est pas corrélée au nombre de CTG présent (Salvatori, Fanin et al. 2005). La raison de cette diminution cytoplasmique vient du fait que seul les transcrits provenant de l'allèle normal peuvent être exporté et être traduit en protéines fonctionnelles.

Afin de mieux comprendre l'implication de la perte de fonction de DMPK dans la DM1, des modèles de souris *Dmpk*^{-/-} ont été générés (Jansen, Groenen et al. 1996; Reddy, Smith et al. 1996; Benders, Groenen et al. 1997; Kaliman, Catalucci et al. 2005). Corrélant avec des observations faites chez des patients DM1, ces souris développent tardivement une myopathie squelettique progressive caractérisée par une dégénérescence et une fibrose des fibres musculaires. Ces souris ont une mortalité néonatale accrue et des défauts de conduction et de contractilité cardiaque. D'un point de vue moléculaire, elles développent des défauts de capture du calcium dans le réticulum sarcoplasmique (Kaliman, Catalucci et al. 2005) et également un défaut de translocation membranaire du récepteur à l'insuline (Llagostera, Catalucci et al. 2007) qui pourrait être corrélé aux symptômes de résistance à l'insuline des patients DM1.

Des modèles murins visant à surexprimer *DMPK* ont aussi été générés et montrent une augmentation de la mortalité néo ou prénatal et une augmentation de la fréquence d'apparition de maladies infectieuses chez les femelles gestantes (Jansen, Groenen et al. 1996). Ceci montre que la modification d'expression de *DMPK* entraîne un certain nombre d'altérations sévères.

L'haploinsuffisance en DMPK semble être impliquée dans le développement de la DM1, en particulier dans les symptômes myopathiques tardifs et les défauts cardiaques. Cependant, certains symptômes typiques de la pathologie, comme la myotonie, n'ont jamais été décrits dans les modèles murins *Dmpk*^{-/-} suggérant que d'autres facteurs pourraient être à l'origine des symptômes de la DM1.

2.1.2. Implication des gènes adjacents à *DMPK*

Une autre hypothèse propose que la présence de longues expansions de CTG dans la région 3'UTR du gène *DMPK* résulte en une modification de la conformation de la chromatine et consécutivement en une modification de l'expression des gènes adjacents. De part et d'autre du gène *DMPK* se trouvent en amont le gène *DMWD* et en aval le gène *SIX5*.

La protéine DMWD est ubiquitaire mais majoritairement exprimé dans le cerveau et les testicules. Son expression dans ces deux tissus est considérablement diminuée dans la DM1 (de 20 à 50%) et pourrait être impliquée dans l'infertilité masculine observée chez les patients (Shaw, McCurrach et al. 1993; Jansen, Bachner et al. 1995; Westerlaken, Van der Zee et al. 2003).

Un intérêt a été plus particulièrement porté au gène *Six5* connu pour être essentiel au développement du système visuel chez la drosophile (Cheyette, Green et al. 1994; Pignoni, Hu et al. 1997) et qui, dès lors, pouvait participer aux affections du système oculaire décrits chez les patients DM1.

De manière intéressante, l'expression du gène *SIX5* est diminuée dans des biopsies de muscles, de foie, de cerveau et d'œil de patients DM1 (Thornton, Wymer et al. 1997; Korade-Mirnic, Tarleton et al. 1999; Winchester, Ferrier et al. 1999). Afin de confirmer le rôle de ce gène dans la pathologie, deux modèles de souris KO pour *Six5* ont été générés. Ils aboutissent à l'apparition d'une réduction de la masse testiculaire et d'une cataracte cependant différente de celle retrouvée chez les patients DM1 puisqu'elle ne présente ni opacité iridescente, ni localisation sous-capsulaire postérieure (Klesert, Cho et al. 2000; Sarkar, Appukuttan et al. 2000; Wakimoto, Maguire et al. 2002). Bien qu'aucun défaut du muscle squelettique dans ces souris *Six5*^{-/-} n'aient été reporté, il est intéressant de noter que la famille des *SIX* est impliquée dans le contrôle de la prolifération et la différenciation des cellules satellites et que *SIX5* en particulier aurait un rôle inhibiteur de la prolifération de ces cellules (Yajima, Motohashi et al. 2010).

Pour conclure, la baisse d'expression de *DMWD* et *SIX5* pourrait contribuer aux symptômes d'infertilité masculine et aux défauts visuels décrits chez les patients DM1. Cependant, il semble clair que ces deux gènes à eux seuls ne contribuent pas au phénomène multisystémique de la maladie suggérant un autre mécanisme pathologique.

2.1.3. Gain de fonction toxique de l'ARNm

Cette hypothèse est actuellement la plus admise par la communauté scientifique DM1. Comme décrit précédemment, les transcrits mutants *DMPK* vont former des structures caractéristiques en épingle à cheveux qui sont séquestrés dans le noyau sous forme de *foci*. Ces transcrits sont toxiques pour la cellule et seraient majoritairement responsables des symptômes de la DM1 (Klein, Gasnier et al. 2011).

Le mécanisme de gain de fonction toxique des ARNm mutants est de plus en plus associé à des pathologies à triplet comme l'Ataxie spino-cérébelleuse de type 8, le syndrome de l'X fragile ou encore la maladie de Huntington, corroborant l'hypothèse de gain de fonction toxique des transcrits mutants (Tableau 2).

Maladie (Symbole)	type de répétitions	localisation de l'expansion	nombre de répétition normal	nombre de répétition pathologiques	formation de foci /Epissage alternatif	Références
Dystrophie myotonique de type 1 (DM1)	CTG	3'UTR du gène <i>DMPK</i>	5-37	50->4000	oui/oui	(Brook, McCurrach et al. 1992)
Dystrophie myotonique de type 2 (DM2)	CCTG	Intron 1 du gène <i>ZNF9</i>	10-26	100-11000	oui/oui	(Liquori, Ricker et al. 2001)
Syndrome tremblement-ataxie lié à une prémutation de l'X fragile (FXTAS)	CGG	5'UTR du gène <i>FMR1</i>	20-45	55-200	oui/oui	(Hagerman and Hagerman 2004)
Maladie de Huntington de type 2 (HDL2)	CTG/CAG	3'UTR du gène <i>JPH3</i>	6-28	>41-59	oui/inconnu	(Stevanin, Fujigasaki et al. 2003)
Ataxie spinocérébelleuse de type 8 (SCA8)	CTG	3'UTR du gène <i>ATXN80S</i>	15-91	100-197	oui/oui	(Vincent, Neves-Pereira et al. 2000)
Ataxie spinocérébelleuse de type 10 (SCA10)	ATTCT	Intron 9 du gène <i>ATXN10</i>	10-29	400-4500	Inconnu/inc onnu	(Lee, Jin et al. 2003)
Ataxie spinocérébelleuse de type 11 (SCA11)	CAG	Promoteur/ Région en aval du gène <i>PPP2R2B</i>	7-2	51-78	Inconnu/inc onnu	(Holmes, Hearn et al. 2001; Johnson, Wood et al. 2008)
Ataxie spinocérébelleuse de type 31 (SCA31)	TAGAA/T AAAAA/TG GAA	Intron du gène <i>BEAN</i>	0	>100	oui/inconnu	(Sato, Yabe et al. 2009)

Tableau 2 : Les maladies à triplets corroborant le gain de fonctions toxiques des transcrits mutants

-Analogie avec la DM2

Le premier élément en faveur d'un gain de fonction de l'ARN mutant a été la mise en évidence d'une nouvelle forme de myotonie dystrophique, la DM2. Cette pathologie a été découverte suite à des tests génétiques pour valider cliniquement le diagnostique DM1. Un faible pourcentage de patients (1 à 2%) présentaient des symptômes similaires à la DM1 comme la faiblesse musculaire (bien que moins sévère), la myotonie, l'apparition précoce d'une cataracte, une insulino-résistance, une insuffisance testiculaire mais sans les répétitions anormales de CTG sur le gène *DMPK*. En approfondissant les signes cliniques de ces patients, il en est ressorti certaines différences comme une affection des muscles proximaux et des fibres de type II (fibres de la contraction musculaire rapide), l'absence d'une faiblesse des muscles de la face et une plus forte fréquence de myalgies (Vihola, Bassez et al. 2003).

La DM2 est due à des expansions de 100 à 10000 répétitions de quadruplets CCTG dans le premier intron du gène codant le facteur de transcription ZNF9 (*Zinc Finger protein 9*). De façon intéressante, les transcrits mutants sont, comme dans la DM1, accumulés dans le noyau où ils forment des inclusions ribonucléoprotéiques similaires aux *foci* observés dans la DM1. De la même manière, des défauts d'épissages alternatifs sont présents dans la DM2, certains étant similaires à la DM1 (Turner and Hilton-Jones 2010) (Figure 6).

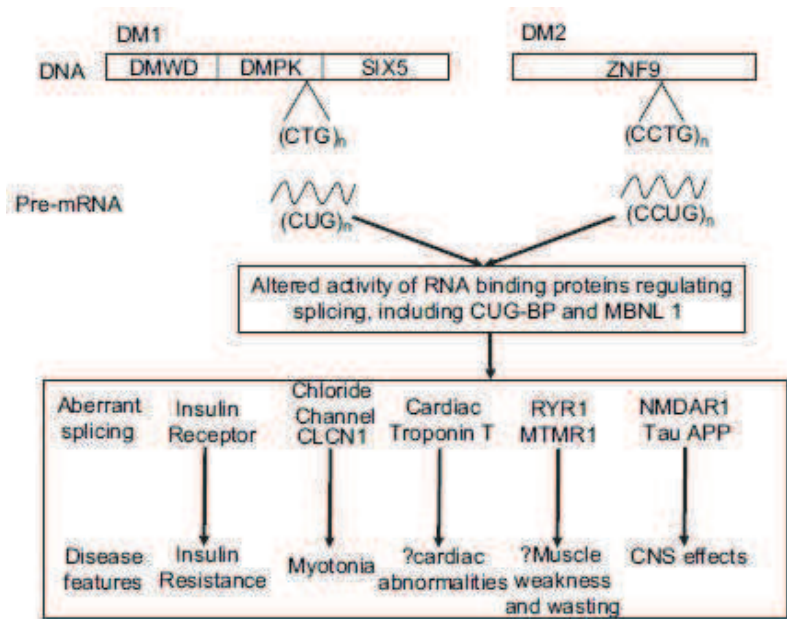


Figure 6: Analogie de la pathogénèse moléculaire entre la DM1 et la DM2

La DM1 et la DM2 partagent de nombreux mécanismes pathologiques comme la présence de *foci* et l'altération de protéines de liaisons à l'ARNm responsable de défauts d'épissages alternatifs associés à certain signes cliniques (Modifié de(Turner and Hilton-Jones 2010)

Ces observations suggèrent ainsi un mécanisme commun de gain de fonction toxique des ARNm dans ces deux pathologies (Liquori, Ricker et al. 2001; Fardaei, Rogers et al. 2002).

-Modèles murins de gain de fonctions toxiques de l'ARNm mutants

Les altérations cliniques de la DM1 ont été reliées au gain de fonction toxique des ARNm *DMPK* mutants notamment grâce au développement de plusieurs modèles murins.

Des modèles visant à surexprimer *DMPK* sans répétitions aberrantes (11 CTG) ont été générés (Figure 7). Cette lignée de souris Tg26 possède le plus grand nombre de copies du transgène *DMPK_{11CTG}* inséré (environ 25 copies) et donc la plus forte expression de *DMPK*. Ces souris développent un phénotype très sévère de cardiomyopathie, une réduction de la

résistance à l'effort, une myotonie du muscle squelettique ainsi qu'un déficit du tonus du muscle lisse. Ce résultat permet d'associer ces symptômes au titre des répétitions CTG insérés ou encore à la surexpression de *DMPK*.

D'autres modèles ont été générés visant à surexprimer des longues répétitions CTG hors du contexte de *DMPK*. Des souris nommées HSA^{LR} (*Human Skeletal Actin Long Repeat*) ont été générées, dans lesquels 250 répétitions CTG ont été insérées dans la région 3'UTR du gène musculaire humain de l'alpha-actine (Mankodi, Logigian et al. 2000). Ces souris développent un phénotype « DM1-like » à savoir une atrophie musculaire et une myotonie. De même ceci aboutit à la formation de *foci*, semblables à ceux observés dans la DM1. Ce travail a permis de montrer que les répétitions elles-mêmes étaient responsables des altérations musculaires et non spécifiquement le gène *DMPK*.

Depuis, de nombreux modèles souris de la DM1 de plus en plus raffinés quant à la localisation, la taille des répétitions ou encore l'âge d'apparition des symptômes, ont été générés. Ainsi, l'équipe de Geneviève Gourdon a généré des modèles murins possédant de 300 à plus de 1000 répétitions dans la région 3'UTR du gène humain *DMPK* (Seznec, Agbulut et al. 2001). Les souris DMSXL, possédant plus de 1000 répétitions, reproduisent le mieux le caractère multisystémique de la DM1. Globalement, ces modèles murins développent les défauts musculaires typiques (atrophie et myotonie), progressivement plus sévère en fonction du nombre de répétitions, ainsi que de nombreux signes pathologiques similaires à la DM1 comme les agrégats ribonucléiques (Gomes-Pereira, Foiry et al. 2007).

En parallèle de ces modèles constitutifs, des modèles murins d'expressions inductibles de 960 CTG spécifiquement dans le cœur ou dans le muscle squelettique ont permis de montrer des défauts histologiques similaires à la DM1, une cardiomyopathie liée à un dysfonctionnement systolique et diastolique et également une myotonie (Wang, Kearney et al. 2007; Dansithong, Wolf et al. 2008; Orengo, Chambon et al. 2008).

De manière surprenante, des souris dans lesquels ont été inséré une partie de *DMPK* avec seulement cinq répétitions CTG, développent des symptômes similaires à la DM1 (une myotonie, des défauts de conduction cardiaque, des anomalies histologiques), mais sans les *foci* (Mahadevan, Yadava et al. 2006). Cette étude a soulevé de nombreuses questions quant à la réelle participation des inclusions ribonucléiques dans le processus pathologique. Cependant, les mécanismes cellulaires se mettant en place lors de l'induction de la mutation sont différents des mécanismes de compensation et d'adaptation d'une forme congénitale (Gomes-Pereira, Cooper et al. 2011).

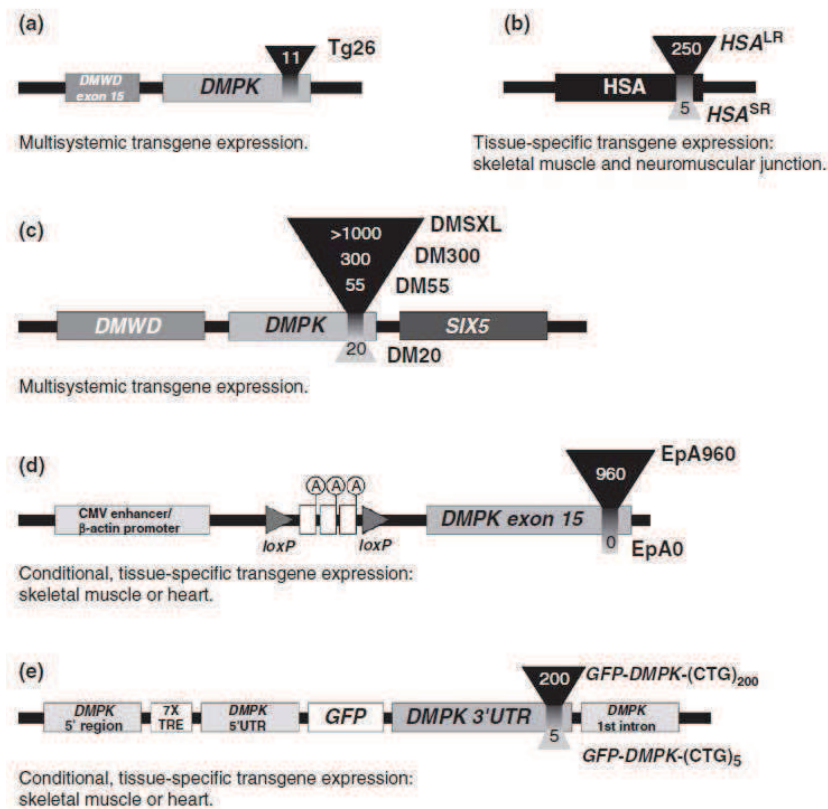


Figure 7 : Les différents transgènes CUG des modèles de la DM1

(a) Les souris Tg26 contiennent 25 copies d'un transgène contenant 11 CTG dans le gène *DMPK* humain et la fin de l'exon du gène *DMWD* (b) Les souris HSA^{LR} et HSA^{SR} contiennent un transgène de l'actine squelettique humaine portant 5 ou 250 CTG (souris de Charles Thornton). (c) Les souris DM possédant 55, 300 ou >1000 CTG dans le gène humain *DMPK* avec l'environnement adjacent de *SIX5* et *DMWD* (souris de Geneviève Gourdon). (d) Souris contenant le gène *DMPK* humain porteur de 960 CTG (EpA960) ou 0 CTG (EpA0) sous le contrôle d'un promoteur B-actin et d'un système Cre-Lox (souris de Thomas Cooper). (e) Les souris GFP-DMPK-(CTG)₂₀₀ comportent un promoteur *DMPK* souris répondant à la tetracycline pour fusionner la 3'UTR *DMPK* contenant les répétitions avec la GFP (souris de Mahadevan).

(Gomes-Pereira, Cooper et al. 2011).

Finalement, la plupart de ces modèles présentent plus ou moins les phénotypes de la pathologie comme l'altération musculaire, la myotonie ou la cardiomyopathie. De plus ils présentent certaines caractéristiques moléculaires de la DM1 notamment la présence des *foci* et des défauts d'épissages alternatifs, reliés à l'insertion de la mutation DM1 (Tableau 3 et 4)

-Altération de l'épissage alternatif dans la DM1

L'épissage alternatif est un mécanisme transcriptionnel qui modifie la séquence d'un pré-ARNm pour présenter au système traductionnel une séquence codante adéquate et mature. Comme mentionné précédemment, l'épissage de nombreux ARN pré-messagers est altéré dans la DM1 (Tableau 3), c'est pourquoi cette pathologie est considérée comme une

splicéopathie. A ce jour, une trentaine de défaut d'épissages ont été mis en évidence dans des biopsies de patients et de modèles murins DM1, et quelques uns ont été associés à un phénotype pathologique. L'insuline récepteur (IR) serait responsable de l'insulino-résistance, le canal chlore (CLC-1) serait responsable de la myotonie et la troponine cardiaque (cTNT) serait responsable des défauts cardiaques observés chez les patients DM1 (Turner and Hilton-Jones 2010).

Le mécanisme d'épissage alternatif requiert des protéines de liaisons à l'ARNm qui vont se fixer à des motifs spécifiques sur la séquence et entrainer leurs épissages. De manière intéressante, certaines de ces protéines sont dérégulées dans la DM1, la section suivante détaillera leur altération et les conséquences sur la régulation transcriptionnelle dans la DM1.

Gènes	Système biologique utilisé	Altération	Protéine de liaisons à l'ARNNm impliquée dans l'épissage alternatif			Références
			MBNL	CUGBP1	ETR3	
Insulin Receptor (IR)	Muscles squelettiques humains DM1	E (exon 11)	NV/oui	oui/NV	NV/NV	(Savkur, Philips et al. 2001)/ (Ho, Charlet et al. 2004)
Chloride Channel (CLCN-1)	Muscles squelettiques humains DM1	R (exon 2)	NV	oui	NV	(Charlet, Savkur et al. 2002)
Fast Skeletal Troponin T (TNNT3)	Souris modèles HSA ^{LR} /Mimigène C1c dans des souris	I (exon 7a)	NV/oui	-/non	-/non	(Mankodi, Takahashi et al. 2002; Kino, Washizu et al. 2009)
Ryanodine Receptor (RyR)	Muscles squelettiques humains DM1	I (exon fctal)	-	-	-	(Vihola, Bachinski et al. 2010)
Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca2+ ATPase 1 (SERCA1)	Muscles squelettiques humains DM1 et souris modèles HSA ^{LR}	I (exon 70(ASI))	NV	-	-	(Kimura, Nakamori et al. 2005)
Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca2+ ATPase 2 (SERCA2)	Muscles squelettiques humains DM1 et souris modèles HSA ^{LR}	E (exon 22)	NV/oui	NV/non	NV/NV	(Kimura, Nakamori et al. 2005)/Hino et al. 2007
PDZ and LIM domain protein 3 a-actinin-associated LIM protein (PDLIM3/ALP)	Muscles squelettiques humains DM1 et souris modèles HSA ^{LR}	R (intron 19)	NV	NV	NV	(Kimura, Nakamori et al. 2005)
Fibronectin 1 (FN1)	Muscles squelettiques humains DM1	I (exon 4)	non	non	non	(Ohsawa, Koebis et al. 2011)
LIM domain binding 3 (LDB3, ZASP)	Muscles squelettiques humains DM1	I (exon 33)	NV	NV	NV	
Titin (TTN)	Souris modèles HSA ^{LR} et muscles squelettiques humains DM1 / Muscles squelettiques humains DM1	I (exon 11)	Oui	-	-/-	(Lin, Miller et al. 2006)/ (Vihola, Bachinski et al. 2010)
Nebulin-Related Anchoring Protein (NRAP)		I (exon ZR4)				
Calpain 3 (CAPN3)		I (exon ZR5)				
Attractin-Like 1 (ATRNL1, ALP)		I (exon 12)				
Formin Homology 2 Domain Containing 1 (FHOD1, FHOS)		E (exon 16)				
Glutamine-Fructose-6-Phosphate Transaminase 1 (GFPT1, GFATI)		E (exon 5a)				
Muscleblind 2 (MBNL2)	Souris modèles HSA ^{LR} et muscles squelettiques humains DM1	E (exon 5b)	Oui	NV	NV	(Lin, Miller et al. 2006)
		E (exon 11a)				
		E (exon 10)				
		I (exon 7)				

Gènes	Système biologique utilisé	Altération	Protéine de liaisons à l'ARNm impliquée dans l'épissage alternatif			Références
			MBNL1	CUGBPI	ETR3	
Muscleblind 1 (MBNL1)	Souris modèles HSA ^{LR} et muscles squelettiques humains DMI/ Cerveaux DMI	I (exon 7)	Oui/NV	NV/NV	NV/NV	(Lin, Miller et al. 2006)/ (Dhaenens, Schraen-Maschke et al. 2008)
Nuclear Factor I/X (CCAAT-binding transcription factor (NVIX) SET and MYND domain containing 1 (SMYD1) Sperm Associated Antigen 9 (SPAG9)	Souris modèles HSA ^{LR} et muscles squelettiques humains DMI	I (exon 123)	oui	NV	NV	(Du, Cline et al. 2010)
		I (exon 39)				
		E (exon 39)				
Dystrophin	Muscles squelettiques humains DMI	E (exon 71/78)	NV	NV	NV	(Nakamori, Kimura et al. 2008)
	Muscles cardiaques humains DMI	E (exon 78)				
Non Muscle Myosin Heavy-Chain (MYH14)	Muscles squelettiques humains DMI et minigène MYH14	I (exon 6)	oui	NV	NV	(Rinaldi, Terracciano et al. 2012)
Canal calcium Cav1.1	Souris modèles HSA ^{LR} et muscles squelettiques humains DMI	E (exon 29)	oui	oui	NV	(Tang, Yarotsky et al. 2012)
Myomesin (MYOM)	Muscles squelettique DMI	I (exon 17a)	oui	oui	oui	(Koebis, Ohsawa et al. 2011)
Bridging integrator-1 (BIN1)	Muscles squelettiques humains DMI	E (exon 11)	oui	oui	NV	(Fugier, Klein et al. 2011)
Myotubularin-related protein 1 (MTMR1)	Muscles squelettiques humains DMI / Muscles squelettiques humains DMI	E (exon 2.1)	NV/NV	NV/NV	NV/NV	(Buj-Bello, Furling et al. 2002; Santoro, Modoni et al. 2010)
		E (exon 2.3)				
α -dystobrevin (DTNA)	Muscles squelettiques et cardiaques humains DMI	I (Exon 11a)	NV	NV	NV	(Nakamori, Kimura et al. 2008)
		I (exon 12)				
Cardiac troponin T (TNNT2)	Muscles squelettiques et cardiaques humains DMI	I (exon 5)	NV/oui	NV/oui	NV/NV	(Philips, Timchenko et al. 1998) (Ho, Charlet et al. 2004)
Tau (MAPT)	Cerveaux humains DMI	E (exon 2/3)	NV / NV / Oui / oui / ?	NV / NV / NV / non / ?	NV / NV / NV / oui / oui	(Sergeant, Sablonniere et al. 2001; Jiang, Mankodi et al. 2004; Leroy, Dhaenens et al. 2006; Dhaenens, Schraen-Maschke et al. 2008; Dhaenens, Tran et al. 2011)
		E (exon 10)	NV / non	NV / non	NV / oui	(Jiang, Mankodi et al. 2004; Dhaenens, Tran et al. 2011)
		I (exon 6c) et E (exon 6d)	Oui	Oui	NV	(Leroy, Wang et al. 2006)

Gènes	Système biologique utilisé	Altération	Protéine de liaisons à l'ARNm impliquée dans l'épissage alternatif			Références
			MBNL1	CUGBP1	ETR3	
N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR1)	Cerveaux humains DM1	E (exon 5)	NV	NV	NV	(Jiang, Mankodi et al. 2004)
Amyloid Precursor Protein (APP)		I (exon 7)				

Tableau 3 : Les épissages alternatifs altérés dans DM1 et les protéines de liaisons à l'ARN impliquées

R : Rétention ; E : Exclusion ; I : Inclusion ; NV : Non vérifié ; - : le défaut de la protéine de liaison à l'ARN n'a pas été retrouvé dans le modèle utilisé.

2.1.3.1. Altération des protéines de liaison à l'ARNm dans la DM1

Les protéines de liaisons aux ARNs s'élèvent à environ 500 chez l'Homme et sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires. Elles ont des fonctions variées dans la régulation des ARN pre-messager ou messenger et leurs maturations transcriptionnelles du noyau vers le cytoplasme (Hinman and Lou 2008; Lukong, Chang et al. 2008). De manière plus précise, elles peuvent modifier les ARNm par conversion de nucléotides, modifier leur polyadenylation, leur export cytoplasmique ou encore leur stabilité, et ceci en se fixant à des motifs précis et définis. Elles peuvent également réguler les épissages alternatifs et avoir un rôle sur la traduction (Glisovic, Bachorik et al. 2008).

Pour expliquer le mécanisme gain de fonction de l'ARN mutant impliqué à la fois dans la DM1 et la DM2, il a été suggéré que la présence des *foci* pouvait entraîner la titration de protéines nucléaires communes aux deux pathologies. La protéine CUGBP1 a été alors identifiée sur la base de sa capacité à se fixer sur des répétitions CUG *in vitro*. Bien qu'un nombre croissant de données indiquent l'implication de CUGBP1 dans la DM1, sa co-localisation dans les *foci* nucléaires n'a jamais pu être observée. Cependant, il a été montré que la protéine à doigt de zinc, MBNL1, un homologue mammifère de la protéine muscleblind identifiée chez la drosophile, co-localisait avec les ARN mutants dans le noyau (Fardaei, Larkin et al. 2001). Depuis, un certain nombre de composants cellulaires ont été identifiés pour être séquestrés ou altérés, comme les protéines d'épissages Staufen1 ou les hnRNP H et F (Jiang, Mankodi et al. 2004; Mutsuddi, Marshall et al. 2004; Ravel-Chapuis, Belanger et al. 2012), les facteurs de transcription Sp1 (*Specificity factor 1*), les protéines STAT1/STAT3 et également les récepteurs gamma à l'acide rétinoïque (RAR γ) (Ebralidze, Wang et al. 2004; Botta, Vallo et al. 2007).

Les deux familles de protéines de liaisons à l'ARN les plus étudiées par leurs rôles dans la DM1 sont les MBNLs (*Muscleblind*) et les CELFs (*CUG-BP and ETR3-like factors*) puisqu'ils sont majoritairement altérés chez les patients et dans les modèles de souris DM1 (Tableau 4). Ils sont responsables de l'altération de nombreux épissages alternatifs (Tableau 3) et défauts cellulaires qui seront décrits dans le paragraphe suivant.

Equipe	Tissus	Modification génique	Phénotype	Foci	Altération des protéines de liaison à l'ARN			Références
					MBNL	CUGBP1	ETR3	
Thornton	Muscle squelettique	Actine squelettique humaine 250CTG (HSA-LK)	Myotonie, histologie DM1	Nucléaire	NV/Colocalisation foci	NV/Pas d'augmentation	NV/NV	(Mankodi, Logigian et al. 2000) Lin, Miller et al. 2006)
	Muscle squelettique	Actine squelettique humaine 5CTG	Pas de phénotypes	Non présents	NV	NV	NV	
Cooper	Muscle squelettique	DMPK 960CTG inductible, muscle spécifique	Myotonie, histologie DM1	Nucléaire	Colocalisation foci	Augmentation	NV	(Orengo, Chambon et al. 2008)
	Cœur	DMPK 960CTG inductible, muscle spécifique	Arythmie, cardiomyopathie systolique et diastolique	Nucléaire	Colocalisation foci	Augmentation	Augmentation	
Mahadevan	Ubiquitaire	DMPK5'UTR-GFP-DMPK3'UTR CTG5 inductible	Myotonie, histologie DM1, conduction cardiaque anormale	Non présents	Pas de différence	Pas de différences	Pas de différences	(Mahadevan, Yadava et al. 2006; Yadava, Frenzel-McCardell et al. 2008)
		DMPK5'UTR-GFP-DMPK3'UTR CTG200 inductible	Myotonie, histologie DM1, conduction cardiaque anormale	Présents	Colocalisation foci	Augmentation dans le muscle mais pas dans le cœur	Augmentation	
Reddy	Cœur	Chaîne lourde α de la myosine-LacZ-CTG400 inductible	Faible dysfonctionnement cardiaque	Cytoplasmique	Faible colocalisation foci	Augmentation	NV	(Dansithong, Wolf et al. 2008)
Gourdon	Ubiquitaire	DMPK humain avec 300 CTG	Histologie, moléculaire et électrophysiologie similaire à DM1	Nucléaire	NV	NV	NV	(Seznec, Agbulut et al. 2001)
		DMPK humain avec 550 CTG	Histologie, moléculaire et électrophysiologie similaire à DM1	NV	NV	NV	NV	
		DMPK humain avec 700 CTG(DMSXL) DMPK humain avec 1000 à 1700 CTG (DMSXXL)	Petite taille / Problèmes de croissance / Forte mortalité/Anomalies musculaire et cérébrales	NV	NV	NV	NV	

Tableau 4 : Modèles murins de la DM1 et conséquences pathologiques des protéines de liaisons à l'ARN

NV : Non vérifié

2.1.3.1.1. La famille des Muscleblind (MBNL)

Il existe trois gènes MBNLs (MBNL1, 2 et 3) localisés respectivement sur les chromosomes 3,13 et X. Ils codent des protéines de liaisons à l'ARN à doigts de zinc, très conservées chez les mammifères (Fardaei, Rogers et al. 2002) et impliquées de manière essentielle dans la régulation de l'épissage alternatif des ARNm. Les MBNLs sont présentes dans de nombreux tissus, MBNL1 étant la plus abondante (Pascual, Vicente et al. 2006; Holt, Jacquemin et al. 2009), et est exprimée dans le cerveau, les reins et les muscles squelettiques et cardiaques (Tableau 5).

	MBNL1	MBNL2	MBNL3
Expression dans les tissus	Cerveau, rein, foie, pancréas, muscles striés	Cerveau, rein, foie, pancréas, muscles striés	Cerveau, rein, foie, pancréas, placenta
Références	(Miller, Urbinati et al. 2000; Fardaei, Rogers et al. 2002; Squillace, Chenault et al. 2002)		

Tableau 5 : Expression et localisation des MBNLs chez l'Homme

2.1.3.1.1.1. Mécanismes moléculaires des MBNLs

Les gènes *MBNLs* sont soumis à des épissages alternatifs donnant lieu à de nombreuses isoformes (Fardaei, Rogers et al. 2002; Kino, Mori et al. 2004; Tran, Gourrier et al. 2011). Ces protéines sont composées de tandem de domaines à doigt de zinc contenant des résidus cystéines et histidine (CCCH). Bien qu'ils possèdent des sites de phosphorylation pour la PKC (*Protein Kinase C*) et la CK2 (*Caseine Kinase 2*) (Monferrer and Artero 2006), la régulation par ces kinases n'a pas été démontrée. Les protéines MBNLs se fixent aux motifs CNNG et CNG répétés (N représente les nucléotides A, U ou C) (Miller, Urbinati et al. 2000; Kino, Mori et al. 2004) et les motifs YGCU(U/G)Y (Y représente les pyrimidines) (Ho, Charlet et al. 2004; Goers, Purcell et al. 2010) et c'est par cette propriété que leurs rôles dans la DM1 a été suggérée (Mirkin 2007). Dans cette partie, MBNL1 sera principalement détaillé puisque son rôle dans la DM1 a été le plus étudié.

2.1.3.1.1.2. Altération de MBNL1 dans la DM1

L'implication de MBNL1 provient d'un criblage qui visait à mettre en évidence les protéines se liant spécifiquement à de longues expansions de répétitions CUG (Miller, Urbinati et al. 2000). De plus, l'étude de l'homologue *Mbnl1* chez la drosophile a montré

qu'elle était requise pour la différenciation des photorécepteurs et la différenciation musculaire, faisant de cette protéine un candidat intéressant pour la pathologie DM1 (Begemann, Paricio et al. 1997; Artero, Prokop et al. 1998). *In vivo*, MBNL1 co-localise avec les *foci* et sa séquestration nucléaire dans ces structures entraîne une baisse de sa disponibilité cytoplasmique (Miller, Urbinati et al. 2000; Mankodi, Urbinati et al. 2001; Fardaei, Rogers et al. 2002). Ceci a été validé dans de nombreux modèles murins pour la DM1 (Tableau 4) et dans des biopsies de patients (Tableau 3). La perte de fonction de MBNL1 a été corrélée au nombre de répétitions CTG et donc à la sévérité de la maladie (Miller, Urbinati et al. 2000). Il faut bien noter que l'altération de MBNL1 est un problème de disponibilité et de localisation cellulaire et non pas d'expression puisque celle-ci ne varie pas dans la DM1 (Nezu, Kino et al. 2007).

2.1.3.1.1.3. Les conséquences de l'altération de MBNL1 dans l'épissage alternatif

Afin de mieux comprendre les conséquences de la perte de fonction de MBNL1 dans la DM1, un modèle de souris *Mbnl1*^{-/-} (*Mbnl1*^{Δ3/Δ3}) a été créé, révélant une myotonie, des défauts visuels et plus particulièrement une cataracte (Kanadia, Johnstone et al. 2003). De manière intéressante, ces souris ne présentent pas d'atrophie musculaire, mais l'observation histologique du muscle révèle toutefois une centralisation des noyaux des fibres, montrant l'implication de MBNL1 dans l'homéostasie musculaire. La prédominance et la spécificité de MBNL1 comme protéine impliquée dans la symptomatologie DM1 ont été vérifiées par le développement d'un modèle de souris *Mbnl2*^{-/-} qui ne présentent qu'un phénotype modéré (Hao, Akrami et al. 2008). D'un point de vue transcriptionnel, le modèle *Mbnl1*^{-/-} a permis de mettre en évidence des défauts d'épissages d'un certain nombre de pré-ARNm comme le *Clcn1* (*Chloride channel 1*), la *Tnnt2* (Troponine T squelettique) et la *Tnnt3* (Troponine T cardiaque) (Tableau 6).

	Modèles	Phénotype	Conséquences moléculaires	Références
Gain de fonction	AAV MBNL dans HSA ^{LR} 250 CTG	Réversion de la myotonie	Restauration du défaut d'épissage du <i>Clcn1</i> , <i>Cypher</i> , <i>Serca1</i> et <i>Tnnt3</i>	(Kanadia, Shin et al. 2006)
Perte de fonction	<i>Mbnl1</i> ^{-/-}	Cataracte, myotonie, pas d'atrophie mais centralisation des noyaux des fibres musculaires Baisse de la motivation et apathie	<u>Muscle</u> : Défaut d'épissage alternatif du <i>Tnnt2</i> , <i>Tnnt3</i> , <i>Clcn1</i> <u>Cerveau</u> : Défaut d'épissage de <i>Sorb1</i> , <i>Dclk</i> , <i>Spag9</i>	(Kanadia, Johnstone et al. 2003; Lueck, Mankodi et al. 2007; Matynia, Ng et al. 2010; Suenaga, Lee et al. 2012)

Tableau 6 : Les modèles *in vivo* de gain et de perte de fonction de MBNL1

In vitro, l'application d'un siRNA spécifiquement dirigé contre *MBNL1* dans des myoblastes de patients permet de réduire de 70% le nombre de *foci* et de valider son rôle dans l'épissage de la *Tnnt2* et de l'IR (Dansithong, Paul et al. 2005; Ho, Bundman et al. 2005). Le gain de fonction de *MBNL1* a été étudié dans le modèle HSA^{LR} de l'équipe de Charles Thornton qui développe des défauts musculaires « DM1-like ». La délivrance de *MBNL1* dans ce modèle, par un AAV (*Adeno-Associated-Virus*), permet de reverser le défaut d'épissage du *Clcn1* ainsi que la myotonie associée démontrant le potentiel thérapeutique de cette approche. (Kanadia, Shin et al. 2006).

Quelques études se sont intéressées à l'implication de *MBNL1* au niveau des épissages altérés du système nerveux central, notamment Tau (Sergeant, Sablonniere et al. 2001; Jiang, Mankodi et al. 2004; Leroy, Dhaenens et al. 2006; Leroy, Wang et al. 2006). Des minigènes contenant les régions d'épissages d'intérêt de Tau ont été développés, permettant de mesurer leur inclusion ou leur exclusion. L'utilisation d'un minigène contenant l'exon2/3 de Tau avec un siRNA dirigé contre *MBNL1* dans des cellules HeLa, suffit à diminuer l'inclusion de l'exon 2, comme ce que l'on peut retrouver chez les patients (Sergeant, Sablonniere et al. 2001; Dhaenens, Schraen-Maschke et al. 2008). De manière intéressante, le rôle de *MBNL1* semble spécifique de cet exon puisque la même manipulation avec un minigène contenant l'exon 10 ou l'exon 6 n'entraîne pas de modifications d'inclusion. Cependant, *in vitro*, une surexpression de *MBNL1* n'entraîne pas de différences d'inclusion de l'exon2, montrant la nécessité d'autres modèles pour valider son rôle dans les épissages neuronaux (Leroy, Dhaenens et al. 2006; Dhaenens, Tran et al. 2011).

L'accès aux nouvelles technologies telles que les puces à exons ou les études transcriptomiques ont permis de grandes avancées dans la compréhension des mécanismes de la DM1. Des récentes études utilisant ces technologies ont permis de mettre en évidence de nouvelles altérations d'épissages impliquant *MBNL1*.

Tout d'abord, un transcriptome différentiel a été effectué entre les muscles squelettiques de souris *Mbnl1*^{-/-} et de souris HSA^{LR} (insertion d'un transgène contenant l'actine squelettique humaine avec 250 répétitions CTG) afin de voir le rôle de *MBNL1* dans les muscles squelettiques de modèles murins de DM1. La perte de fonction de *MBNL1* expliquerait 80 % des défauts d'épissages observés dans le modèle HSA^{LR} et les voies altérées sont impliqués dans la signalisation du calcium, l'homéostasie ainsi que les gènes du

réticulum sarcoplasmique et les gènes de la matrice extracellulaire (Osborne, Lin et al. 2009; Du, Cline et al. 2010).

Récemment, une étude un peu similaire a été effectuée pour comprendre le rôle de MBNL1 dans le système nerveux central. Une analyse transcriptomique par puce à exons sur des cerveaux de souris *Mbnl1*^{-/-}, et validée dans des échantillons de patients DM1, a permis de trouver 14 nouveaux candidats présentant un épissage altéré. Étonnamment, certains pré-ARNm connus pour être régulés par MBNL1, comme *Grin1* (homologue murin du NMDAR), *APP* ou *Tau*, ne sont pas altérés dans les souris *Mbnl1*^{-/-} (Suenaga, Lee et al. 2012). Ceci pourrait être associé à la complexité cellulaire du cerveau, qui masquerait l'effet de la perte de MBNL1 dans des types cellulaires particuliers. Pour conclure, l'implication véritable de MBNL1 pour l'épissage de *Tau* n'est toujours pas résolue.

Toutes ces informations tendent à soutenir l'implication de MBNL1 dans la physiologie musculaire, et potentiellement cérébrale, et suggèrent que sa déplétion dans la DM1 est capable de provoquer de nombreux défauts notamment au niveau de l'épissage alternatif du *CIC-1*, de *SERCA1*, *TNNT2*, *TNNT3*, de *Tau* et également de l'IR. Cependant, ces résultats montrent également que la perte de fonction de MBNL1 n'est pas le responsable unique des multiples désordres moléculaires de la DM1 et que d'autres mécanismes agissent en synergie.

2.1.3.1.2. Les CELFs

Les CELFs appartiennent à une famille de protéines de liaison aux ARNs qui comptent six membres très conservés au cours de l'évolution (Good, Chen et al. 2000; Ladd, Charlet et al. 2001; Loria, Duke et al. 2003; Ladd, Nguyen et al. 2004). Les CELFs sont des protéines ubiquitaires (Tableau 7) bien que leurs fonctions physiologiques aient été décrites principalement dans le muscle squelettique, cardiaque ainsi que dans le cerveau. Elles sont impliquées dans la régulation de l'épissage alternatif, l'édition et la stabilité des ARNs ainsi que dans l'initiation de la traduction. Deux membres de la famille seront détaillés plus particulièrement de par leurs rôles dans la DM1 : *CUGBP1* (CEL1) et *ETR3* (CEL2).

	CUGBP1 / CELFI /BRUNOL2	CUGBP2 / CELF2 /ETR3 /BRUNOL3	CELF3	CELF4 /BRUNOL4	CELF5 /BRUNOL5	CELF6 /BRUNOL6
Expression dans les tissus	Ubiquitaire	Muscle squelettique et cardiaque, Cerveau	Cerveau	Nombreux tissus	Cerveau	Rein, Cerveau et Testicules
Références	(Choi, Ito et al. 1998; Good, Chen et al. 2000; Ladd, Charlet et al. 2001; Meins, Schlickum et al. 2002; Loria, Duke et al. 2003; Ladd, Nguyen et al. 2004; Yang, Mahaffey et al. 2007)					

Tableau 7 : Nomenclature et localisation des CELFs chez l'Homme

2.1.3.1.2.1. Mécanismes moléculaires des CELFs

Chaque CELFs contient trois domaines RRM (*RNA-Recognition Motifs*), les RRM1 et RRM2 en position N-terminale séparés du RRM3 en C-terminale par un domaine divergent. Ces RRMs sont importants pour la liaison protéine/ARN et la séquence divergente semble être à l'origine de l'activité d'épissage alternatif et de la localisation cellulaire (Ladd and Cooper 2004; Singh, Charlet et al. 2004). L'implication des CELFs dans la physiopathologie de DM1 a pour origine leur capacité à se lier à des répétitions CUG simple brin (Timchenko, Miller et al. 1996). A l'inverse de MBNL1, elles ne sont capables de se fixer qu'à des répétitions CUG simple brin, expliquant qu'elles ne co-localisent pas avec les *foci*, (Fardaei, Larkin et al. 2001; Mankodi, Teng-Umuay et al. 2003; Jiang, Mankodi et al. 2004). Les CELFs se fixent à des séquences spécifiques riches en GU principalement décrites dans des régions 3'UTR et 5'UTR des ARNm, CUGBP1 se fixant préférentiellement aux séquences UGU (Marquis, Paillard et al. 2006) et ETR3 aux motifs UGUU (Faustino and Cooper 2005).

2.1.3.1.2.2. Altération de CUGBP1 et d'ETR3 dans la DM1

L'expression de CUGBP1 et d'ETR3 diminuent, après la naissance, dans les muscles striés normaux (Ladd, Taffet et al. 2005; Kalsotra, Xiao et al. 2008). Cette extinction est due à des modifications post-transcriptionnelles associées à un changement de phosphorylation des protéines CUGBP1 et ETR3 qui va affecter leurs stabilités ainsi que la répression de la traduction de leurs ARNm par des microARNs (Kalsotra, Wang et al. 2010). Il est intéressant de noter que la diminution de CUGBP1 dans le cœur post-natal est uniquement nucléaire alors qu'ETR3 diminue dans la fraction nucléaire mais également cytoplasmique démontrant un mécanisme de régulation différent entre ces protéines (Kalsotra, Xiao et al. 2008). Les mécanismes de régulation d'ETR3 ont été moins étudiés que CUGBP1. Par leurs similitudes

de structure et de fonction, les rôles d'ETR3 sont souvent extrapolés des fonctions de CUGBP1.

CUGBP1 est une phosphoprotéine présente dans le noyau et dans le cytoplasme et est régulée par de nombreuses kinases. Dans le contexte DM1, la PKC s'hyperactive et hyperphosphoryle CUGBP1, ce qui augmenterait sa stabilité et sa demi-vie nucléaire (Kuyumcu-Martinez, Wang et al. 2007). Par ailleurs, l'implication de la PKC a été démontrée dans un modèle cardiaque de souris DM1 dans lequel son inhibition entraîne une amélioration du phénotype cardiaque (Wang, Kuyumcu-Martinez et al. 2009). Cependant, le mécanisme d'hyper-activation de la PKC dans la DM1 est encore inconnu. ETR3 possède également des sites de phosphorylation prédictifs (Ladd, Charlet et al. 2001; Ladd, Nguyen et al. 2004) supposant un mécanisme similaire de régulation par ces kinases.

CUGBP1 s'accumule sous une forme phosphorylée dans le noyau de cellules musculaires ou neurales DM1, entraînant une augmentation de sa concentration relative (Roberts, Timchenko et al. 1997; Timchenko, Welm et al. 1999; Savkur, Philips et al. 2001; Timchenko, Cai et al. 2001; Timchenko, Iakova et al. 2001; Paul, Dansithong et al. 2006; Dhaenens, Tran et al. 2011). L'augmentation de CUGBP1 et d'ETR3 a également été confirmée dans plusieurs modèles de souris DM1 (Tableau 4). De plus, il a été montré que dans la DM1, l'altération de CUGBP1 n'est pas transcriptionnelle puisque son gène n'est pas différentialement exprimé (Nezu, Kino et al. 2007).

Afin de mieux comprendre les conséquences de l'altération des CELFs dans la DM1, des modèles de gain et de perte de fonction ont été développés (Tableau 8). A ce jour, seul des modèles de CUGBP1 ont été créés, le rôle d'ETR3 étant hypothétiquement proposé par leurs similitudes structurales.

La perte de fonction de CUGBP1 spécifiquement dans le cœur montre une hypertrophie cardiaque ainsi qu'une cardiomyopathie qui peuvent être atténuées par la restauration exogène de la protéine (Ladd, Taffet et al. 2005). Dans des modèles de drosophiles DM1 (insertion de 480 répétitions CTG), la surexpression de CUGBP1 aggrave la dégénérescence musculaire dues aux expansions de triplets (de Haro, Al-Ramahi et al. 2006)

	Modèle	Phénotype	Conséquences moléculaires	Références
Gain de fonction	CUGBP1 constitutif spécifiquement muscle squelettique	Pas de myotonie mais retard développemental, dystrophie musculaire, histologie musculaire DM1	Surexpression de Mef2a, p21	(Timchenko, Patel et al. 2004)
	CUGBP1 constitutif spécifique muscles striés	Pas de myotonie mais fibres dégénérantes, histologie musculaire DM1,	modification d'épissage alternative de Mtmr1, Clcn1, Tnnt2	(Ho, Bundman et al. 2005)
	GUGBP1 constitutif spécifiquement dans le cœur + CUGBP exogène	Diminution des anomalies cardiaques		(Ladd, Taffet et al. 2005)
	CUGBP1 inductible spécifique muscles cardiaques	Dysfonctionnement cardiaque, mortalité précoce		(Koshelev, Sarma et al. 2010)
	CUGBP1 inductible spécifique muscles squelettiques	Pas de myotonie mais retard développementale, dystrophie musculaire, histologie musculaire DM1	modification de nombreux épissage comme MTMR1, Tnnt2, Serca1 mais pas Clcn1	(Ward, Rimer et al. 2010)
Perte de fonction	Dominant négatif de GUGBP1 spécifiquement dans le cœur	Hypertrophie cardiaque, cardiomyopathie	Modification de l'épissage de Mtmr et Mef2a	(Ladd, Taffet et al. 2005)
	Dominant négatif de CUGBP1 dans souris HSA-LR	/	Restauration de l'épissage cTnnT, Nrap	(Berger and Ladd 2012)

Tableau 8 : Les modèles *in vivo* de gain et de perte de fonction des CELFs

De même, des souris surexprimant CUGBP1 spécifiquement dans le muscle squelettique montrent un retard développemental, une dystrophie musculaire avec une altération histologique et également des défauts cardiaques. A cause de la létalité périnatale, la myotonie n'a pu être évaluée dans ces modèles (Timchenko, Patel et al. 2004; Ho, Bundman et al. 2005). Pour voir l'effet d'une surexpression de CUGBP1 dans un tissu adulte complexe, l'équipe de Thomas Cooper a créé un modèle inductible de *CUGBP1* dans le muscle squelettique qui a permis d'observer un retard développemental et les phénotypes musculaires et cardiaques typiques de la DM1 (Ward, Rimer et al. 2010). La myotonie n'est toujours pas présente, validant le rôle majoritaire de MBNL1 comme régulateur de l'épissage alternatif du CLC1 et par extension du symptôme myotonique.

D'un point de vue transcriptionnel, les CELFs régulent un certain nombre de mécanismes tel que l'épissage alternatif, la déadenylation, la dégradation ainsi que la traduction et la stabilité des ARNm (Dasgupta and Ladd 2012).

2.1.3.1.2.2.1. Rôle dans l'épissage alternatif

Dans les muscles striés de patients DM1, les CELFs régulent les épissages de la cTNT, l'IR ou encore MTMR1 (*Myotubularin 1*), résumés dans le tableau 3. Récemment, il a été montré que la perte de fonction de CUGBP1 par l'expression d'un dominant négatif dans le modèle murin HSA^{LR} restaure un certain nombre d'épissage musculaire CELF-spécifique, révélant une implication évidente de ce facteur dans les défauts DM1 (Berger and Ladd 2012).

ETR3 semble être impliqué de manière plus spécifique dans les altérations du système nerveux que CUGBP1 mais le rôle similaire ou antagoniste de ces deux facteurs pour l'épissage alternatif n'a toujours pas été clairement défini. En effet, l'épissage alternatif de Tau semble être régulé par ETR3 et non par CUGBP1 (Dhaenens, Tran et al. 2011). Ce rôle spécifique d'ETR3 dans l'épissage alternatif de Tau suggère un rôle différent alors que l'épissage de l'alpha-actinine par exemple est régulé de manière similaire par CUGBP1 (Gromak, Matlin et al. 2003). Ceci pourrait potentiellement être expliqué par leurs expressions et leurs régulations qui différeraient selon le tissu.

Comme expliqué précédemment, le rôle d'ETR3 étant moins bien connu et plus hypothétique, le prochain paragraphe focalisera principalement sur la fonction de CUGBP1.

2.1.3.1.2.2.2. Rôle dans la traduction des ARNm

Le modèle de surexpression constitutif de *CUGBP1* dans le muscle squelettique développé par l'équipe de Timchenko a permis de mettre en évidence un autre rôle dans la régulation de la traduction d'ARNm de facteur de transcription. CUGBP1 est capable d'activer la traduction de *Mef2a* (*Myocyte enhancer factor 2A*) et de p21 (*Protein 21*). Ces cibles sont d'autant plus intéressantes que *Mef2a* est impliquée dans la myogenèse et que p21 est un inhibiteur du cycle cellulaire. Ces protéines, surexprimées dans les muscles squelettiques de patients DM1 (Iakova, Wang et al. 2004; Timchenko, Patel et al. 2004; Beffy, Del Carratore et al. 2010), pourraient expliquer la difficulté des myoblastes DM1 à se différencier en altérant l'expression de protéines musculaires telles que MyoD (détaillé dans la section 2.2.1.2.3.1).

2.1.3.1.2.2.3. Rôle dans la stabilité des mRNA

En plus de ses rôles dans l'épissage alternatif et la régulation de la traduction, il a été montré que CUGBP1 a également un rôle dans la stabilité de certains ARNm tels que ceux du TNF (*Tumor Necrosis Factor*) et de c-fos (Moraes, Wilusz et al. 2006). Dans des myoblastes issus de patients DM1, les ARNm codant pour le TNF sont stabilisés et par conséquent l'expression protéique globale est augmentée. Ce phénotype a été corrélé avec une déplétion de CUGBP1 (Zhang, Lee et al. 2008). La fonction de déstabilisation de CUGBP1 pourrait donc être altérée suite aux modifications de son état de phosphorylation dans la DM1 et conduire à la stabilisation aberrante de certains facteurs. Ce mécanisme passerait par la fixation de CUGBP1 à des séquences ARE (*AU-Rich-Element*) et GRE (*GU-Rich-Element*) dans la région 3'UTR de ses ARN cibles et entraînerait le recrutement de dé-adenylases tel que PARN (*Poly(A)-specific Ribonuclease*) (Moraes, Wilusz et al. 2006; Vlasova and Bohjanen 2008).

2.1.3.1.3. Interaction de MBNL1 et des CELFs

Le gain de fonction toxique des transcrits mutants passe donc par l'altération de protéines de liaisons à l'ARN comme les MBNLs et les CELFs. La particularité de la DM1 provient du fait que de nombreux profils d'épissages à l'âge adulte correspondent à un profil d'épissage de type fœtal (Buj-Bello, Furling et al. 2002; Charlet, Savkur et al. 2002; Jiang, Mankodi et al. 2004; Kalsotra, Xiao et al. 2008). De manière intéressante, la protéine CUGBP1 intervient dans la régulation du profil d'épissage fœtal de plusieurs gènes et son activité diminue à la naissance. A l'inverse, lorsque la protéine MBNL prédomine, le profil d'épissage est adulte (Lin, Miller et al. 2006; Kalsotra, Xiao et al. 2008). Ce serait donc la transition de l'expression de ces protéines qui serait responsable du profil embryonnaire/adulte de leurs gènes cibles. L'altération de ces protéines dans la DM1, conduirait à l'inversion de ces profils d'épissages.

Cette hypothèse est renforcée par l'étude de l'altération des transcrits *TNNT2* dont les transcrits sont anormalement épissés dans le muscle squelettique de patients DM1 ainsi que dans des modèles cellulaires de surexpression de répétitions de CTG (Philips, Timchenko et al. 1998).

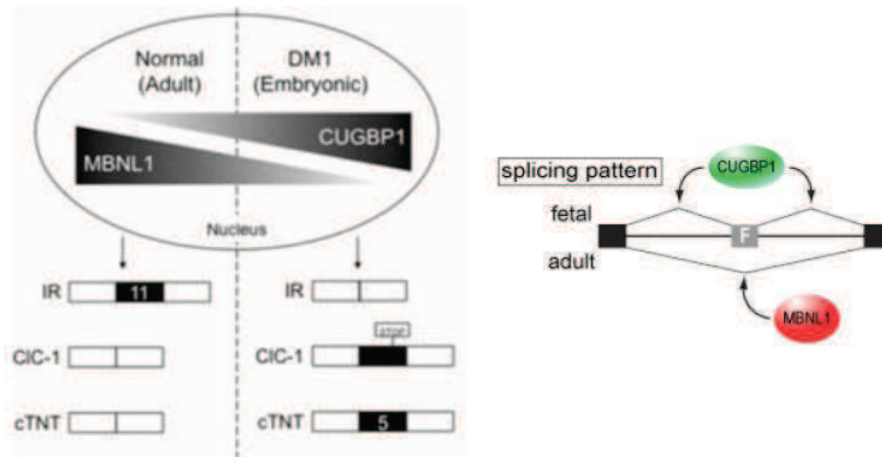


Figure 8 : Effet antagoniste des CUGBP1 et MBNL1 au cours du développement et dans la transition des épissages adultes/fœtaux dans la DM1

Cic-1 : Canal Chlore, IR : Récepteur à l'insuline, cTNT : Troponine cardiaque (Lee and Cooper 2009)

L'épissage alternatif de *TNNT2* est régulé au cours du développement cardiaque par l'exclusion ou l'inclusion de l'exon5 qui va déterminer respectivement le profil adulte ou fœtal. Dans la DM1, la persistance de CUGBP1 et la diminution de MBNL1 entraînent une augmentation de l'inclusion de l'exon5, ce qui aboutit à un profil fœtal chez l'adulte, supposé à l'origine des défauts cardiaques des patients DM1.

Cependant, certains épissages ne respectent pas ce retour à « l'état fœtal » dans la DM1. C'est le cas du *Grin1* dans le cerveau des souris *Mbnl1*^{-/-} et également *Tau* au niveau du système nerveux dont l'épissage correspond à un profil adulte (Dhaenens, Schraen-Maschke et al. 2008; Suenaga, Lee et al. 2012). Ceci peut suggérer l'implication potentielle d'autres protéines d'épissages ou de mécanismes dépendants du tissu étudié.

Un criblage à large échelle a été effectué pour mieux comprendre les mécanismes de régulation de l'épissage alternatif au cours du développement cardiaque de la souris. En utilisant des puces à exons, 63 événements d'épissage différentiel ont été mis en évidence à différents stades du développement cardiaque. L'étude des motifs de fixation de protéines de liaisons à l'ARN de ces événements d'épissage a permis d'identifier MBNL1, CUGBP1 et ETR3. Ils réguleraient plus de la moitié des épissages testés (Kalsotra, Xiao et al. 2008) et de manière intéressante, MBNL1 et CUGBP1 étaient antagonistes à chaque fois l'un de l'autre, ETR3 n'ayant pas été vérifié.

Pour conclure, ces différentes protéines de liaison à l'ARN semblent être un maillon majeur de la chaîne des défauts moléculaires associés aux expansions CTG toxiques. Ils ont

permis de corrélérer certains défauts d'épissages à des signes cliniques de la pathologie comme le défaut du CLC1 avec la myotonie ou encore le défaut d'IR avec l'insulino-résistance des patients DM1. Cependant, d'autres mécanismes pathologiques semblent participer aux défauts histologiques du muscle cardiaque, du muscle squelettique ainsi que du système nerveux central des patients DM1.

Ainsi, il a été récemment montré que des transcrits anti-sens contenant de longues répétitions CAG peuvent être traduits en absence totale de codon ATG. Ce phénomène, appelé « RAN-Translation » (*Repeat Associated Non-ATG Translation*), aboutirait à la production de protéines homopolymériques de polyglutamines, polyserines et polyalanines (Figure 9). De façon intéressante, des agrégats nucléaires composés de ces protéines polyglutamines ont été détectés dans des biopsies de muscles squelettiques et des leucocytes de patients DM1 ainsi que dans du tissu cardiaque de souris DM1. La contribution pathologique de ces protéines n'est pas encore très claire. Il semblerait toutefois que la présence de ces protéines pourrait entraîner une augmentation de l'apoptose (Pearson 2011; Zu, Gibbens et al. 2011).

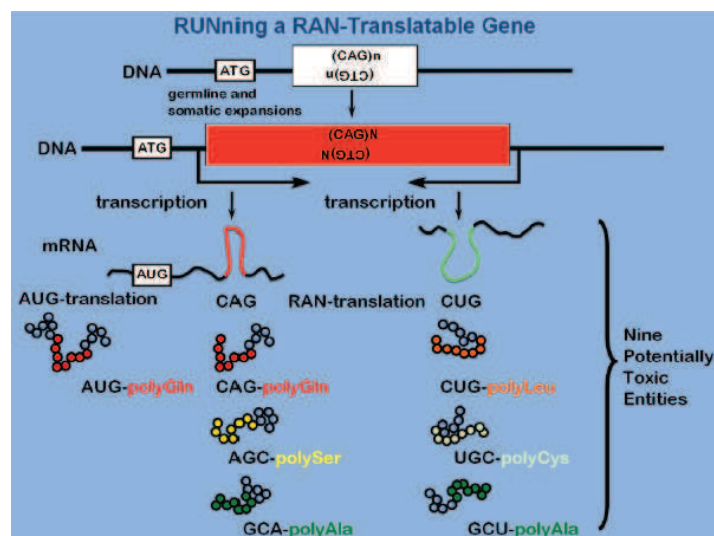


Figure 9: Principe du « RAN-Translation »

Les transcrits présentant des répétitions CAG ou CUG peuvent être traduits en absence d'un ATG initiateur (*RAN-translation*). La traduction s'effectue alors par toutes les possibilités de phase de lecture donnant potentiellement de nombreuses entités toxiques. (Pearson 2011)

De part mon travail de thèse, les affections du système nerveux et musculaires dans la DM1 seront principalement détaillées dans le paragraphe suivant. La contribution des différents modèles animaux et cellulaires pour la compréhension de ces affections sera plus particulièrement discutée.

2.2. Exemple de deux atteintes de la DM1: le muscle squelettique et le système nerveux central

De nombreux défauts histo-pathologiques ont été décrits dans des tissus DM1 variés (Figure 10). Bien que le cœur soit également touché, seul le muscle squelettique et le système nerveux central seront détaillés dans les paragraphes suivants car j'ai principalement travaillé sur ces deux tissus.

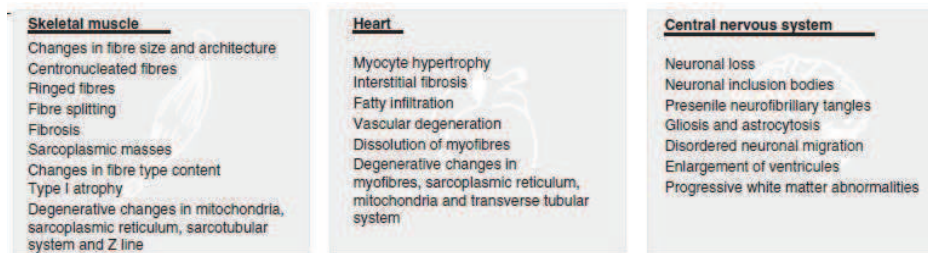


Figure 10: Histopathologie générale de la DM1

(Gomes-Pereira, Cooper et al. 2011)

2.2.1. Le muscle squelettique

La DM1 est caractérisée par une fonte et une perte musculaire progressive entraînant une atrophie des muscles distaux et des fibres de type I (lentes) alors que les muscles proximaux sont épargnés durant les phases précoces de la maladie. Cette fonte musculaire traduit une mauvaise réparation musculaire dont les causes sont encore mal connues. Pour comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires du muscle DM1, quelques notions sur l'organisation, le développement et la réparation musculaire seront abordées dans les sections suivantes.

2.2.1.1. Organisation générale du muscle squelettique

Le muscle squelettique est hautement organisé et composé de différents types cellulaires. Plusieurs couches de tissus conjonctifs (épimysium, périmysium, endomysium) permettent une connexion avec les autres tissus et constitue une armature de soutien pour les fibres musculaires (Figure 11).

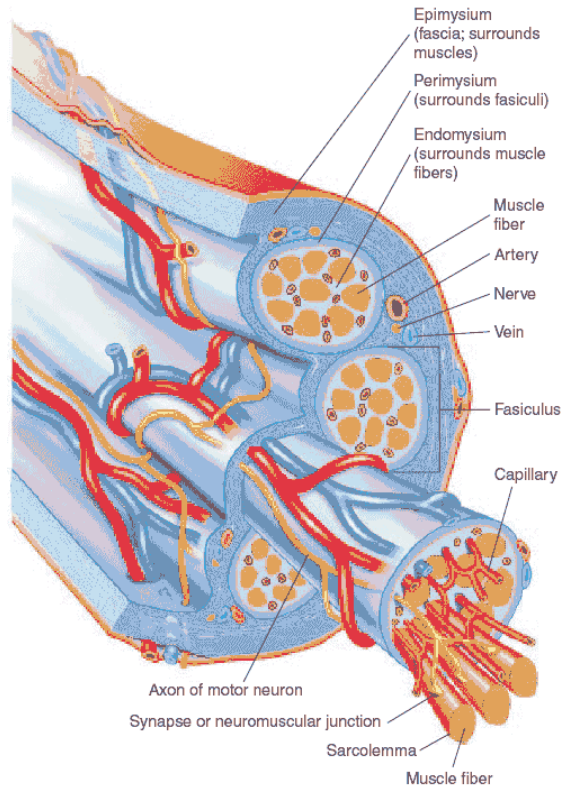


Figure 11 : Organisation du muscle squelettique

(http://www.shoppingtrolley.net/skeletal%20muscle_clip_image001.gif)

Les fibres musculaires sont innervées par des neurones moteurs et sensoriels, situés principalement sous le perimysium et elles sont contactées par des vaisseaux sanguins. Des cellules progénitrices, appelées cellules satellites, sont présentes entre la membrane cellulaire et le sarcolemme des fibres musculaires matures et interviennent dans la mise en place, la réparation et plus globalement l'homéostasie du tissu musculaire.

2.2.1.2. La myogenèse et la réparation musculaire

La myogenèse est le processus développemental de la mise en place d'un tissu musculaire fonctionnel dont les différentes étapes sont finement régulées par un certain nombre de facteurs myogéniques.

2.2.1.2.1. La myogenèse embryonnaire

Lors de la gastrulation, l'embryon va développer trois feuillets : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. La somitogenèse, qui commence dès la 3^{ème} semaine après

fécondation, est la mise en place des différentes structures mésodermiques d'un individu. Le mésoderme va se séparer anatomiquement en mésoderme paraxial (qui donnera le muscle strié, les vertèbres, le cartilage...), en mésoderme intermédiaire (qui donnera les futures gonades, reins et glandes surrénales) et en mésoderme latéral (qui donnera le système cardiovasculaire).

Le mésoderme paraxial, sous l'influence de gradients de morphogènes tels que le Wnt, le FGF (*Fibroblast Growth Factor*) et l'acide rétinoïque, va se condenser en deux structures : les somites, de part et d'autre du tube neural et de la notochorde (Figure 12).

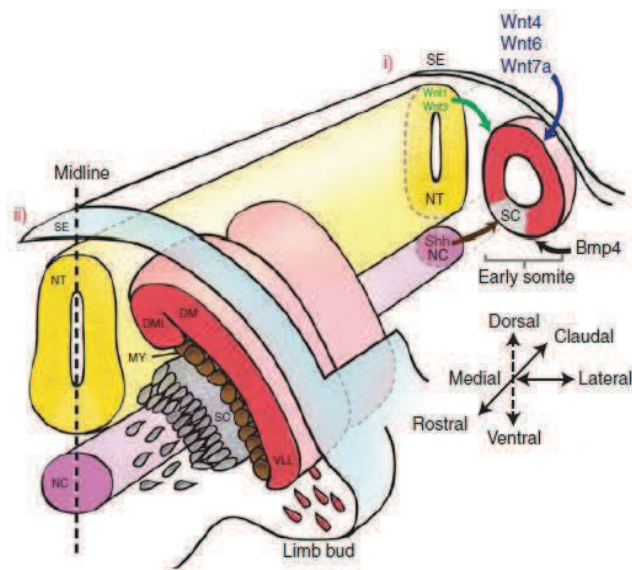


Figure 12 : La myogenèse embryonnaire

Schéma d'une coupe transversale d'embryon à un stade précoce (i) ou tardif (ii) de la somitogenèse. **i** : Des morphogènes sécrétés par différentes structures, vont spécifier le myotome pour donner le sclérotome (SC) et le dermomyotome (DM). Les Wnts sécrétés par le tube neural (NT) et l'ectoderme de surface (SE) ainsi que les BMPs (*Bone Morphogenetic Protein*) sécrétés par le mésoderme des plaques latérales maintiennent l'état indifférencié des somites. Au contraire, le Shh (*Sonic Hedgehog*) sécrété par la notochorde (NC) et le tube neural vont induire la formation du sclérotome. **ii** : les précurseurs musculaires (MPC) des lèvres dorsomédiales (DML) et ventrolatérale du dermomyotome, vont maturer pour donner le myotome (MY) (Bentzinger, Wang et al. 2012)

La partie des somites la plus ventrale forme le sclérotome qui contient des précurseurs du cartilage ou de l'os et la partie la plus dorsale devient le dermomyotome, source de cellules progénitrices. Les lèvres du dermomyotome vont ensuite maturer et former le myotome, une structure musculaire primitive dont la majorité des cellules expriment les facteurs précoces Pax3/Pax7. Ces cellules ont la capacité d'engager le programme myogénique en exprimant les facteurs musculaires MyoD et Myf5, caractéristiques des myoblastes prolifératifs (Figure 13) (Buckingham 2007).

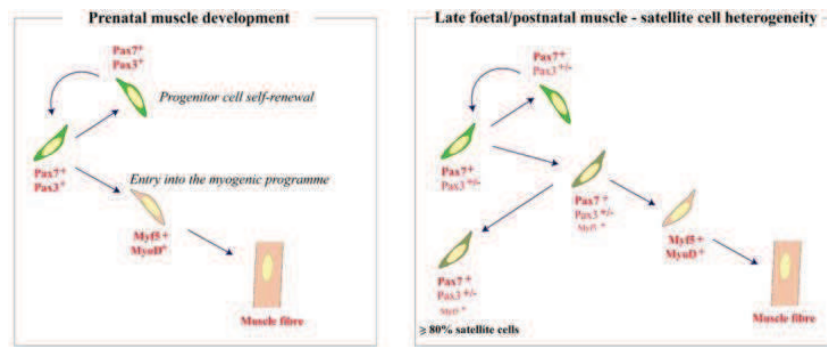


Figure 13: L'auto-renouvellement et la différenciation des progéniteurs Pax3/Pax7

Chez l'embryon (encadré gauche) et l'adulte (encadré droit)

(Buckingham 2007)

Ces cellules exprimant MyoD et Myf5 vont alors proliférer et migrer vers les sites de colonisation sous l'influence de facteurs environnementaux comme le FGF. Elles vont, suite à l'expression de facteurs de fusion musculaire tels que la myogénine ou Mrf4, former des syncytiums plurinucléés appelés myotubes. Ces myotubes primaires vont poursuivre leurs maturations en exprimant un éventail de gènes de structures pour donner les fibres primaires. Ils vont alors continuer de fusionner avec des cellules mononucléées restantes et donner les fibres secondaires (Bentzinger, Wang et al. 2012). C'est dans le cytoplasme de ces fibres que l'on retrouve l'unité contractile du muscle : les sarcomères, composés de myosine, d'actine et de titine. La maturation s'accompagne de la migration des noyaux en périphérie du syncytium et de l'innervation par des neurones qui leur permet de s'organiser en fibre musculaire et former leurs propres lames basales. Certaines des cellules mononucléées restantes en dessous des membranes sont à l'origine du pool de cellules satellites.

2.2.1.2.2. La réparation musculaire adulte

La myogenèse embryonnaire et la réparation musculaire chez l'adulte partagent un certain nombre de similitudes dans le processus général et les facteurs de transcription associés. La myogenèse post-natale consiste en la croissance physiologique du tissu et la régénération post-traumatique. Son organisation et sa hiérarchie d'expressions géniques sont très similaires à la myogenèse embryonnaire. Chez l'Homme, le muscle est un tissu stable avec un faible taux de renouvellement des noyaux. Par exemple, la durée de vie d'un muscle intercostal non traumatique est de l'ordre de 15 ans (Spalding, Bhardwaj et al. 2005). Cependant, le muscle est capable d'une grande plasticité qui lui permet d'adapter sa taille et

sa force en augmentant la synthèse protéique et le nombre de noyaux dans ses fibres musculaires par la fusion des myoblastes lors d'épisodes traumatiques comme une lésion ou un défaut génétique (Moraczewski, Archacka et al. 2008; Wallace and McNally 2009).

Une régénération rapide et extensive nécessite le recrutement de progéniteurs au site lésé, les cellules satellites, qui vont réguler l'homéostasie musculaire. Lors d'un traumatisme, elles s'activent et prolifèrent de manière asymétrique c'est-à-dire qu'une cellule satellite mère va engendrer une cellule mère identique qui renouvellera le pool initial, et une cellule fille qui va s'engager vers le phénotype myoblastique.

Les myoblastes ainsi générés expriment le facteur MyoD et, après plusieurs séries de divisions cellulaires, vont sortir du cycle cellulaire en sous-exprimant des cyclines (D1, D2, A) et en sur-exprimant des inhibiteurs de CDK (*Cyclin Dependant Kinase*) (p21^{cip} (CDKN1A), p27^{kip} (CDKN1B) et p57^{kip2} (CDKN1C)) (Zhang, Wong et al. 1999). Les myoblastes vont alors activer le programme myogénique pour fusionner les uns avec les autres (Molkentin and Olson 1996). Cet engagement dans le processus de différenciation entraîne la diminution de Myf5 et l'induction de la myogénine. Les myoblastes forment alors des myotubes naïfs plurinucléés. La maturation de ces myofibres se poursuit avec l'expression des gènes de différenciation tardive, tels que Mrf4 ainsi que des protéines de structures contractiles.

De nombreux facteurs extrinsèques participent à cette réparation, comme l'IGF (*Insulin Growth Factor*) ou les BMPs (*Bone morphogenetic proteins*), favorisant ou inhibant les étapes cruciales de sortie de cycle des progéniteurs puis de maturation des fibres musculaires (Figure 14).

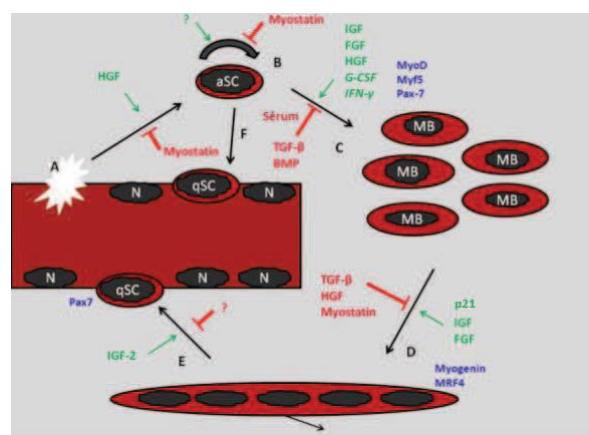


Figure 14 : Mécanismes de la réparation musculaire

A : Traumatisme musculaire, B : entrée dans le cycle cellulaire et activation des cellules satellites, C : Prolifération des cellules satellites, D: Fusion des myoblastes, E: Maturation des myotubes, F : reconstitution du pool de cellules satellites.

MB: Myoblaste; aSC: cellules satellites activées; qSC: cellules satellites quiescentes ; N: noyau(modifié de (Ten Broek, Greffe et al. 2010))

2.2.1.2.3. Les facteurs de régulation myogénique

La myogenèse est contrôlée selon une organisation spatio-temporelle très stricte d'induction ou de répression de gènes du lignage myogénique. Comme mentionné précédemment, plusieurs types de facteurs organisent ce réseau ; on peut citer notamment les facteurs appartenant à la famille des Pax (Pax3, Pax7), les MRFs (Myf5, MyoD, Mrf4, myogénine) et les protéines de la famille Six.

2.2.1.2.3.1. Les MRFs

Les MRFs participent activement aux processus myogéniques, et chacun à un rôle spécifique dans chaque étape de la myogenèse. Brièvement, *MyoD* et *Myf5* sont exprimés dans des cellules musculaires prolifératives indifférenciées (cellules satellites et myoblastes) alors que *myogénine* et *Mrf4* sont exprimés durant la différenciation myogénique et leur expression augmente significativement au stade myotube. Ces gènes sont d'ailleurs utilisés comme marqueurs de ce processus cellulaire.

Les études concernant les facteurs myogéniques MRFs (*muscle regulatory factor*) ont commencé dès 1987, quand le premier facteur myogénique, MyoD a été découvert. Ce facteur appartenant à la famille des facteurs de transcription bHLH (*basic helix-loop-helix*) était d'autant plus intéressant qu'il pouvait induire la transformation de cellules non musculaires, comme des fibroblastes, en cellules capables de fusionner en syncytium plurinucléés, les myotubes (Davis, Weintraub et al. 1987). Depuis, d'autres facteurs bHLH de la famille des MRFs ont été identifiés: les facteurs Myf5, myogénine et Mrf4 qui sont très conservés, et tous exprimés dans le lignage musculaire squelettique (Weintraub, Dwarki et al. 1991; Rudnicki and Jaenisch 1995). Les facteurs de transcription bHLH s'organisent en hétérodimères et se fixent sur des séquences consensus appelé E-Box (CANNTG) (Chaudhary and Skinner 1999), retrouvées dans de nombreux promoteurs de gènes musculaires comme la créatine kinase musculaire, le récepteur α et δ à l'acétylcholine ainsi que la chaîne légère de la myosine (Massari and Murre 2000).

Les MRFs sont capables de se compenser les uns les autres suite à la perte ou à l'excès d'un de ces facteurs (par une mutation ou une mauvaise régulation). En effet, il a été montré que dans des souris *MyoD*^{-/-} une musculature normale à la naissance était présente, et ceci grâce à une compensation par *Myf5* dont l'expression est augmentée de trois fois (Rudnicki, Braun et al. 1992). De la même manière, les souris *Mrf4*^{-/-} présentent un phénotype normal à

l'exception d'anomalies bénignes thoraciques. La différenciation terminale est possible grâce à une compensation par la myogénine (augmentation de l'expression de trois fois) (Zhang, Behringer et al. 1995).

Il s'agit donc d'une balance entre les facteurs MyoD et Myf5 qui permettent de créer et de maintenir un pool suffisant de cellules indifférenciées et prolifératives (anti-engagement dans la différenciation) et les facteurs myogénine et Mrf4 qui permettent d'avoir un nombre suffisant de cellules différenciées (pro-engagement dans la différenciation).

2.2.1.2.3.2. Les facteurs Pax3 et Pax7

Pax3 et Pax7 sont des facteurs de transcription à homéo-domaines nécessaires à la spécification précoce, la migration cellulaire et la différenciation des progéniteurs musculaires embryonnaires et adultes. Au cours de la myogenèse, ces facteurs sont exprimés par les progéniteurs musculaires et leur expression s'achève dès le début de la différenciation jusqu'à être complètement réprimée dans le muscle différencié de l'embryon. Pax3 est un facteur de transcription mettant en place le « patron » pour l'initiation des fibres des membres sur lequel les cellules exprimant Pax7 viennent contribuer à la formation des fibres secondaires et établir le pool de cellules satellites (Maqbool and Jagla 2007). Pendant la période périnatale, les cellules exprimant Pax3 et Pax7 prennent une position de cellules satellites sous la membrane basale (Relaix, Rocancourt et al. 2005). Les facteurs Pax3 et Pax7 sont nécessaires pour l'expression de Myf5 et MyoD et donc à l'activation du programme myogénique « tardif » (Figure 15). En effet dans des embryons de souris Pax3/Pax7^{-/-}, le développement musculaire tardif s'interrompt, seul le muscle précoce du myotome se forme (Relaix, Rocancourt et al. 2005)

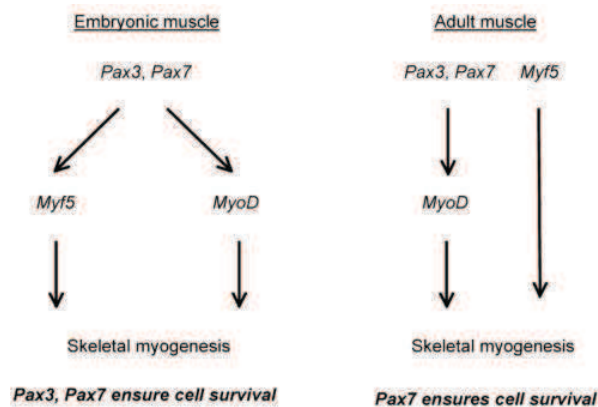


Figure 15 : Rôle de pax3 et pax7 dans la régulation des progéniteurs musculaires et du programme myogénique (Buckingham 2007)

2.2.1.2.3.3. Les facteurs Six1 et Six4

Les gènes *Six1* et *Six4* (*Sine oculis related homeobox 1,4*) sont impliqués dans la mise en place de nombreux organes lors du développement embryonnaire y compris le muscle squelettique, dans l'induction du programme musculaire des fibres rapides (Ozaki, Watanabe et al. 2001; Laclef, Hamard et al. 2003; Niro, Demignon et al. 2010). Ces facteurs peuvent se lier à l'ADN par leurs homéo-domaines et interagissent avec des co-activateurs et co-répresseurs par leurs domaines SIX. Lors de la myogenèse, ils sont exprimés dans les progéniteurs du myotome, une structure primitive musculaire. Chez l'adulte, les gènes *Six* régulent la prolifération et la différenciation des cellules satellites, par l'activation ou la répression des MRFs (Yajima, Motohashi et al. 2010). Notamment, la fixation des Six sur leurs cibles, entraîne la translocation des co-facteurs Eya1 et Eya2 qui vont réguler les gènes cibles des Six dans les cellules satellites: *Pax3*, *MyoD*, *MRF4* et *myogénine* (Grifone, Demignon et al. 2005). Pour conclure, ces facteurs de transcription sont essentiels au bon déroulement des processus myogéniques, leurs expressions spatio-temporelles étant finement régulées tout le long des grandes étapes de la myogenèse (Figure 16).

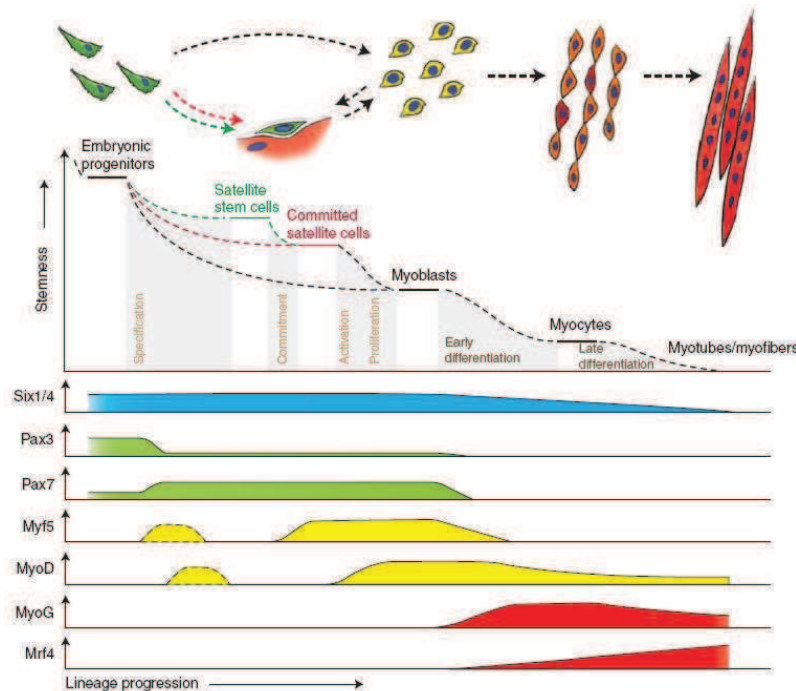


Figure 16: Organisation spatio-temporelle des MRFs

Les myoblastes dérivent soit des cellules satellites, soit directement des progéniteurs embryonnaires. Ils se différencient et fusionnent pour donner des syncytiums plurinucléés, les myotubes. L'expression des différents facteurs de transcription est représentée tout le long de la progression myogénique, selon le stade de maturation des cellules musculaires (Bentzinger, Wang et al. 2012).

Dans la DM1, l'altération de certains de ces facteurs a été observée participant à un certain nombre de phénotypes, caractéristiques de la pathologie, détaillés dans le paragraphe suivant.

2.2.1.3. Altération musculaire dans la DM1

Les observations histologiques des muscles issus de patients DM1 ont mis en évidence une prédominance des fibres de type I, une réduction de la taille des fibres et une centralisation de leurs noyaux (Grimby, Hedberg et al. 1988). Des amas sarcoplasmiques sont également caractéristiques des muscles DM1. Ces structures contiennent une accumulation de certains facteurs myogéniques comme la desmine et la myosine fœtale (Figure 17), qui serait dû, non pas à des amas de régénération/dégénération anormales, mais plutôt à une interruption de la myogenèse tardive (Vattemi, Tomelleri et al. 2005).

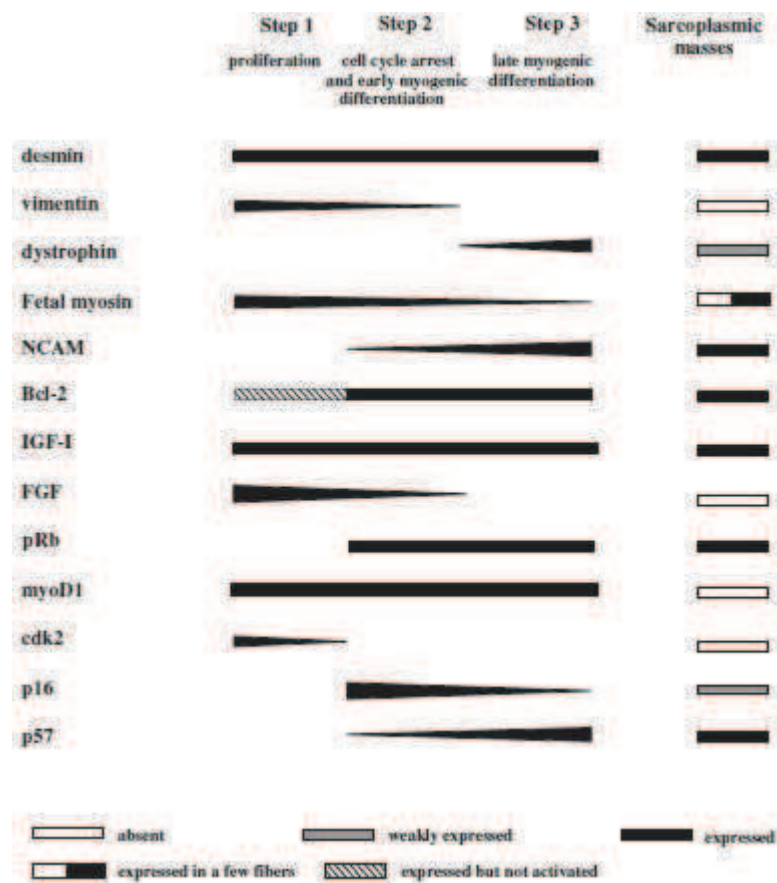


Figure 17: Comparaison de l'expression des marqueurs myogéniques dans le muscle normal en développement (step1-3) et dans les amas sarcoplasmiques DM1

(Vattemi, Tomelleri et al. 2005).

Comme décrit précédemment, la différenciation myogénique normale s’effectue en deux étapes : la sortie du cycle cellulaire puis l’expression du programme myogénique par l’activation ou la répression des MRFs. Des défauts de ces deux mécanismes ont été montrés dans le contexte musculaire DM1. Des myoblastes primaires, issus de biopsies de patients DM1 sont incapables de sortir du cycle cellulaire et donc d’initier la différenciation (Timchenko, Iakova et al. 2001). Un certain nombre de facteurs myogéniques sont dérégulés dans la DM1 comme MyoD ou MHC (*Myosin Heavy Chain*) (Tableau 9) mais leurs implications comme causes ou conséquences des altérations musculaires DM1 restent encore à déterminer.

Nom du facteur	Altération	Références
MyoD	Diminution dans les myoblastes	(Amack, Reagan et al. 2002; Beffy, Del Carratore et al. 2010)
Myogénine	Diminution dans les myotubes	(Timchenko, Iakova et al. 2001; Salisbury, Sakai et al. 2008; Beffy, Del Carratore et al. 2010; Faenza, Blalock et al. 2012)
MHC	Diminution dans les myotubes	Furling 2001 (Furling, Lemieux et al. 2001)
p21	Augmentation dans le muscle / Myoblastes	(Timchenko, Iakova et al. 2001; Beffy, Del Carratore et al. 2010)
P16	Accumulation anormale	(Bigot, Klein et al. 2009)
MEF2	Augmentation dans le muscle	(Timchenko, Iakova et al. 2001)
Desmin	Augmentation dans le muscle	(Timchenko, Iakova et al. 2001)
Cyclin D3	Pas d'augmentation dans les myotubes	(Salisbury, Sakai et al. 2008; Faenza, Blalock et al. 2012)
PLCB1	Augmentation dans les myoblastes	(Faenza, Blalock et al. 2012)
	Diminution dans les myotubes	

Tableau 9: Facteurs myogéniques altérés dans la DM1

Récemment, une étude d’imagerie électronique a mis en évidence la présence de vacuoles autophagiques dans des myoblastes de patients DM1 présentant une forme congénitale. Ces structures sont associées à une surexpression de facteurs autophagiques connus, tels que LC3 et ATG5, mais ne sont pas associées à un processus d’apoptose. Le mécanisme d’autophagie dans ces myoblastes DM1 est concomitant avec la surexpression de p53 et l’inhibition de la voie de signalisation mTor/S6K1 (Beffy, Del Carratore et al. 2010). Ce travail indique donc que des voies de signalisation importantes pour la différenciation myogénique sont altérées et suggère la contribution de ces défauts dans les atteintes dystrophiques de la DM1.

L’altération de la différenciation suggère également un défaut de régénération musculaire. Plusieurs équipes se sont donc intéressées aux cellules satellites. Bien qu’en 1983,

Sahgal *et al* ait montré une diminution du nombre de cellules satellites dans des patients DM1 (Sahgal, Bernes et al. 1983), une autre étude réalisée par l'équipe de Denis Furling montre que le nombre de progéniteurs est augmenté dans les muscles distaux alors qu'une faible régénération est observée (Furling, Coiffier et al. 2001).

Les cellules satellites ont également une capacité proliférative réduite suggérant une altération de la capacité d'auto-renouvellement (Thornell, Lindstom et al. 2009). Une étude récente montre l'implication directe des cellules satellites dans le défaut myogénique DM1. Elles secrèteraient de la prostaglandine E2 (PGE2) qui inhiberait la fusion des myoblastes en baissant la concentration de calcium intracellulaire. Cette altération peut être reversée par l'utilisation d'acide acétylsalicylique et restaurer une myogenèse normale (Beaulieu, Thebault et al. 2012).

Pour conclure, de par son accessibilité, le muscle a été jusqu'à présent le système le plus étudié dans la DM1. Les altérations histologiques ont été particulièrement décrites et montrent une atrophie des fibres de type I avec des changements de leurs tailles et de leurs architecture. Une centralisation des noyaux et des amas sarcoplasmiques sont observés ainsi qu'une réparation altérée associée à des défauts d'expression de nombreux facteurs de transcription majeurs pour le maintien de l'intégrité du tissu musculaire comme MyoD, myogénine ou encore la myosine.

2.2.2. Altérations neurales dans la DM1

Le système nerveux est altéré dans la DM1, et c'est grâce à l'imagerie en temps réelle et au développement de modèles pertinents que cette affection a pu être mieux caractérisée. Cependant, les modèles humains pour étudier les mécanismes moléculaires neuraux restent très limités puisque les biopsies de patients post-mortem sont difficiles d'accès et témoignent d'une pathologie très (parfois trop) avancée. Ainsi, la génération de modèles humains *in vitro* de cellules souches pluripotentes porteuses de mutations causales de pathologies, est une alternative pour l'étude de tissus difficilement accessibles comme le système nerveux et permettent d'analyser l'impact de la mutation sur la différenciation neurale et la survie cellulaire.

2.2.2.1. Visualisation des altérations grâce à l'imagerie médicale

Les études sur les altérations cérébrales de la DM1 sont souvent comparées avec la DM2 bien que plusieurs défauts diffèrent. Les patients DM2 développent des déficits visuo-spatiales et une altération des fonctions exécutives (comportement, adaptation à l'environnement..) similaires à la forme adulte de la DM1 (Van Spaendonck, Ter Bruggen et al. 1995; Meola, Sansone et al. 1999; Meola, Sansone et al. 2003; Modoni, Silvestri et al. 2004; Gaul, Schmidt et al. 2006), suggérant une fois de plus un mécanisme commun entre les deux pathologies.

Les études cérébrales des patients DM1 et DM2 ont été réalisées principalement par des techniques d'imagerie médicale par résonance magnétique (IRM). Globalement, une atrophie corticale est présente ainsi qu'une dilatation ventriculaire (Huber, Kissel et al. 1989; Chang, Anderson et al. 1993; Abe, Fujimura et al. 1994; Hashimoto, Tayama et al. 1995; Kassubek, Juengling et al. 2003; Wozniak, Mueller et al. 2011). Le volume de la substance grise, composée des corps cellulaires des neurones, des réseaux dendritiques et de certaines cellules gliales, est réduit dans les aires corticales, l'hippocampe, le thalamus et le putamen. L'intégrité de la substance blanche, composée principalement des axones myélinisés, est altérée dans le lobe cortical, le tronc cérébral et le corps calleux (Hund, Jansen et al. 1997; Ogata, Terae et al. 1998; Di Costanzo, Di Salle et al. 2002; Naka, Imon et al. 2002; Kassubek, Juengling et al. 2003; Antonini, Mainero et al. 2004; Kornblum, Reul et al. 2004; Giorgio, Dotti et al. 2006; Ota, Sato et al. 2006; Romeo, Pegoraro et al. 2010; Weber, Roebing et al. 2010; Minnerop, Weber et al. 2011; Franc, Muetzel et al. 2012). Une gliose et une perte neuronale ont été décrites, associées à l'hypersomnolence retrouvée chez les patients (Ono, Kanda et al. 1995; Mizukami, Sasaki et al. 1999; Ono, Takahashi et al. 2001). Il a été montré également une altération de l'excitabilité corticale (Bae, Kim et al. 2011) ainsi qu'un défaut de connexion des aires corticales via l'étude des faisceaux de matière blanche (Fukuda, Horiguchi et al. 2005; Ota, Sato et al. 2006; Minnerop, Weber et al. 2011). De même, une altération des nerfs périphériques a été observée. Ces observations sont très intéressantes mais rendent l'étude des mécanismes moléculaires impossible.

Notre équipe a récemment découvert une nouvelle altération neurale dans la DM1, étude à laquelle j'ai participé, et ceci grâce à l'utilisation des cellules souches embryonnaires humaines (hESC) qui portent des répétitions CTG anormales (Marteyn, Maury et al. 2011). Après avoir différencié les hESC en motoneurones, une hyper-arborisation neuritique a été

mise en évidence dans les cellules DM1 (Figure 18) et a été corrélée à un défaut d'expression de deux membres de la famille des protéines SLITRKs (SLITRK2 et SLITRK4). Les SLITRKs ont été montrés pour être impliqués dans la pousse neuritique, la neuritogenèse et la synaptogenèse (Aruga and Mikoshiba 2003; Aruga, Yokota et al. 2003). Le défaut d'épissage alternatif du NMDA a également été retrouvé ainsi qu'un défaut dans la mise en place des jonctions neuromusculaires (Marteyn, Maury et al. 2011).

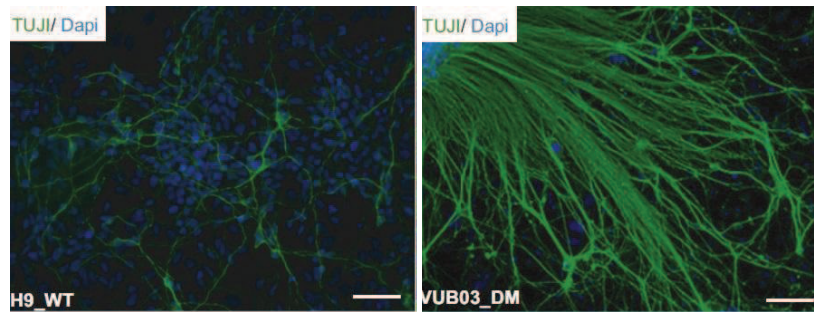


Figure 18: Hyper-arborisation neuritique dans des motoneurones DM1 issue d'hESC

L'hyper-arborisation est visible grâce au marqueur neuronal TuJ1 (vert) dans des cellules contrôles (H9 WT) et DM1 (VUB03_DM) (Marteyn, Maury et al. 2011)

2.2.2.2. Les modèles DM1 pour comprendre les altérations neurales

La complexité de l'étude du système nerveux passe par le choix du modèle utilisé. Les biopsies post-mortem de patients permettent de comprendre certains mécanismes mais représentent un stade avancé de la pathologie. Plusieurs modèles cellulaires ont été développés pour avancer dans la compréhension des affections neuronales de DM1, notamment les cellules PC12 issues de phéochromocytome de rat, (tumeur de la glande médullosurrénale), modèle standard pour les études de différenciation neuronale. Ces cellules ont l'avantage d'être facilement modifiable génétiquement et peuvent être différenciées rapidement (six jours) par l'ajout de NGF (*Neural growth Factor*).

L'introduction de 90 répétitions CTG dans ces PC12 aboutit à un défaut de différenciation neuronale et plus précisément une pousse neuritique altérée (Figure 19). En effet, le marqueur tardif MAP2 est dramatiquement réduit confirmant la diminution de la différenciation neuronale (Quintero-Mora, Depardon et al. 2002).

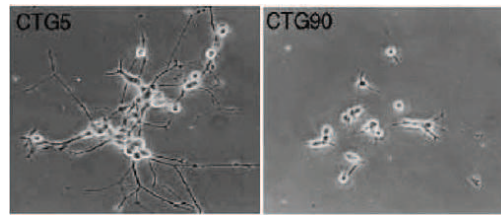


Figure 19: Conséquences de l'insertion de répétitions CTG dans des PC12 différenciés

Photo en contraste de phase de PC12 transfectées avec un plasmide contenant 5 CTG ou 90 CTG (Quintero-Mora, Depardon et al. 2002)

La stabilisation des microtubules et donc par conséquent la pousse neuritique implique les protéines Tau (Kaech 1996). Le défaut de MAP2 pourrait donc être la conséquence de l'épissage anormal de Tau ou de l'hyper-phosphorylation de sa protéine (Hernandez-Hernandez, Bermudez-de-Leon et al. 2006; Velazquez-Bernardino, Garcia-Sierra et al. 2012). En effet, on désigne la DM1 et la DM2 comme des tauopathies puisqu'elles présentent une dégénération neurofibrillaire avec l'accumulation intra-neuronale de protéines Tau (Sergeant, Sablonniere et al. 2001; Maurage, Udd et al. 2005; Itoh, Mitani et al. 2010). Comme décrit précédemment, plusieurs épissages de Tau (exon 2, 3, 6 et 10) sont modifiés dans la DM1 et modulés par des protéines à de liaisons à l'ARNm (Sergeant, Sablonniere et al. 2001; Jiang, Mankodi et al. 2004; Leroy, Dhaenens et al. 2006; Dhaenens, Schraen-Maschke et al. 2008; Dhaenens, Tran et al. 2011; Wang, Wang et al. 2011). D'autres altérations d'épissage notamment pour le récepteur NMDA et l'APP peuvent contribuer aux défauts cognitifs des patients (Jiang, Mankodi et al. 2004; Marteyn, Maury et al. 2011).

Une altération de la jonction neuromusculaire est supposée puisque des inclusions ribonucléoprotéiques sont présentes en post-synaptique (muscle) et en pre-synaptique (motoneurones) dans des patients DM1 ainsi que dans les modèles de souris HSA^{LR} (Wheeler, Krym et al. 2007).

Bien que les mécanismes à l'origine des défauts du système nerveux central soient encore aux prémices de la découverte, de nombreuses altérations ont été décrites. Une perte neuronale, une gliose et une astrogliose ont été mis en évidence ainsi que des défauts de migrations neuronales et d'arborisation neuritique. Bien que cela ne soit pas encore clairement défini, ces altérations neuronales pourraient contribuer aux défauts cognitifs des patients DM1.

2.3. Axes thérapeutiques de la DM1

A ce jour, aucun traitement ne permet de traiter l'ensemble des symptômes de la DM1. Seuls des traitements symptomatiques peuvent être proposés aux patients, améliorant leurs qualités de vie. De part les progrès techniques de ces dernières années, plusieurs axes thérapeutiques sont envisagés pour traiter les symptômes.

Plusieurs axes thérapeutiques ont émergés, visant 1) les répétitions CTG, 2) les répétitions CUG, 3) la liaison transcrits mutants/protéines, 4) l'export cytoplasmique transcrits mutés, 5) la restauration de l'expression des protéines de liaisons à l'ARNm, 6) la restauration de l'épissage alternatif et 7) les symptômes (Figure 20).

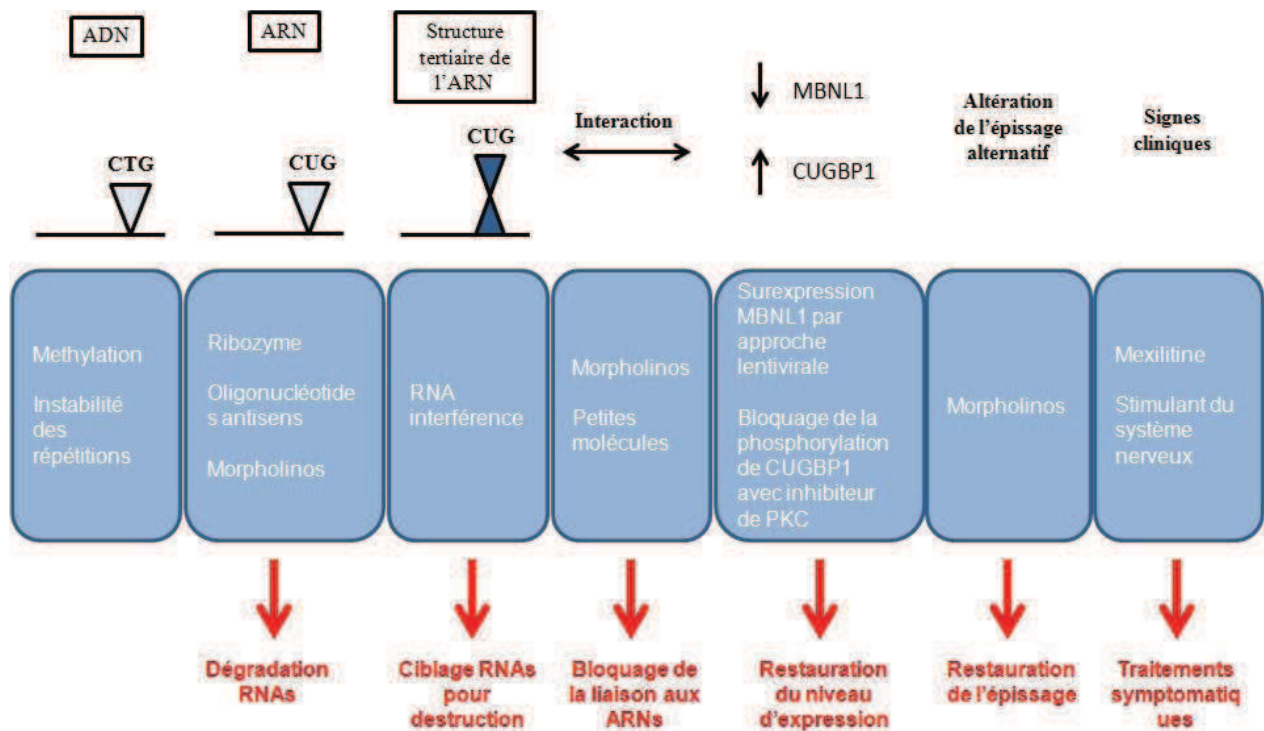


Figure 20 : Les différentes stratégies thérapeutiques actuelles de la DM1

(Modifié de Foff et Mahadevan 2011)

2.3.1. Cibler les expansions CTG de l'ADN *DMPK* et leurs instabilités

Cette stratégie, bien qu'étant à ce jour hypothétique, repose sur la limitation de l'expansion des répétitions CTG. Comme décrit précédemment, les répétitions CTG sont très instables dans les cellules germinales et somatiques et ont une tendance à l'expansion. Cette stratégie propose de cibler l'état de méthylation, les mécanismes de réparation, de mésappariements de l'ADN, ainsi que la machinerie de régulation transcriptionnelle afin de

limiter l'expansion des CTG (Nakatani, Hagihara et al. 2005; Gomes-Pereira and Monckton 2006; Lopez Castel, Cleary et al. 2010).

2.3.2. Cibler les expansions CUG des ARNs DMPK mutants

Cette stratégie repose sur la coupure spécifique des répétitions CUG par les propriétés enzymatiques de petites molécules natives ou synthétisées. Cette méthode est actuellement la plus prisée par la communauté scientifique puisqu'elle est suffisamment précoce pour palier les conséquences pathologiques en *trans* dues au gain de fonction toxique des ARNs mutants. Deux principaux outils sont pour le moment en cours d'études : les ribozymes et les oligonucléotides anti-sens (OAN) (Foff and Mahadevan 2011). Les ribozymes ne seront pas détaillés dans cette partie, puisque les OANs semblent les seuls à avoir un réel avenir thérapeutique. Les OAN sont des petites séquences d'acides nucléiques pouvant se lier, par complémentarité de bases, à une cible ARN et entraîner sa baisse d'expression et/ou sa dégradation. Deux principales structures sont utilisées pour les stratégies thérapeutiques de la DM1, puisqu'elles permettent un retour à la stabilité des transcrits cibles. Le premier est le MOE (*2'O-methyl-modified OAN*) et le deuxième est le PMO ou morpholino (*phosphorodiamidate morpholino antisense molecules*). Le morpholino diffère des autres stratégies anti-sens par le fait qu'il n'entraîne pas de dégradation de la cible mais plutôt un encombrement stérique. Ils sont également plus stables et plus spécifiques que les autres OAN (Moulton and Moulton 2010).

Plusieurs études ont fait la preuve de concept de ces approches pour le traitement d'altérations en *trans* de la mutation comme les *foci*, les défauts d'épissages ou encore la fonctionnalité de certains types cellulaires (Tableau 10). Ces stratégies sont d'autant plus intéressantes qu'elles sont applicables à d'autres pathologies à répétitions.

Outils	Modèle	Résultats	Références
ARN anti-sens de 149pb complémentaire de (CUG) ¹³ et de la région de 110pb adjacente	Rétrovirus dans des myoblastes de patients	Diminution de 80 et 50% des ARNm <i>DMPK</i> mutés et non mutés Restauration de la fusion des myoblastes et de la capture du glucose Restauration de la quantité de CUGBP1	(Furling, Doucet et al. 2003)
Ribozyme "hammerhead"	Myoblastes de patients	Diminution de 63 et 50% des ARNm <i>DMPK</i> mutés et non mutés Diminution du nombre de <i>foci</i> Amélioration de l'épissage de l'IR	(Langlois, Lee et al. 2003)
ShARN ciblant la DMPK	Lentivirus dans des myoblastes de patients avec de larges répétitions (3200 CTG)	Diminution de 50 et 70% des ARNm <i>DMPK</i> mutés et non mutés	(Langlois, Boniface et al. 2005)Langlois, Boniface et al. 2005)
SiRNA (CAG) ⁷	Fibroblastes de patients	Forte réduction des ARNm mutés et peu d'effet sur les ARNm non mutés	(Krol, Fiszler et al. 2007)
SiRNA (CUG) ⁿ	Injection intramusculaire dans la souris HSA ^{-LR}	Diminution de 70-80% des ARNm <i>DMPK</i> mutés et peu d'effet sur les ARNm non mutés Diminution des <i>foci</i> et relocalisation de MBNL1 Restauration de l'épissage de l'IR, CIC1, cTNT Amélioration de la myotonie	(Lee, Childs-Disney et al. 2009)
OANs	Screening dans myoblastes et myotubes de souris (500CTG) et patients DM1	Identification d'un MOE capable d'éteindre les ARNm <i>DMPK</i> mutés (90% <i>in vitro</i> et 30-80% <i>in vivo</i>)	(Mulders, van den Broek et al. 2009)
	Validation dans modèles DM300 (Gourdon) et HSA ^{-LR} (Cooper)	Diminution des <i>foci</i> Restauration de l'épissage de Mbnl1, Ttn, Clcn1, TnnT3 et de Serca1	
Anti-sens au sein d'un gène sU7-snrRNA	Lentivirus dans des myoblastes de patients	Diminution de 70-80% des ARNm <i>DMPK</i> mutés Diminution des <i>foci</i> et relocalisation de MBNL1 Restauration de l'épissage de BIN1 et LDB3 Restauration de la différenciation myogénique	(Francois, Klein et al. 2011)
OANs	Transfection dans des COSM6	Diminution des ARNm mutés spécifiquement Diminution des <i>foci</i>	(Lee, Bennett et al. 2012)
	Injection IM puis électroporation dans des souris HSA-LR	Diminution des ARNm mutés Diminution des <i>foci</i> Altération histologiques après injection de l'OANs Faible restauration de Serca1, Clcn1, Cypher	
Peptide (ABP1)	Modèle Drosophile DM1 par voie orale et dans les souris HSA ^{-LR} en IM	Réduction des <i>foci</i> et épissage Serca1, Clcn1, Cypher Réduction de la létalité, de la dégénérescence musculaire	(Garcia-Lopez, Llamusi et al. 2011)
Morpholinos CAG ²⁵	Injection intramusculaire et électroporation dans les souris HSA ^{-LR}	Réduction des <i>foci</i> et relocalisation de MBNL1 Restauration de l'épissage de Clcn1, Serca1, Ttn et Zasp et persistance de l'effet après 14 jours Restauration de la myotonie	(Wheeler, Sobczak et al. 2009)

Tableau 10 : Stratégies anti-sens utilisées pour la dégradation de l'ARNm mutés

Modifié de (Laustriat 2010)

2.3.3. Cibler la liaison protéine/ARN

Le caractère multisystémique de la pathologie est majoritairement expliqué par l'altération de la fonction des protéines de liaison à l'ARN. Dans le cas de MBNL1, empêcher sa liaison aux ARNs DMPK mutants permettrait une localisation et une fonction normales de ces protéines. Cette stratégie vise à identifier des molécules qui vont avoir une meilleure affinité que les protéines séquestrées dans les répétitions et qui vont donc les libérer (Tableau 11).

Outils	Modèle	Résultats	Références	
Petites molécules (Pentamidine/Bis-Benzimidazol)	Hela et souris HSA ^{LR}	Identification de la Pentamidine et la Neomycine B diminuant la liaison MBNL1 avec les CUG <i>in vitro</i>	(Warf, Nakamori et al. 2009)	
		Pentamidine <i>in vitro</i>		Amélioration des épissages de l'IR, cTNT Diminution des <i>foci</i> et relocalisation de MBNL1
		Pentamidine <i>in vivo</i>		Restauration des épissages de Cln1 et Serca1 Toxicité limitante
		Bis-Benzimidazol		Diminution des <i>foci</i> et relocalisation de MBNL1 Restauration des épissages
Petites molécules (Ligand 1)	/	Mise au point rationnelle d'un « ligand 1 » pour sa capacité à se fixer aux CUG	(Arambula, Ramisetty et al. 2009)	
		Ce « ligand 1 » est capable de déstabiliser les complexes MBNL1/CUG		
Petites molécules	/	Criblage de 11325 composés résultant de la synthèse combinatoire pour leurs capacités à se fixer spécifiquement aux CUG	(Gareiss, Sobczak et al. 2008)	
		Identification de composés qui interfèrent avec la liaison MBNL1/CUG		
Petites molécules	/	Design de ligands pour leurs capacités à se fixer spécifiquement aux CUG	(Lee, Pushechnikov et al. 2009; Pushechnikov, Lee et al. 2009)	
		Identification de composés qui interfèrent avec la liaison MBNL1/CUG		

Tableau 11: Stratégies anti-sens utilisées pour modifier la fixation de protéines aux répétitions CUG

Le travail le plus accompli sur cette stratégie est une étude réalisée en 2009 par l'équipe d'Andrew Berglund. La recherche de molécules ayant une grande d'affinité pour les structures tertiaires a été effectuée par un criblage de banques de molécules *in silico*, qui a permis de mettre en évidence la Pentamidine. Cette molécule a ensuite été validée *in vitro* sur ses capacités à reverser les défauts connus de la DM1. Bien qu'*in vivo*, la restauration soit aussi vérifiée, la forte toxicité de ce composé ne permet pas d'optimiser les doses administrées. Les auteurs proposent de modifier la structure de la Pentamidine pour amoindrir l'effet toxique de la molécule tout en gardant sa fonction (Warf, Nakamori et al. 2009).

Une étude HTS a été réalisée pour trouver des molécules capables de prévenir ou de perturber la liaison de MBNL1 avec les transcrits mutants. Ce criblage utilisait un modèle de

MBNL1 couplé à un tag histidine et une séquence ARN contenant 12 CUG biotinylée. L'interaction entre les deux a été visualisée et quantifiée à l'aide de deux systèmes de détection : le premier est basé sur la détection de transfert d'énergie selon la proximité des molécules (HTRF) et le deuxième utilise la détection de la liaison de MBNL/ARN_{12CAG} avec un anticorps anti-His et des agents couplés à la Streptavidin (Technologie Alphascreen). Une banque de 1280 molécules pharmaco-actives (LOPAC, Sigma Aldrich) a été testée. Deux agents, le NF449 and la Nor-Binaltorphimine Dihydrochloride sont capables de diminuer la liaison MBNL/ARN_{12CAG}, même si leur mode d'action n'est pas encore connu (Chen, Sobczak et al. 2012). De plus, cette étude n'évalue pas l'effet de ces composés dans un modèle cellulaire ou animal de DM1.

2.3.4. Favoriser l'export cytoplasmique des ARNm mutés

Cette stratégie repose sur la restauration de l'export des transcrits *DMPK* mutants afin de rendre leurs fonctions à la cellule. Elle a été proposée à l'issue d'une étude montrant que l'insertion d'une séquence WRPE (*Woodchuck post-transcriptional Regulatory Element*) dans un transcrit artificiel comprenant 200 répétitions CUG favorisait l'export cytoplasmique des transcrits mutés (Mastroiannopoulos, Feldman et al. 2005). Cette relocalisation permet d'améliorer la différenciation myogénique dans un modèle cellulaire de myoblastes primaires issus de patients DM1. A l'heure actuelle, aucune molécule n'a été identifiée pour changer ou favoriser cet export cytoplasmique, mais leur application pourrait présenter l'avantage de restaurer le niveau d'expression de *DMPK*.

2.3.5. Restauration du niveau d'expression fonctionnel des protéines de liaison à l'ARN

Comme décrit précédemment, l'altération fonctionnelle des protéines de liaisons à l'ARN est considérée comme une cause majeure de la DM1. Les deux protéines les plus étudiées sont MBNL1 et CUGBP1, séquestrée dans le noyau et augmentée respectivement. La restauration idéale serait donc d'augmenter MBNL1 et de baisser la quantité de CUGBP1 dans le contexte DM1.

2.3.5.1. Surexpression de MBNL1

La compensation de MBNL1 dans les tissus atteints a été testée, notamment dans le modèle de souris HSA^{LR}, dans lequel l'introduction exogène de MBNL1, par un AAV, restaure une localisation normale de la protéine. Cette surexpression (presque doublée) est également suffisante pour restaurer à la fois des désordres moléculaires, tels que certains épissages (décrits dans le tableau 6), et des désordres fonctionnels tels que la myotonie (Kanadia, Shin et al. 2006).

2.3.5.2. Réduction de l'activité de CUGBP1

La relation directe entre l'activité anormalement élevée de la PKC et l'état d'hyperphosphorylation de CUGBP1 a permis d'envisager une piste thérapeutique pour reverser cet altération. Celle-ci est basée sur l'utilisation d'inhibiteur de la PKC (la molécule Ro-31-8220). Dans le modèle murin DM1 spécifiquement cardiaque de Cooper, l'injection de la molécule permet de diminuer l'expression de CUGBP1 et d'améliorer la conduction cardiaque, le défaut de contraction et les défauts d'épissages associés (Wang, Kuyumcu-Martinez et al. 2009).

2.3.6. Restauration d'épissages alternatifs spécifiques

Cette stratégie propose de restaurer l'épissage alternatif adéquat de certains transcrits, en modifiant leurs séquences nucléotidiques pour présenter au système d'épissage et à la machinerie traductionnelle une version améliorée dans laquelle l'altération est retirée. Plusieurs voies sont possibles pour développer cette stratégie. Tout d'abord, les OAN peuvent être utilisés pour retirer un exon aberrant, technique appelée le saut d'exon (*exon skipping*). Cette stratégie peut également utiliser la technologie de criblage à haut débit (HTS) pour découvrir des molécules capables de favoriser l'inclusion ou l'exclusion d'exons.

Cette méthode thérapeutique est bien loin de la source de la pathologie mais n'en reste pas moins intéressante. En effet elle pourrait être appliquée dans le cas de patients avec une forme peu avancé (une forme adulte par exemple).

-Le saut d'exon

La meilleure preuve de concept pour le saut d'exon est probablement l'exemple de la myopathie de Duchenne (DMD) pour laquelle une phase clinique est actuellement en cours. Cette pathologie est due à une mutation du gène *DMD* codant une protéine appelée dystrophine, qui engendre selon les formes pathologiques une protéine peu ou non fonctionnelle. L'utilisation d'un OAN en phase II, ciblant l'exon 51 (porteur de la mutation), permet d'empêcher l'inclusion de cet exon aberrant et ainsi de restaurer une dystrophine fonctionnelle (Lu, Rabinowitz et al. 2005; Yokota, Lu et al. 2009; Cirak, Arechavala-Gomez et al. 2011).

Dans le cadre de la DM1, cette stratégie de saut d'exon a été utilisée pour restaurer l'anomalie d'épissage du canal chlore dans le modèle murin HSA^{LR}. Comme décrit précédemment, la DM1 se caractérise par une augmentation de l'inclusion de l'exon7 du *CLC1* corrélée au symptôme fonctionnel de la myotonie. L'insertion d'un morpholino visant le site d'épissage 3' de l'exon 7, permet la restauration de l'épissage normal ainsi que la myotonie (Wheeler, Lueck et al. 2007).

-Favoriser l'inclusion ou l'exclusion d'exons par des molécules

Dans le cadre de la DM1, un criblage HTS a été effectué pour rechercher des molécules capables de restaurer le défaut musculaire et plus particulièrement la différenciation des myoblastes en myotubes. Pour cela, des lignées immortalisées de myoblastes de patients DM1 à partir de fibroblastes exprimant constitutivement hTERT et MyoD ont été générés. Ce modèle reproduit les *foci* co-localisés avec MBNL1, l'altération des épissages alternatifs de *Serca1*, de la *TnnT3* et de l'*IR* ainsi que les défauts de différenciation connus. Un minigène du canal chlore sous le contrôle de la luciférase a été transfecté dans ce modèle suivi d'un criblage de 13000 composés, afin de reverser le défaut d'inclusion. Sur ces 13000 composés, une seule molécule a été validée, la Triciribine (inhibiteur de la voie de signalisation AKT), capable de restaurer partiellement le défaut d'épissage du canal chlore dans les cellules DM1 (O'Leary, Vargas et al. 2010).

2.3.7. Symptomatologie

Cette dernière partie présente les différents traitements, majoritairement pharmacologiques, proposés aux patients pour traiter individuellement chaque symptôme et améliorer ainsi leur qualité de vie.

Les molécules utilisées pour réduire la myotonie comprennent des bloquants des canaux sodium (Procaïnamide, Phénytoïne, Mexilétine), des antidépresseurs tricycliques (Clomipramine, Imipramine), des Benzodiazépines, des antagonistes du calcium, la Taurine et la Prednisone. La Mexilétine est un anti-arythmique, qui permet de moduler les canaux sodiques et de diminuer la myotonie (Logigian, Martens et al. 2010). D'autres molécules tel que la taurine, quelques antidépresseurs tricycliques comme la Clomipramine et l'Imipramine permettent de lutter contre les faiblesses musculaires (Trip, Drost et al. 2006).

Des molécules agissant sur l'atrophie et la faiblesse musculaire, comme l'IGF, ont également été testées. L'injection d'IGF recombinante humaine (rhIGF) chez des patients DM1 semblait améliorer la force et certaines fonctions musculaires (Vlachopapadopoulou, Zachwieja et al. 1995). Cependant, le traitement restait lourd (deux injections par jour) pour le faible bénéfice musculaire. Ceci était dû à la faible demi-vie de l'rhIGF. Pour palier à cela, une autre protéine recombinante de l'IGF, plus stable et plus facile à délivrer a été synthétisée : l'IPLEX. Malheureusement, l'essai de phase II de cet agent n'a pas montré d'augmentation de la fonction musculaire ou de l'endurance des patients traités (Heatwole, Eichinger et al. 2011).

L'utilisation d'autres molécules pouvant avoir un effet bénéfique sur les capacités musculaires des patients DM1 a été abandonnée puisqu'elles n'amélioraient pas la force musculaire ou étaient trop toxiques. Il s'agit de la DHEA (déhydroépiandrostérone), de la testostérone (NCT00167609, <http://www.clinicaltrials.gov>), de la créatine ou encore des inhibiteurs de la myostatine (Griggs, Jozefowicz et al. 1990; Tarnopolsky, Mahoney et al. 2004; Penisson-Besnier, Devillers et al. 2008; Wagner, Fleckenstein et al. 2008). Pour améliorer les troubles du sommeil et de la vigilance, le Modafinil® (psychostimulant) a été proposé comme traitement pour les patients DM1, mais son efficacité n'a pas été clairement démontré (Orlikowski, Chevret et al. 2009; Hilton-Jones, Bowler et al. 2012).

Finalement, un certain nombre de médicaments, plus ou moins efficace, sont proposés aux patients DM1 n'ayant pour but que d'améliorer leurs qualités de vie. La lourdeur des traitements thérapeutiques pour un patient avec de nombreux symptômes nécessitent de développer de nouvelles technologies pour : 1) à court terme, comprendre les mécanismes pathologiques et 2) à long terme, développer des alternatives thérapeutiques plus intéressantes et plus efficaces.

3. Utilisation des cellules souches embryonnaires humaines pour la modélisation pathologique de la DM1

Depuis quelques années, les cellules souches pluripotentes humaines offrent la possibilité de développer de nouveaux modèles cellulaires humains pathologiques. Il existe deux types de cellules souches pluripotentes : les cellules souches embryonnaires humaines (hESC) et les cellules souches humaines induites à la pluripotence (hiPSC). Mon travail de thèse ayant porté principalement sur les hESC porteuses de la mutation causale de la DM1, ce type cellulaire sera majoritairement détaillé dans ce chapitre.

Les cellules souches embryonnaires humaines sont des cellules progénitrices présentes dans l'embryon au stade blastocyste qui peuvent être dérivés lors de fécondation *in vitro*. Elles sont caractérisées par deux propriétés majeures. Tout d'abord, elles sont capables de s'auto-renouveler potentiellement à l'infini de manière physiologique contrairement aux cellules cancéreuses. Ensuite, elles ont une capacité de pluripotence c'est-à-dire qu'elles peuvent se différencier, pour peu que l'on connaisse le protocole, en tous les lignages cellulaires, y compris germinales et annexes embryonnaires (Hyslop, Stojkovic et al. 2005; Bernardo, Faial et al. 2011).

3.1. Origine des hESC

Les hESC sont isolées chez l'embryon humain au stade blastocyste entre le 5^{ème} et 7^{ème} jour du développement. Le blastocyste est composé d'une zone pellucide, des cellules progénitrices du trophoctoderme à l'origine de structures extra-embryonnaires (placenta, cordon ombilical), du blastocœle et de la masse cellulaire interne (MCI) (Figure 21). Les cellules du trophoctoderme se développent en cellules géantes trophoblastiques et en la partie embryonnaire du placenta. Les cellules de la MCI en revanche contiennent des progéniteurs pluripotents à l'origine de la lignée germinale, des cellules somatiques de l'embryon en développement et certaines structures extra-embryonnaires. La MCI n'est pas une structure homogène mais est composée de l'épiblaste contenant les cellules pluripotentes et de l'hypoblaste qui est à l'origine du sac vitellin et de l'endoderme pariétal. Ces deux structures sont distinguées par leurs localisations : l'hypoblaste se présente comme une couche de cellules à la surface de la MCI tandis que l'épiblaste est positionné plus profondément. Les cellules de l'épiblaste sont à l'origine du futur individu et également de structures extra-

embryonnaires comme l'allantoïde et l'amnios (Suwinska and Ciemerych 2011). Les cellules souches embryonnaires humaines représentent les cellules pluripotentes de l'épiblastes (Shamblott, Axelman et al. 1998; Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998)

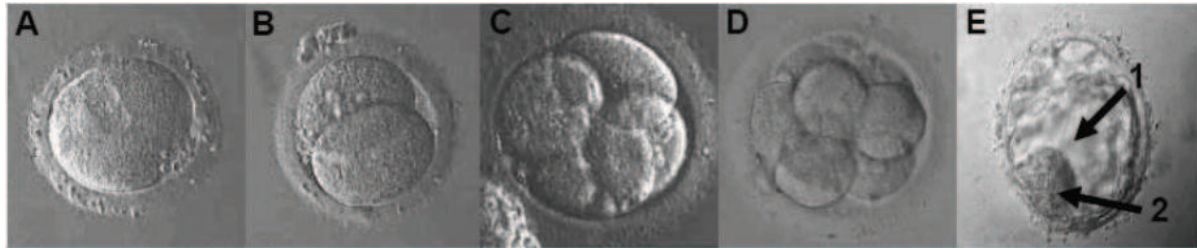


Figure 21 : Le développement précoce de l'embryon humain

(A) Zygote après fécondation. (B) Première mitose de segmentation, l'embryon est au stade de 2 cellules. (C) Deuxième mitose de segmentation conduisant à la formation du stade 4 cellules. (D) Embryon au stade Morula. Au 3ème jour, les limites cellulaires sont parfaitement visibles et les blastomères peuvent être séparés mécaniquement les uns des autres. (E) Blastocyste (4ème jour) présentant une cavité centrale, le blastocèle (1) et à un de ses pôles, la masse cellulaire interne (2).

3.1.1. Dérivation et culture des hESC.

La première dérivation de cellules souches embryonnaires a été effectuée chez la souris par deux équipes indépendantes dans les années 1980 (Martin 1981; Robertson, Evans et al. 1983). Il a fallu attendre les années 1995 et 1998 pour que la technique soit appliquée aux primates non-humains et à l'Homme (Thomson, Kalishman et al. 1995; Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998).

Les hESC sont isolés de la MCI de deux manières selon la qualité du blastocyste La première technique consiste à mettre en culture l'embryon entier après l'élimination de la zone pellucide sous l'action enzymatique de la pronase, suivi d'une immunochirurgie qui implique une lyse trophoctodermique par réaction anticorps-complément (Heins, Englund et al. 2004; Hwang, Roh et al. 2005; Kim, Oh et al. 2005; Oh, Kim et al. 2005). Ensuite, après une légère agitation, le trophoctoderme se retrouve complètement séparé de la MCI. Cette technique comporte toutefois un risque de contamination par des cellules du trophoblaste qui prolifèrent plus rapidement que les cellules de la MCI. Une autre technique permet de palier à ce problème puisque l'isolation de la MCI s'effectue de manière précise à l'aide d'une pipette en verre ultrafine (Amit and Itskovitz-Eldor 2002; Baharvand, Ashtiani et al. 2004; Kim, Oh et al. 2005).

Quelque soit la technique, la MCI isolée est ensuite ensemencée sur des cellules nourricières et dont le cycle cellulaire a été inactivé. Après quelques jours de culture, des

structures adhérentes se développent et sont transférées en petits amas dans de nouvelles boîtes de cultures recouvertes également de cellules nourricières inactivés. Les colonies contenant des cellules présentant la morphologie d'ESC, c'est-à-dire des cellules ayant un rapport nucléo/cytoplasmique très élevé, deux nucléoles caractéristiques et formant une monocouche de cellules très denses au centre et plus lâches au pourtour délimitant une bordure très distincte, sont sélectionnées pour être amplifiées. Elles formeront, au terme de quelques passages, des colonies d'ESC. Les résultats publiés suggèrent que le taux de réussite de la dérivation des lignées des hESC dépend fortement de la qualité initiale des blastocystes, des conditions d'isolement de l'ICM et de l'expérience des manipulateurs (Pera, Reubinoff et al. 2000; Mitalipova, Calhoun et al. 2003).

Les hESC en culture nécessitent d'êtreensemencées sur des cellules nourricières qui vont sécréter un certain nombre de facteurs indispensable au maintien de la pluripotence (décrit dans la section 3.1.2). Ces cellules peuvent être des fibroblastes embryonnaires murins (MEF), des lignées de cellules murines (STO) ou encore des fibroblastes humains provenant de prépuce (cellule *foreskin*) (Mallon, Park et al. 2006). Le rôle exact des cellules nourricières n'est pas complètement déterminé mais il semble qu'elles participent au maintien de l'état indifférencié par la sécrétion de facteurs solubles tel que l'activin A (Eiselleova, Peterkova et al. 2008). Le cycle cellulaire de ces cellules est préalablement interrompu par traitement à la Mitomycine C ou par irradiation, ce qui nécessite de changer les hESC de support régulièrement. Le passage des hESC s'effectue de deux manières: soit par dissociation mécanique, soit dissociation enzymatique (Hoffman and Carpenter 2005). De plus, des facteurs extrinsèques doivent être ajoutés au milieu de culture pour maintenir la pluripotence des hESC. Tout d'abord, le sérum standard de culture est remplacé par du KSR (*Knock-out Serum Replacement*) pour éviter la différenciation des hESC vers certains types cellulaires. Ensuite, un facteur clé de maintien de l'état indifférencié est ajouté quotidiennement, il s'agit du FGF2 (*Fibroblasts growth factor 2*).

3.1.2. Facteurs de régulation de la balance auto-renouvellement/différenciation.

Un certains nombres de marqueurs de surface sont associés à l'état de pluripotence des hESC (Mateizel, De Temmerman et al. 2006). A l'état indifférencié, les cellules expriment SSEA3 (*Stage Specific Embryonic Antigen 3*), SSEA4, TRA-1-60 (*Tumour Rejection Antigen*), TRA-1-81, TRA-2-49, TRA-2-54 et GCTM-2 (*germ cell tumour marker*). Des

marqueurs intracellulaires peuvent spécifier les hESC notamment des composants intracellulaires témoins de l'activité télomérasique comme TRF-1 (*telomeric repeat binding factor*) et TRF-2, des facteurs de transcription tels que Rex1 (*RNA exonuclease 1*) et Foxd3 (*forkhead box D3*) ou encore des facteurs de croissance comme le FGF4 (*fibroblast growth factor*).

Cependant, le cœur du réseau qui contrôle la maintenance de la pluripotence des ESC est relié aux facteurs de transcription OCT4 (*Pou-domain class 5, transcription factor 1*), NANOG (*Nanog homeobox*) et SOX2 (*Sex determining region Y box containing gene 2*) (Nichols, Zevnik et al. 1998; Avilion, Nicolis et al. 2003; Chambers, Colby et al. 2003; Mitsui, Tokuzawa et al. 2003). Ces facteurs sont capables de réguler leurs propres expressions, formant une boucle de régulation « interne » (Boyer, Lee et al. 2005; Babaie, Herwig et al. 2007).

Plusieurs voies de signalisation sont responsables de la balance auto-renouvellement/différenciation et passe par l'activation ou la répression des gènes de pluripotence (Figure 22).

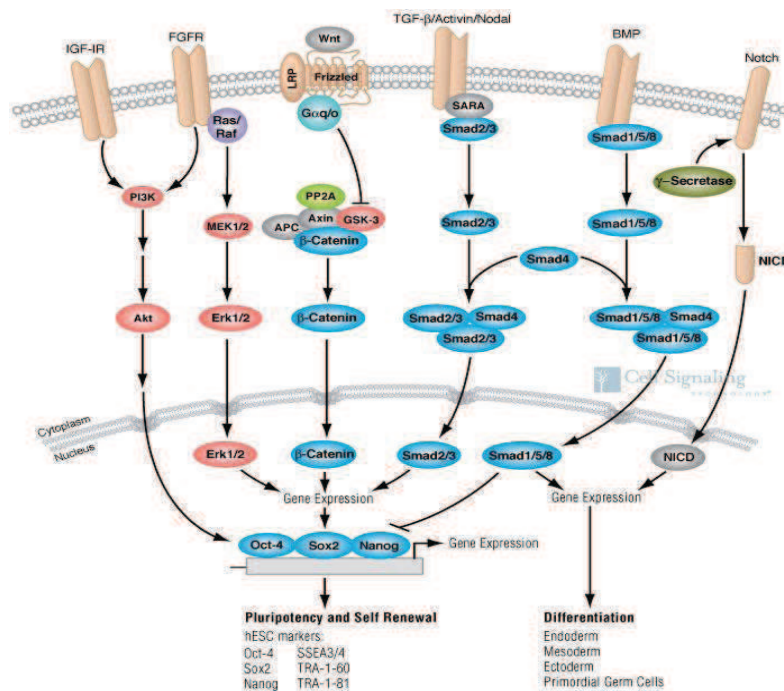


Figure 22 : Les voies de différenciation et de pluripotence des ESC

http://www.cellsignal.com/reference/pathway/images/ESC_pluripotency.jpg

Dans tous les milieux de culture hESC, du FGF2 est rajouté pour augmenter la prolifération, l'attachement et la survie cellulaire. Le FGF2 exogène active la voie des

MAPK/ERK et PI3K/AKT qui stimule l'expression de *NANOG* et inhibe spontanément la différenciation (Dvorak and Hampl 2005; Armstrong, Hughes et al. 2006; Greber, Lehrach et al. 2007; Eiselleova, Matulka et al. 2009; Wang, Chen et al. 2009). De plus le FGF2 stimulerait la production d'Activin A par les MEFs qui semble contribuer au maintien des hESC au stade indifférencié (Greber, Lehrach et al. 2007). Les hESC sont aussi capables de répondre à l'activation WNT/ β -caténine. Cependant la fonction précise de cette voie reste controversée, certaines équipes de recherche soutenant (Sato, Meijer et al. 2004) ou réfutant son implication dans la maintenance de l'auto-renouvellement (Dravid, Ye et al. 2005; Sumi, Tsuneyoshi et al. 2008). La voie Activine/Nodale induit les facteurs SMAD2/3 qui vont se lier et activer le promoteur de *NANOG*, essentiel pour l'auto-renouvellement (Xu, Sampsell-Barron et al. 2008; Vallier, Touboul et al. 2009). Un récent article a démontré que la voie PI3K/AKT maintient l'auto-renouvellement par la suppression des voies RAF/MEK/ERK et WNT (Singh, Reynolds et al. 2012). Quand la voie PI3K/AKT est active, l'ActivinA/SMAD2/3 a une fonction pro auto-renouvellement en activant les gènes cibles comme *NANOG*. Quand la voie PI3K/AKT est faible, les effecteurs de WNT sont activés et agissent en synergie avec les SMAD2/3 pour promouvoir la différenciation vers le lignage mésenchymal. Le « *switch* » dans l'activité des SMAD2/3 après l'inactivation de la voie PI3K/AKT requiert l'activation de WNT via les ERK qui cible GSK3 (Figure 23).

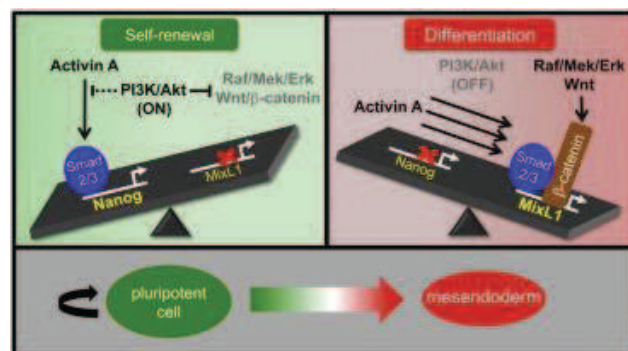


Figure 23: Modèle du réseau de signalisation de l'auto-renouvellement et de la différenciation des hESC

(Singh, Reynolds et al. 2012)

A l'inverse des SMAD2/3, la voie des BMP qui active les SMAD1/5/8, réprime l'expression de *NANOG* et promeut la différenciation (Suwinska and Ciemerych 2011)

3.2. Cadre législatif français encadrant la recherche sur les cellules souches humaines pluripotentes

Depuis la première isolation des hESC en 1998, la considération de l'embryon humain comme matériel de laboratoire est éthiquement controversée.

En France, la question du statut juridique de l'embryon humain a régulièrement été posée depuis la loi du 17 janvier 1975 relative à l'interruption volontaire de grossesse. Afin d'empêcher l'instrumentalisation de l'embryon, considéré comme une personne humaine potentielle, la loi du 29 juillet 1994 a interdit « les expérimentations sur l'embryon » et seulement autorisée les « études » ne lui portant pas atteinte. Ce n'est que devant le potentiel thérapeutique offert par les hESC pour mieux comprendre et traiter des maladies graves ou incurables ou encore des affections de l'embryon ou du fœtus que le débat a été de nouveau traité le 6 août 2004 et que la recherche sur l'embryon est ainsi devenue possible. Toutefois, ces autorisations de recherche sur l'embryon et les hESC n'ont été données qu'à titre dérogatoire avec un moratoire de 5 ans à compter de la publication de ce décret d'application (n°2006-121) le 7 février 2006. Ainsi, ces recherches « doivent cumulativement être susceptibles de permettre des progrès thérapeutiques majeurs (article R. 2151-1) et de ne pas pouvoir être poursuivies par une méthode alternative d'efficacité comparable, en l'état des connaissances scientifiques ».

Les principes fondamentaux de cette loi ont été révisés récemment, le 7 juillet 2011. Sans grande modification, le nouveau texte maintient le système d'interdiction/dérogation mais le moratoire a été annulé. Les dérogations sont accordées par l'Agence de la Biomédecine, qui est un établissement public national de l'État créé par la loi de bioéthique de 2004. Cette agence accorde les dérogations sur la base de la pertinence scientifique du projet de recherche, ses conditions de mise en œuvre au regard des principes éthiques et son intérêt pour la santé publique. Toutefois, la décision finale d'autorisation appartient au ministre de la Santé et de la Recherche qui peut interdire ou suspendre un protocole après l'avis du conseil d'orientation. Les recherches ne peuvent être menées qu'à partir d'embryon conçu *in vitro* dans le cadre d'une assistance médicale à la procréation et qui ne fait plus l'objet d'un projet parental. De plus, il doit y avoir un consentement écrit préalable des parents qui doit être confirmé à l'issue d'un délai de réflexion de trois mois. Enfin, les embryons sur lesquels une recherche a été conduite ne peuvent pas être transférés à des fins de gestations. C'est dans ces conditions que l'Agence de la Biomédecine a autorisé plusieurs équipes de recherche françaises à dériver de nouvelles lignées de hESC dont la première fut attribuée au Dr M.

Peschanski et au Pr S. Viville le 19 juin 2006, pour la dérivation et l'amplification de lignées d'hESC porteuses de mutations à l'origine de maladies monogéniques.

3.3. Utilisation des cellules souches comme modèle pathologique

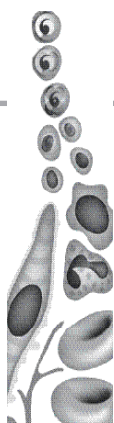
3.3.1. Le diagnostique pré-implantatoire

L'obtention d'hESC porteuses de la mutation causale d'une maladie monogénique est possible grâce au diagnostique pré-implantatoire (DPI), réalisé sur des embryons issus de fécondation *in vitro* (FIV) dans un projet de procréation médicalement assistée. Ainsi, trois jours après fécondation *in vitro*, une ou deux cellules (blastomères) sont prélevées des embryons et testées pour la présence de la mutation causale. Dès lors, qu'un embryon est positif pour l'anomalie génétique, il est écarté du projet parental et donné à la science, avec bien évidemment l'accord parental.

L'utilisation des cellules souches pluripotentes humaines (hESC ou iPSC) pour la modélisation pathologique a fait l'objet d'une revue paru en septembre 2011 dans le journal *Regenerative Medicine* présentée dans le paragraphe suivant.

3.3.2. Revue : "*Human pluripotent stem cells for genetic disease modeling and drug screening*" (Gauthier, Maury *et al.* 2011)

For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com



Human pluripotent stem cells for genetic disease modeling and drug screening

Considerable hope surrounds the use of disease-specific pluripotent stem cells, which can differentiate into any cell type, as starting materials to generate models of human disease that will allow exploration of pathological mechanisms and the search for new treatments. Disease-specific human embryonic stem cells have provided a useful source for studying certain disease states. However, reprogramming of human somatic cells that use readily accessible tissue, such as skin or blood, to generate embryonic-like induced pluripotent stem cells has opened new perspectives for modeling and understanding a larger number of human pathologies. Here, we examine the challenges in creating a disease model from human pluripotent stem cells, and describe their use to model both cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms, the need for adequate control experiments and the genetic limitations of human induced pluripotent stem cells. Progress in these areas will substantially accelerate effective application of disease-specific human pluripotent stem cells for drug screening.

KEYWORDS: drug screening ■ human embryonic stem cells ■ human induced pluripotent stem cells ■ human pluripotent stem cells ■ monogenic diseases ■ pathological modeling

Understanding the mechanisms by which a genetic variation contributes to diseases is a central aim of human genetics and will greatly facilitate the development of preventive strategies and treatments. Classically, the genetic variation has been explored *in vivo* using gain- or loss-of-function mutants in model organisms. However, numerous human phenotypes fail to be successfully reproduced in these models owing to species differences or a lack of synteny. In parallel, access to human tissues other than blood is quite limited and efforts to expand biopsy material, by, for example, immortalizing primary cell lines, frequently result in genetic alteration and phenotypic artefacts. Moreover, available cell lines or tissues are often not the tissues of interest, rendering much of the analysis less relevant.

Recent advances in cell biology have fueled the prospect that perhaps the difficulty in unraveling the disease mechanisms could be overcome thanks to the availability of disease-specific pluripotent stem cells. The concept is simple: pluripotent stem cells are capable, by definition, of differentiation into most if not all adult cell types. Therefore, they afford access to difficult-to-obtain cell populations (e.g., neurons) allowing investigators to follow the disease progression and then to gain valuable insight into the pathophysiology of that disease. Another crucial advantage of pluripotent stem cells is their capacity to self-renew facilitating cell-based genetic or drug

screening. Classically, human disease-specific pluripotent stem cells can be generated using two distinct methods. First, disease-specific human embryonic stem cells (hESCs) can be derived from preimplantation embryos obtained during *in vitro* fertilization. Second, embryonic-like stem cells can be obtained through the conversion of somatic cells isolated from patients by genetic manipulations (FIGURE 1) [1,2]. Owing to their origin, pluripotent stem cells are considered to be inexhaustible, scalable and physiologically native material for experimentation. Patient-specific cells should probe genotype–phenotype relationships for each disease analyzed. Pluripotent stem cells represent the genetic background of the original patient, which may be crucial as phenotype variation may entail interactions between a polymorphism and modifier loci. The increasing development of protocols for directed tissue differentiation combined with genome-wide association studies has created the opportunity to interrogate the cellular and biochemical consequences of genetic variation and to identify new prognostic biomarkers.

Disease modeling using human pluripotent stem cells relies on two important conditions: the differentiation of pluripotent stem cells into pathologically relevant populations and the ability to recapitulate key aspects of the disease in a time frame compatible with *in vitro* studies. Although none of these conditions are easily reached, the

Morgane Gauthier^{1,2},
Yves Maury³,
Marc Peschanski^{1,2,3}
& Cécile Martinat^{1,2}

¹Inserm U 861, I-STEM, AFM, 91030, Evry cedex, France

²UEVE U 861, I-STEM, AFM, 91030, Evry cedex, France

³CECS, I-STEM, AFM, 91030, Evry cedex, France

[†]Author for correspondence:
Institut des cellules Souches pour le
Traitement et l'Étude des maladies
Monogéniques, 5 rue Henri
Desbruères, 91030, Evry cedex, France
Tel.: +33 169 908 520
cmartinat@istem.fr

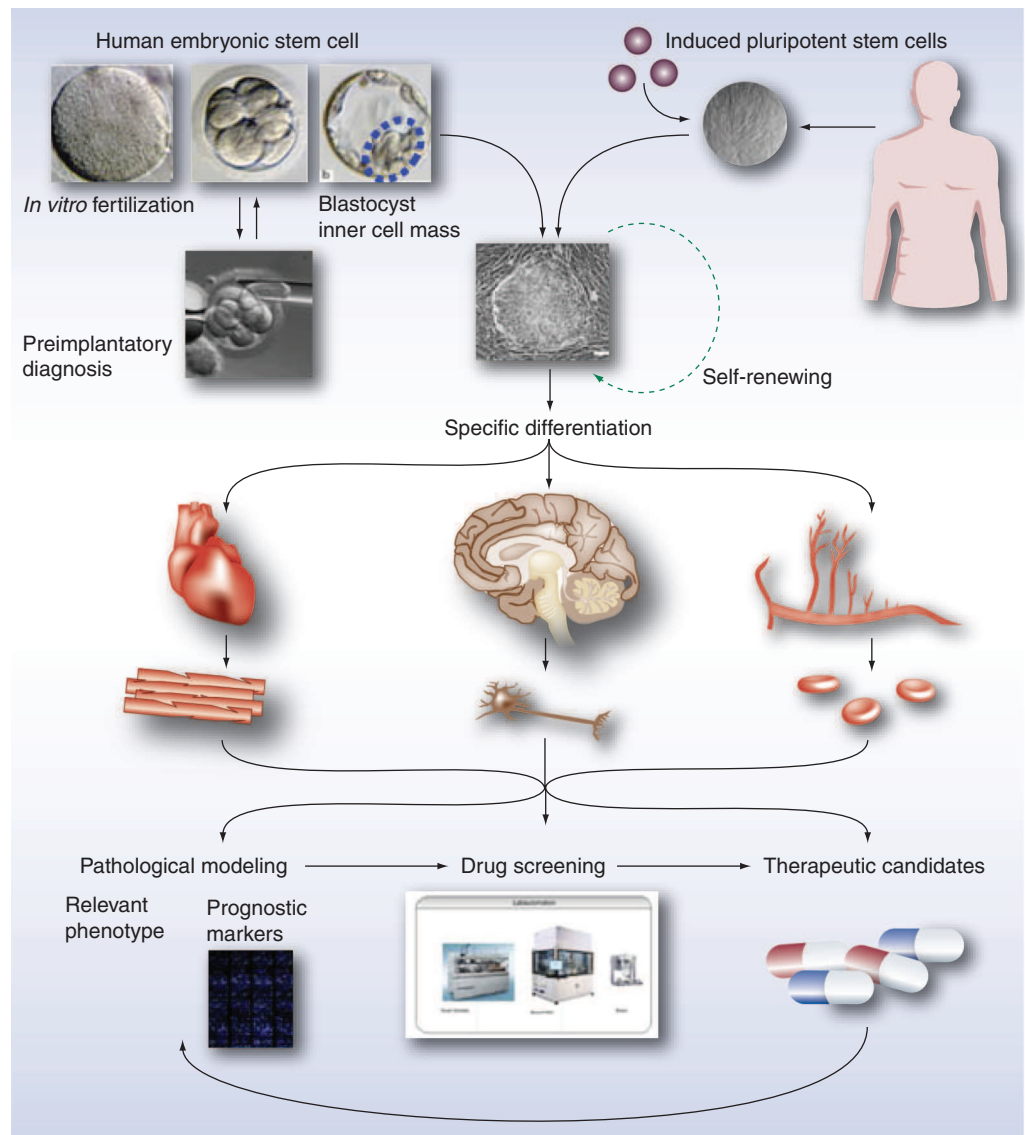


Figure 1. The use of human embryonic stem cells/human induced pluripotent stem cells in disease modeling and drug development.

Pluripotent stem cells carrying a disease-linked mutation can be derived via reprogramming from patient tissues samples, by isolation of human embryonic stem cells from preimplantation diagnosed embryos. Differentiation of these pluripotent stem cells can be used to study the emergence of the disease phenotype *in vitro*, and for drug screening and identification of a potential therapeutic compound that will be validated by using the cellular system developed.

use of disease-specific pluripotent stem cells to address pathophysiological questions has exploded over the past 5 years. Most of these studies have focused on monogenic diseases to develop proof-of-principle differentiation and phenotype assays so that potentially subtle cell-cultures changes can be correlated to strong clinical features; however, the field also envisions using pluripotent stem cells to investigate complex disorders. Here, we discuss these studies and the insights that they offer. We also consider the challenges that need to be addressed before the full clinical potential of these cells can be realized.

Modeling monogenic diseases

■ Proof of concept

Until 5 years ago, two methods for obtaining disease-specific human pluripotent stem cells had been described: the genetic modification of existing hESCs or the derivation of hESCs from embryos carrying the causal mutation related to a monogenic disease detectable during preimplantation genetic diagnosis (PGD) (TABLE 1). In 2004, Urbach *et al.* were the first to demonstrate that genetically modified hESCs can reproduce, to some extent, molecular features associated with Lesch–Nyhan syndrome [3].

In this study, the *hrpt1* gene was mutated in hESCs through homologous recombination. The resulting hESCs showed an absence of *hrpt1* activity and produced more uric acid than unmodified 'wild-type' cells [3]. However, the generation of mutant hESC lines has faced challenges due to the inefficient methods used to genetically modify hESCs.

By performing PGD on embryos, disease-specific hESCs have been derived for a dozen different monogenic diseases. To date, few of these studies have really recapitulated the phenotype of diseases (TABLE 1). In the case of the myotonic dystrophy type 1 (DM1), our laboratory recently demonstrated that PGD-hESCs can be used to identify new physiopathological mechanisms [4]. DM1 patients suffer from muscle wasting and multiple defects in their CNS. Although progress has been made concerning the identification of the mutation implicated in this disease, the molecular mechanisms that underlie the disease, and thus potential targets for treatment, are not well understood [5]. We first demonstrated that neural cells derived from two different DM1-hESCs lines recapitulate some molecular features associated with DM1, such as the presence of toxic ribonucleoprotein inclusions and the splicing defect of the NMDA receptor 1 as described in patients [6]. A genome-wide comparison of DM1 hESCs differentiated into neural cells with their healthy counterparts allowed the identification of a reduced expression of two genes of the *SLITRK* family in mutant cells that was mirrored in DM1 brain samples. *SLITRK* proteins are involved in the outgrowth of neurites and the formation of synapses, which are sites of communication between nerve and muscle cells. The misexpression of *SLITRK* genes in DM1 cells could be related to a defect of DM1 hESC-derived motoneurons to correctly connect with their target muscular cells, reminiscent of observations made in a DM1 patients and in DM1 mouse model. Interestingly, this phenotype can be both rescued by overexpression of missing genes in mutant cells and induced in control cells by knocking down expression of the genes. These results illustrate the clinically important contribution of disease-specific hESCs to understanding human disease. By using disease-specific hESCs combined with a genome-wide analysis, this study highlights the potential of hESCs to unravel pathological mechanisms. Finally, hESC technology can help to unveil the changes in connectivity properties between neurons that are affected by a given neurological disease.

Whilst these results highlight the value of hESCs for disease modeling, the number of diseases captured by PGD-hESCs is still limited due to the fact that PGD embryos are only available for a very restricted number of human diseases. In addition, owing to their origin, PGD-hESCs do not present any clinical history. This might interfere with their relevance as many genetic disorders display incomplete or low penetrance from patient to patient.

■ New prospects for disease modeling using human induced pluripotent stem cells

Concurrent to the development of disease-specific hESCs lines, the conversion of somatic cells from patients into induced pluripotent stem cells (iPSCs) has transformed the prospect for disease modeling [1,7]. Routinely, iPSCs are generated using four genes encoding transcription factors highly functional in hESCs (i.e., Oct3/4, Sox2, Klf4 and c-Myc) transferred by viral vector infection to somatic cells isolated from patients. Reprogramming of fibroblasts for several diseases has been reported (TABLE 2) but few studies have actually recapitulated the phenotype of these disorders. Successful generation of human iPSCs (hiPSCs) has been reported both for monogenic diseases such as epidermolysis bullosa [8] and congenital dyskeratosis [9], and for more complex conditions such as autism spectrum disorders [10], schizophrenia [11] and sporadic middle- or late-age onset neurodegenerative

Table 1. Disease modeling using human embryonic stem cells.

Disease (responsible gene)	Recapitulated phenotype	Ref.
Huntington (<i>Huntingtin</i>)	Not determined	[91]
Cystic fibrosis (<i>CFTR</i>)	Not determined	[91,92]
X-linked myotubular myopathy (<i>MTM1</i>)	Not determined	[91]
Turner syndrome (monosomy X)	Not determined	[93]
Fabry syndrome (<i>GLA</i>)	Not determined	[91]
Multiple endocrine neoplasia type 2 (<i>RET</i>)	Not determined	[91]
Spinocerebellar ataxia type 2 (<i>ATXN2</i>)	Not determined	[91]
Fragile X syndrome (<i>FRM1</i>)	Extension of <i>FRM1</i> expression during early differentiation	[38]
Myotonic dystrophy type 1 (<i>DMPK</i>)	Detection of the ribonuclear inclusions NMDAR1 alternate splicing defect Defect in neuritogenesis and synaptogenesis in hESC-derived motoneurons	[4,92]
Lesch–Nyhan syndrome (<i>HRPT1</i>) Mutation introduced by homologous recombination	Absence of HRPT1 activity Increased production of uric acid	[3]

hESC: Human embryonic stem cell.

Table 2. Disease modeling using human induced pluripotent stem cells.

Disease (responsible gene)	Recapitulated phenotype/drug efficacy	Ref.
Fanconi anemia (<i>FANCA</i>)	Unsuccessful generation of hiPSCs from patients Generation of hiPSCs after <i>in vitro</i> genetic correction of patient's fibroblasts	[36]
Adenosine deaminase deficiency (<i>ADA</i>)	Not determined	[7]
Shwachman–Bodian–Diamond syndrome (<i>SBDS</i>)	Not determined	[7]
Gaucher disease type III (<i>GBA</i>)	Not determined	[7]
Becker muscular dystrophy	Not determined	[7]
Huntington (<i>Huntingtin</i>)	Not determined	[7]
Amyotrophic lateral sclerosis (sporadic)	Not determined	[12]
Juvenile diabetes mellitus (sporadic)	Not determined	[7,94]
β -thalassemia	Not determined	[95]
Parkinson (sporadic)	Not determined	[7,96]
Parkinson (<i>PINK1</i>)	Mitochondrial defects Rescue of the phenotype by <i>PINK1</i> genetic correction	[72]
Dyskeratosis congenita (X-linked, <i>DKC1</i>)	Elongated telomere Shortened telomere after differentiation	[9]
Duchenne muscular dystrophy	No dystrophin expression in teratoma tissues from hiPSCs	[7,97]
Rett syndrome (<i>MECP2</i>)	Reduced number of glutamatergic synapses and morphological alterations Reduced activity-dependent calcium transients Reduced spontaneous postsynaptic currents	[10,14]
Hutchinson–Gilford progeria (<i>LMNA</i>)	Presence of progerin in mesodermic lineage Abnormal nuclear morphology Defects in DNA repair machinery Premature senescence in smooth muscular progeny	[15,16]
Leopard syndrome (<i>PTPN11</i> , <i>RAF1</i> , <i>SHOC2</i>)	Enlarged cell size of differentiated cardiomyocyte Inactivated RAS–MAPK pathway	[98]
Down syndrome (trisomy 21)	Weak microvascular density	[7,99]
Spinal muscular atrophy (<i>SMN1</i>)	Decreased number of ChAT/TuJ1 ⁺ neurons Decreased SMN protein level Rescued phenotype in hiPSCs with valproic acid	[13]
Familial dysautonomia (<i>IKBKAP</i>)	Increased abnormal splicing in differentiated neural crest Decreased number of ASCL1 ⁺ /TuJ1 ⁺ neurons Migratory dysfunction Partial rescue with kinetin	[21]
Long QT syndrome (<i>KCNQ1/2</i>)	Cardiac defect Altered localization of the potassium channel Sensitivity of cardiomyocyte-derived hiPSCs to catecholaminergic stress	[18,19,100,101]
Prader–Willi syndrome Angelman disorder (<i>UBE3A</i>)	Appropriate methylation imprinting	[42,43]
Schizophrenia	Synaptic defects Phenotype rescue with loxapine	[11]

ChAT: Choline acetyltransferase; hiPSC: Human induced pluripotent stem cell.

diseases (e.g., amyotrophic lateral sclerosis [ALS] and Parkinson's disease [PD]) [7,12]. This rapidly increasing number of studies demonstrates the attractiveness and interest of using iPSC-based models to study human development and disease. From the reprogramming point of view, it is remarkable that aged fibroblasts (up to 85 years old) from ALS and PD patients could still be reset with similar efficiency as fibroblasts from

younger patients. Nonetheless, demonstration of disease-related phenotypes in the relevant cell type (i.e., the specific cells that are affected in the disease) has been a major challenge.

To date, only partial disease modeling was reported, mostly for monogenic diseases. This modeling can become even more relevant when animal models for the pathology do not recapitulate the exact human situation,

as for the spinal muscular atrophy (SMA) disorder. SMA is a group of autosomal recessive diseases characterized by a specific loss of lower motoneurons of the spinal cord and is one of the leading genetic causes of infant mortality. Homozygous absence of the survival motoneuron gene *SMN1* is the primary cause of SMA, while disease severity is mainly determined by the expression level of the *SMN1* paralog, *SMN2*, only present in humans. All species used to model SMA have only one *SMN* gene equivalent to *SMN1*, making these models difficult to interpret. Ebert *et al.* derived hiPSCs from fibroblasts from a single SMA patient and showed a decrease in hiPSC-derived motoneuron survival after 6 weeks of differentiation, compared with hiPSC-derived motoneurons from the unaffected mother [13]. These SMA hiPSCs also respond to compounds known to nonspecifically increase *SMN* expression, indicating a potential future drug-screening platform using iPSC technology. Although promising, these results need to be extended to additional SMA patients and controls to confirm that the observed phenotype is not a consequence of the intrinsic hiPSC variability system.

A possible way to bypass this problem is the obtention of similar results in different laboratories increasing the pertinence and the validation of disease-specific hiPSCs, has been demonstrated for Rett syndrome [10,14], Hutchinson–Gilford progeria [15,16] and long QT syndrome (LQTS). LQTS is a familial arrhythmogenic syndrome characterized by abnormal ion channel and sudden cardiac death. Although mice models have provided important insights into LQTS pathogenesis, the fact that the mouse heart beats roughly seven-times faster than the human heart makes it difficult to rigorously phenocopy human arrhythmia in mice [17]. Two distinct studies described that cardiomyocytes derived from LQTS patient-specific hiPSC lines recapitulated the electrophysiological features of the disease [18,19]. Interestingly, Moretti *et al.* demonstrated that the mutant form of the *KCNQ1* protein subunit, which constitutes the pore-forming subunits of the channels that generate potassium currents, interfered with the function of the wild-type subunit and that varying the relative quantities of these subunits resulted in markedly altered subcellular localization of the potassium channels [18]. In this context, the use of a transgene under a ubiquitous promoter would have resulted in a different ratio between the wild-type and the mutant proteins leading to a

different experimental outcome. This finding illustrates the power of studying mutations within their natural environment. Moretti *et al.* also found that LQTS hiPSCs were vulnerable to catecholaminergic stress opening up the possibility to screen for compounds that can ameliorate the clinical phenotype [18].

Another study on the neurodegenerative familial dysautonomia (FD) disease also suggests the possible use of disease-specific hiPSCs for drug screening. FD is a severe genetic neurological condition that affects the sensory and the autonomic nervous system causing gastrointestinal, cardiac, pulmonary, orthopedic, renal and ophthalmologic problems. Most FD patients harbor a point mutation in the *IKBKAP* gene leading to a tissue-specific splicing defect with reduced levels of the transcript encoding IKBKAP [20]. hiPSCs derived from three patients with FD revealed that neural crest precursors specifically had low levels of *IKBKAP* expression [21]. In addition, a defect in neuronal differentiation and migration was also reported. Although confirmation that the observed phenotypes are truly related to the disease still needs to be demonstrated by repairing the gene defects, this cellular system was used to identify a drug candidate. Testing three previous compounds known to act on the splice and the absolute levels of IKBKAP, kinetin was identified for its ability to reduce the levels of the mutant IKBKAP splice forms. It also improve neuronal differentiation but not cell migration in hiPSC-derived neuronal differentiation, suggesting incomplete phenotype complementation. However, these findings open the possibility for drug screening using kinetin-like variations with neuronal differentiation and cell migration phenotypes as readouts in future studies.

Technical challenges & emerging solutions

Whereas these first studies are encouraging as they demonstrate the potential of pluripotent stem cells to reproduce and identify new pathological mechanisms, numerous challenges still need to be overcome in order to clearly evaluate the strength of pluripotent stem cell technology for pathological modeling and drug discovery (TABLE 3).

■ Differentiation

Robust and efficient differentiation towards selected cell phenotypes is without question the most daunting barrier to studying diseases. The generation of specific functional cell types

from hESCs/iPSCs has been demonstrated, including in various subtypes of neural cells, vascular endothelium, smooth muscle cells, cardiomyocytes, hematopoietic cells, pancreatic insulin-producing cells or hepatocyte-like cells [12,22–26]. Most of these protocols have been developed on the basis of our knowledge of developmentally relevant signals identified in animal models. However, further studies are required to fully understand the complexity of signals and genetic programs that control differentiation of each individual cell type. Illustrating this complexity, neuronal subtype diversity is commonly associated with a differential sensitivity to degeneration leading to multiple neurodegenerative disorders. Thus, in PD, dopamine neurons located in the substantia nigra die to a greater extent than those located in the neighboring ventral tegmental area. The ability to generate a well-defined cellular subtype might be a necessary condition to unravel the mechanisms that regulate the differential cellular vulnerability during the disease progression. In the case of iPSCs, this task might also be complicated by the fact that the developmental and disease phenotype of hiPSCs and their derivatives may be heavily influenced by altered epigenetic factors [27].

■ Epigenetic & genetic limitations of iPSCs

The ability to recognize fully reprogrammed patient iPSCs is improving, with molecular criteria such as transgene silencing, and REX1 and DNMT3B expression proving to be more informative than teratoma formation [28].

However, although iPSCs present the main biological features of hESCs (i.e., self-renewing and pluripotency), a growing number of studies indicate differences between hiPSCs and hESCs.

Assessing the X chromosome inactivation in hiPSCs indicates whether acquisition of the pluripotent state has been achieved and should provide valuable insight into the epigenetic status of hiPSCs. However, data are still controversial likely due to the different techniques used. While it has been reported that female hiPSCs retain an inactive X chromosome [29], recent analysis suggests that, as observed for hESCs, the X chromosome is activated on reprogramming in some hiPSCs lines [10,30]. Further studies will be needed to clearly determine the X inactivation profile during reprogramming.

In parallel, it is now clearly established that some hiPSCs do retain an epigenetic memory of their donor cells [31]. Recently, Lister *et al.* showed that although hESC and hiPSC methylomes are very similar, every hiPSC line shows significant reprogramming variability compared with both ESCs and other hiPSCs. This includes both somatic ‘memory’ and iPSC-specific differential DNA methylation that is independent of the technique used for reprogramming [32]. Further analyses are required to better understand the molecular basis of the imperfect clearing of epigenetic memory and identify the functional consequences of these differences.

Furthermore, it was recently shown that hiPSCs exhibit genetic abnormalities such as chromosomal aberrations [33], subchromosomal copy-number variation [34] and protein-coding point mutations [35]. These genetic abnormalities, observed independently of the reprogramming techniques used and independently of the laboratory in which hiPSCs were generated, can result either from the reprogramming itself or from the adaptation to the long-term *in vitro* culture. All these results highlight the necessity to develop a set of relevant markers to define the genetic profile of the hiPSCs in the future. However, the most important point remains to determine the exact functional consequences of these findings. It is actually difficult to predict whether these genetic modulations will have a substantial negative effect on the use of hiPSCs for pathological modeling.

Several reports suggest that not all pathological conditions can be readily modeled using hiPSCs. Cells from patients with Fanconi’s anemia are defective in DNA repair and are refractory to reprogramming, making it difficult to model this condition *in vitro* [36]. Instead, by using

Table 3. Challenges of pluripotent stem cells for pathological modeling.

Challenges	hESCs	hiPSCs
Specific cell type challenges	Restricted number of PGD Patient’s history and penetrance	Use of integrative vectors Genetic/epigenetic alterations Epigenetic diseases Complex diseases
Common challenges	Differentiation Confirm the genotype–phenotype relationship Late-onset versus early-onset diseases Non-cell-autonomous diseases Pathology easy/difficult to measure Function of gene products known	

As addressed in more details in the subsequent sections of this article, this table schematically gives a brief outline of the problems that need to be confronted when creating disease models using pluripotent stem cells.

hESCs: Human embryonic stem cells; hiPSCs: Human induced pluripotent stem cells; PGD: Preimplantation genetic diagnoses.

RNAi against multiple Fanconi's anemia genes in hESCs, Tulpule *et al.* demonstrated that the derived hematopoietic cells were markedly reduced at the earliest stages of blood lineage specification [37]. Discordance between the same disease modeled by hESCs and hiPSCs was also observed, as illustrated by the fragile X syndrome (FXS). The mutated trinucleotide expanded fragile X mental retardation 1 allele is expressed in FXS PGD-hESCs but fails to be transcriptionally reactivated in FXS-hiPSCs following reprogramming, due to an incorrect epigenetic reprogramming [38,39]. In accordance with these results, it has been shown that the epigenetic 'memory' of the original differentiated state may not be perfectly erased during reprogramming [36,40]. Functionally, this means that certain gene expression or expression-permissive chromatin states that are ordinarily restricted to the differentiated parent cell type (e.g., a blood cell or skin fibroblast) persist in the reprogrammed iPSCs. These chromatin states have a functional outcome: they impair differentiation of reprogrammed cells towards lineages different from their cell of origin and favor differentiation towards lineages close to the cell type of origin [41]. Practically, the use of a closely related parent cell type to make hiPSCs may be the most efficient way at present to achieve the desired differentiation. As illustrated with the modeling of FXS with hiPSCs, this variation may also compromise studies into the mechanism of epigenetically based diseases, such as Prader-Willi or Angelman syndromes. Whereas hiPSCs were recently generated for these disorders, more investigations are necessary to clearly address epigenetic diseases using hiPSCs [42,43]. Altogether, these results mainly indicate the need for developing adapted experimental controls that are currently altogether missing.

■ Lack of proper controls & targeted genetic modification

The use of well-defined control cells is crucial. Recent genome-wide association studies have demonstrated that every person has disease-relevant single nucleotide polymorphisms, and it is therefore impossible to categorically define iPSCs that represent perfect nondisease control.

Traditionally, age-matched, unaffected controls within the same pedigree are used, although they are often unavailable and represent an approximate control as they can differ in genetic background, gender, age and exposure history. Introducing targeted genetic modifications at defined loci into hESCs would

ameliorate this problem but still represents a technical challenge. Nonetheless, the use of wild-type iPSC/hESC lines with disease-introducing genetic modification and disease gene-corrected hiPSC/hESC lines should provide benchmarks of disease modeling to specify differences between disease and nondisease control, excluding other contributors than the targeted gene. Gain-of-function (via transgenes) and loss-of-function (via shRNA) approaches can be achieved by using lentivirus transduction. However, this poses the risk of potentially mutagenic viral insertion. Recently, a strategy combining bioinformatics and functional analyses was developed to genetically modify hiPSCs at 'safe harbor' sites in the genome based on their position relative to contiguous coding genes, miRNAs and ultraconserved regions [44]. Another approach would be to use bacterial artificial chromosomes containing human gene variants, which were developed in mouse embryonic stem cells (mESCs) [45].

A particular challenge is the targeting of specific endogenous genes [46,47]. The classical techniques that allow the introduction of transgenes into mESCs/iPSCs are not efficient in hESCs due to difficulty in manipulating pluripotent stem cells as single cells. The use of Rho kinase inhibitors may help to solve this problem, as they promote single-cell cloning efficiency [48]. Currently, transgenesis and homologous recombination into human cells are largely limited to the use of integrative virus or site-specific zinc finger nucleases. However, it is not clear what fraction of genes can be targeted and if these approaches induce other small DNA changes [49,50].

It has recently been demonstrated that the limited genetic manipulation of human pluripotent stem cells in comparison with the mouse system is due to their differential developmental status. Recent studies have shown the existence of several distinct mouse pluripotent states, mainly defined by culture growth factor conditions [51,52]. Whilst LIF/Stat3 signaling allows the derivation of mESCs from the inner mass of preimplantation blastocysts, an additional type of pluripotent stem cells can be derived from the preimplantation epiblast of murine embryos (mEpiSCs), by using bFGF and TGF- β /activin signaling. Although not identical, these mEpiSCs share similar features with hESCs and iPSCs and are distinct from mESCs. mEpiSCs and hESCs/hiPSCs are both characterized by a flattened morphology, an intolerance to passaging as single cells, a

dependence on TGF- β /activin signaling rather than LIF/Stat3, and molecular and epigenetic features distinct from mESCs. Recently, it has been reported that hESCs/hiPSCs adopt mESC properties when derived in the presence of LIF and that the acquisition of this novel pluripotent state facilitates homologous recombination-mediated gene targeting [53,54]. This result provides new perspectives to efficiently introduce targeted gene modification and correction in human pluripotent stem cells and to develop adapted control cell lines. We argue that such control experiments should become the norm for future studies on human disease models using pluripotent stem cells, as genetic differences among the human population and, hence, among affected and control cell lines may be quite consequential.

■ Presence of viral vectors

The use of integrative viral vectors raises several concerns. The residual expression of integrated factors in hiPSCs might affect the biological properties of the hiPSC clones and their derivatives. Numerous strategies have been developed to improve reprogramming technologies. For example, whereas c-Myc greatly enhances the reprogramming efficiency, its inclusion should be discouraged, given its clear oncogenic potential. Recently it was shown that L-Myc and c-Myc mutants, which present little transformation activity, promote the generation of hiPSCs with more efficiency and specificity as compared with wild-type c-Myc [55]. Nonintegrative strategies using episomes [56], adenoviral transfection [57], RNA virus [58] or plasmid transfection [59] have been described but are less efficient. Additional studies report that the original quartet of reprogramming factors are not necessary under certain conditions and could be modified in accordance with the experimental context [60]. The use of recombinant proteins, synthetic modified RNA or miRNA have been also shown to induce reprogramming of human fibroblasts with different efficiencies [61–63]. The relatively high efficiency of reprogramming obtained with the use of RNA should make it possible to generate hiPSCs more easily by simple transfection. This novel technology should result in the near future in the investment of companies in the nascent iPSC industry. Small chemical molecules that affect epigenetic modifying enzymes have been used in conjunction with or as replacements of some of the four factors [64], but there has yet to be a demonstration of using only small molecules

to reprogram somatic cells. Clearly, all these studies illustrate the necessity to obtain a better understanding of the mechanisms underlying somatic cell reprogramming in order to fully validate the iPSC technology.

■ Non-cell-autonomous phenotypes

Pathological phenotypes arise from cellular interactions within tissues. Such non-cell-autonomous pathogenic scenarios can be challenging to investigate in part because it is difficult to model them *in vitro*. It is therefore important to develop assays in order to recapitulate the complexity of interactions between cell types. Several techniques are possible: *in vitro* assays, such as co-culture and organoids; *in vivo* assays that use transplantation; and extrapolation of findings from animal models.

Recent reports have demonstrated the promising use of human pluripotent stem cells to recapitulate the relevant microenvironments that provide the non-cell-autonomous factors that are important for pathological mechanisms. This has been achieved for the neurodegenerative disorder ALS. Of the patients with inherited ALS, 25% have superoxide dismutase 1 (SOD1) mutations that, based on mouse studies, act in a dominant-negative fashion [65]. Interestingly, two independent groups showed that primary astrocyte cultures expressing ALS-associated mutant SOD1 proteins can mediate a toxic activity on hESC-derived motor neurons [66,67]. Nevertheless, these observations were obtained after overexpression of mutant SOD1 in human primary cultures of astrocytes. It is therefore not known whether astrocytes derived from patients carrying a single copy of the mutated gene would elicit the same toxicity [68]. Similar demonstrations were recently obtained. Kim *et al.* showed that HEK293T cells overexpressing NLGN3 and NLGN4, but not those expressing autism-associated mutations, are able to induce synaptic differentiation in hiPSC-derived neurons [69]. Similarly, our group recently demonstrated that co-cultures between human primary myotubes and disease-specific hESC-derived neurons can be used to identify synaptogenesis defects in the context of neuromuscular disorders [4]. Whilst these results are promising, advances in tissue engineering, such as 3D systems, to create more accurate spatial microenvironments for co-culture, might be the next challenge for disease modeling. Interestingly, a robust process has been engineered to differentiate hiPSCs into 3D intestinal organoid structures [70].

However, recapitulation of the full complexity of the *in vivo* system might be necessary. Transplantation of disease-specific hiPSC-derived progenies into mouse models might contribute to better decipher the non-cell-autonomous contribution by measuring the physiologically integration. Immunodeficient mice or ‘humanized’ mice containing human immune systems are required to develop transplantation studies. This approach is commonly used to study hematopoietic diseases [31]. Transplantation into other organs such as the CNS required the existence of adapted mouse models that are able to integrate human pluripotent stem cell-derived neuronal progenies. Clearly, these approaches might be relevant to further define cell autonomy questions.

In parallel, correlation with established disease animal models, such as mouse models, might be informative to confirm any phenotype identified by using human pluripotent stem cells. Analysis of gain- or loss-of-function mouse models can complement and strengthen the results obtained with *in vitro* models.

■ Penetrance & modeling of complex traits

Even patients with a monogenic disease within families display large genotype–phenotype variability, likely due to environmental influence and its complex interactions with the genetic background. It will be interesting to determine whether the same variability can be reproduced with pluripotent stem cells or if reprogramming or culture conditions eliminate this variability ‘noise’.

For the modeling of complex traits, a key challenge is the low penetrance or weak phenotypes. Some types of manipulation can increase penetrance and assay optimization. However, using hiPSCs to model complex traits poses several problems. In the absence of a well characterized genetic modification, demonstration of the relevance of these cell lines may be challenging. In particular, for any phenotype identified in these cell lines it is essential to establish a rigorous correlation with the pathology. A recent study using hiPSCs generated from four schizophrenia patients has reopened the debate. Schizophrenia, which is a debilitating psychiatric disease, is characterized by a quite complex genetic background with a number of genes that contribute, to a small extent in general, to the pathology. In such a case, interindividual variability will unavoidably impact attempts at finding genotype/phenotype

correlations, and past genetic research for this and many other psychiatric disorders stresses the need for very large patient samples. Schizophrenia hiPSCs lines were differentiated into neurons that displayed a neuronal connectivity defect in conjunction with a decreased neurite number. However, this decreased connectivity did not result in synaptic function as assayed with electrophysiological analyses. In parallel, gene expression profiles of schizophrenia hiPSC-derived neuronal cultures identified different perturbations in pathways that may have been linked to the pathology, but there was no demonstration of such a link in the absence of rescue experiments [11]. These data show both the interest of such research with pluripotent stem cells, and the need for rescue experiments. Comparison of these results with other schizophrenia-iPSCs lines, including the ones harboring a schizophrenia-linked mutation [71], might be the next important steps to validate the possibility to use hiPSC-based models for complex disorders.

■ Clinical versus biological onset of diseases

A diverse list of genetic disorders can be categorized as late-onset disorders. Therefore, it is questionable whether the duration or the *in vitro* conditions of human pluripotent stem cell-based models might reproduce the disease phenotype. In the case of hiPSCs, it turns out that the ontogenic age of the hiPSC derivatives matches that of the donor rather than that of the embryonic cells. However, the extensive term ‘late onset’ refers to the appearance of clinical symptoms. Developments of subclinical symptoms might occur a lot earlier and can still be captured or identified using the *in vitro* approach. In favor of this argument, Seibler *et al.* recently generated hiPSCs from PD patients with nonsense or missense mutations in the *PINK1* gene that have been associated with this neurodegenerative disorder [72]. *PINK1* is a mitochondrial kinase that protects cells against mitochondrial stress and is necessary for mitochondrial function in dopamine neurons, which are specifically lost in PD [73]. The analysis of dopaminergic differentiation from these mutant *PINK1*-hiPSC lines did not reveal any defect in the generation and the survival of dopamine neurons when compared with nonaffected hiPSC-derived dopamine neurons. Only treatment with a stress mitochondrial inducer has permitted the identification of a defect in mitochondrial function between

control and mutant PINK1-hiPSC lines. Importantly, these alterations were corrected by lentiviral expression of wild-type PINK1 in mutant iPSC-derived PINK1 neurons.

Thus, for late-onset affections, phenotype might never manifest itself under basal culture conditions and might require the use of stressors to challenge cell cultures. Therefore, adult-onset disease modeling might implicate an additional step such as the identification of relevant stressors.

Cell-based models for identification & testing therapies

Drug discovery is time consuming and costly. The cost for a drug that successfully reaches the market is estimated to be approximately US\$1.5 billion. The high failure rate of compounds in clinical development is a major problem for the pharmaceutical industry. Some 90% of compounds fail in clinical trials owing to low efficiency or safety issues. One of the current drug identification techniques is based on high-throughput screening technologies that allow the rapid evaluation of millions of compounds. Most of the cellular models used for drug screening are based on genetically modified rodent or immortalized human cell lines containing reporter gene expression systems. However, these cellular models, as well as the use of overexpressed reporter genes, do not necessarily provide an accurate system to fully evaluate the exact effect of the drug on physiological condition. For example, the use of the mouse immortalized neuronal NSC-34 as a cell-based assay to find activators of the reporter gene controlled by the human *SMN2* gene promoter did not appear as the most adequate system to identify treatments for SMA [74]. In the same way, use of transgenic mice overexpressing an ALS-linked mutation in *SOD1* enables the identification of potential therapeutic compounds, such as creatine or vitamin E [75,76]. However, when tested in human, no clinical improvements were observed [77].

Recent advances in stem cells have created the possibility of high-throughput and high-content screening. For example, more than 1 million compounds have been tested using adult mouse neural stem cells in a 1536-well plate format in order to identify possible inducers of proliferation and differentiation [78]. In 2008, Desbordes *et al.* were the first to describe a method to plate hESCs into a 384-well plate for high-content screening of a small quantity of compounds that were related to self-renewal

and differentiation [79]. Recently, this technique has been extended to screen more than 20,000 compounds to identify prosurvival factors acting on single cell-plated hESCs [80]. A differentiation assay was developed to discover, among 4000 compounds, two small molecules which drive hESCs towards the endoderm lineage [81].

One of the most obvious applications of pluripotent stem cells would be in screening campaigns to evaluate the effects of novel compounds on specific human cell types that are relevant to potential toxicity (FIGURE 2). Indeed, the progressive attrition of medicinal products in the long pipeline between 'hit' identification and the market has become one of the main concerns of the pharmaceutical industry [60]. This approach involves differentiating the human pluripotent stem cells into cells of the tissue that the investigative drug affects, such as cardiomyocytes or hepatocytes, and then performing dose–response toxicity studies. Robust protocols to differentiate human pluripotent stem cells into cardiomyocytes and hepatocytes have already been described [82,83] and should be able to provide straightforward assays for analyzing certain aspects of drug metabolism and for assessing adverse effects. However, technological hurdles still exist concerning the achievement of the desired maturity of differentiated cells and minimizing the substantial heterogeneity of human pluripotent stem cell-derived differentiated cells. Despite these limitations, significant progress has been made. Data related to the electrophysiological capacity and responsiveness of hiPSC-derived cardiomyocytes in response to several cardiac and noncardiac drugs have been reported [60,84–86].

The efficient generation of functional hepatocyte-like cells from hESCs/hiPSCs for use in drug screening have been reported [87]. Owing to the diversity of cell types that can be generated from human pluripotent stem cells, one can envision the development of a broad spectrum of differentiation protocols from human pluripotent stem cells that generate representative mature cells of all tissue lineage, allowing toxicity testing of compounds in a single *in vitro* assay. The most exciting potential application of human pluripotent stem cell technology for drug discovery will likely result from the use of disease-specific human pluripotent stem cells. Although, as described above, disease-specific human pluripotent stem cells can recapitulate known physiopathological mechanisms and open the possibility for identifying new ones, no demonstration of their use for drug screening in

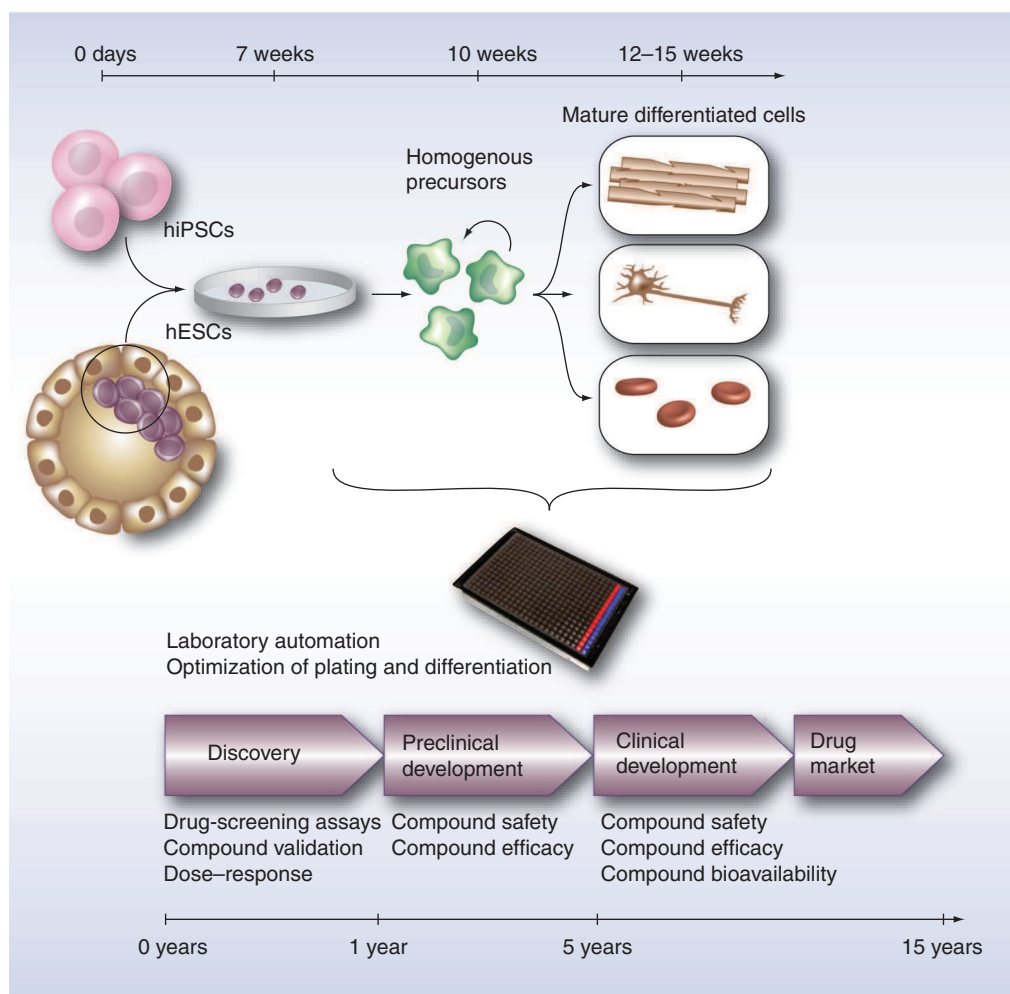


Figure 2. Generation of pluripotent stem cells can be adapted for high-throughput screening. Cells of embryonic origin or those obtained by reprogramming of somatic cells (human pluripotent stem cells) can be directed through culture in the correct nutrient-rich environment to form the various cell types found in the human body, which could then be useful for assessing multiple cellular characteristics. In addition, hESC-/hiPSC-derived precursor cells can be used in the early stage of the drug discovery process to help identify novel compounds, and to evaluate their safety and efficiency in more specialized cell types. These preclinical results could then be used to advance compounds through the next stages of drug development. hESC: Human embryonic stem cell; hiPSC: Human induced pluripotent stem cell.

that context has yet been provided. As indicated in TABLE 2, some studies have only confirmed compounds already known to be active to some extent for the pathology analyzed. Therefore, we anticipate that in the near future drug screening using disease-specific human pluripotent stem cells will be developed. However, there are a number of challenges. An important caveat to using disease-specific pluripotent stem cells is the need to generate a consistent source of cells that show reproducible and robust characteristics of the pathology that they are related to. Whereas modeling studies focus on finding phenotypes that may be associated to the disease in cells that have been specifically differentiated into relevant, often mature cell types,

it will likely be quite difficult to rely on such lengthy protocols for drug screening. As a consequence, early progeny derived from disease-specific human pluripotent stem cells will most likely be used for drug-screening development. Indeed, precursor cells, such as neural stem cells derived from human pluripotent stem cells, can be obtained more rapidly, can be amplified more easily and can be kept as a frozen 'ready to use' stock [88]. The main reason for using early progenies is that they reproduce some pathological signature that can be used for high-throughput screening format and requiries [89].

In conclusion, it remains to be determined whether these artificial *in vitro* models will indeed improve the specificity and the sensitivity

that are required to predict responses in a complex *in vivo* environment. In parallel, it is questionable if only *in vitro* models will be used to validate any lead discovery program. The use of disease-specific hESCs/hiPSCs has not yet hit the commercial market. However, several products are already in development. Cellular Dynamics International has recently commercialized hiPSC-derived cardiomyocytes for pharmaceutical cardiotoxicity testing [90]. Disease-specific hiPSCs for PD, SMA and ALS has been developed by the biopharmaceutical company iPieran. In the next future, it may be that their use will increase in major biopharma company drug discovery processes.

Future perspective

Among the different applications of pluripotent stem cells, such as cell replacement which is theoretically their most direct therapeutic approach, it is our opinion that an attainable goal in the near future will be the use of human pluripotent stem cells, especially hiPSCs, in *in vitro* applications of clinical relevance. We are convinced that the greatest potential for human pluripotent stem cells resides in their application for pathological modeling and mechanistic studies that should lead to the development of new therapeutic strategies. Disease-specific human pluripotent stem cells are already influencing the way in which disease modeling and development of adapted therapeutic strategy are approached. However, to translate disease-specific iPSCs into clinically informative models for mechanistic studies and therapeutic screening, several technical challenges need to be solved: generation of transgene-free fully reprogrammed patient iPSCs, optimization and standardization of differentiation methods, development of phenotypic assays relevant for the disease process and advances in genetic modifications to create isogenic controls. Future studies should be focused on finding solutions to meet these different criteria.

In view of the recent studies demonstrating that hiPSCs can recapitulate, in certain cases, some disease-associated phenotypes, it is clear that in the near future an expanding collection will be developed for both monogenic and complex diseases. Identification of expected phenotypes based on previous analyses of animal or cellular models are a prerequisite to validate the specificity of hiPSC models. However, identification of novel mechanisms or cellular phenotypes remains the most exciting and promising opportunity offered by these disease-specific models, which

still remains to be demonstrated. The use of 'omic' technologies and pluripotent stem cells appears to be a potentially ground-breaking combination for this purpose. Over the last decade, omic technologies, such as genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics, have been considerably developed and appear as 'dream toolboxes'. Simultaneously monitoring a large number of cellular pathways, these technologies should facilitate the identification of signaling molecules implicated in functional disturbance, cellular damage and damage response. The association of omic technologies with functional dissection, by using the plasticity of pluripotent stem cells, should therefore reveal new pathological mechanisms and help in the identification of new therapeutic approaches.

Whilst the disease-specific hiPSC field is extremely new, it is already validated against certain drug treatments. Indeed, the combination of existing drug treatment and disease-specific hiPSCs is actually used to validate the robustness of these cellular models. In the near future, we expect to see their use increase in drug discovery processes. Nevertheless, one should acknowledge that this field is still in its infancy and numerous challenges must be overcome. The potential manipulations used to push the boundaries of this cellular system are only limited by human creativity and philosophical disputes, leading to legislative constraints that need to evolve toward a workable regulatory system. However, we can conclude that while researchers in the past could not have imagined a scenario in which patient-derived cells would be readily accessible to all laboratories around the world in adequate numbers, researchers in the future will likely not envision pathophysiological analysis without them.

Acknowledgements

The authors would like to thank X Nissan and C Baldeschi for helpful discussions.

Financial & competing interests disclosure

The authors thank the AFM for support. MM Gauthier is funded by the French ministry of research and education. M Peschanski and C Martinat are funded by INSERM (National Institute for Health and Medical Research). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Executive summary

Why use human pluripotent stem cells for pathological modeling & drug screening?

- Existing animal models or cellular models are inadequate.
- Human pluripotent stem cells are self-renewing and able to give rise to most of the cell types of the organism.

Sources for disease-specific human pluripotent stem cells

- Isolation of human embryonic stem cells from preimplantation diagnosed embryos.
- Genetic modification of existing human embryonic stem cells.
- Conversion of patient somatic cells into induced pluripotent stem cells by genetic manipulations.

Next challenges to using human pluripotent stem cells for disease modeling

- Robust and efficient differentiation towards selected cell types.
- Most diseased human induced pluripotent stem cells are generated using integrating retrovirus or lentivirus generating genetic modifications that could hamper efforts to pathological modeling.
- Given the genetic and epigenetic variability of human pluripotent stem cells, development of appropriate controls are needed.
- Complex diseases might be difficult to capture using human induced pluripotent stem cells.
- Long periods of time or stress induction might be required to recapitulate phenotypes of adult- or late-age onset diseases.

Hurdles to drug screening

- Generate a consistent source of cells that show reproducible and robust characteristics of the pathology.
- Availability of drug libraries.

Bibliography

Papers of special note have been highlighted as:
 ■ of interest

- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131(5), 861–872 (2007).
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282(5391), 1145–1147 (1998).
- Urbach A, Schuldiner M, Benvenisty N. Modeling for Lesch–Nyhan disease by gene targeting in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 22(4), 635–641 (2004).
- Marteyn A, Maury Y, Gauthier MM *et al.* Mutant human embryonic stem cells reveal neurite and synapse formation defects in type 1 myotonic dystrophy. *Cell Stem Cell* 8(4), 434–444 (2011).
- Lee JE, Cooper TA. Pathogenic mechanisms of myotonic dystrophy. *Biochem. Soc. Trans.* 37(Pt 6), 1281–1286 (2009).
- Jiang H, Mankodi A, Swanson MS, Moxley RT, Thornton CA. Myotonic dystrophy type 1 is associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of muscleblind proteins and deregulated alternative splicing in neurons. *Hum. Mol. Genet.* 13(24), 3079–3088 (2004).
- Park IH, Arora N, Huo H *et al.* Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134(5), 877–886 (2008).
- Tolar J, Xia L, Riddle MJ *et al.* Induced pluripotent stem cells from individuals with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J. Invest. Dermatol.* 131(4), 848–856 (2010).
- Agarwal S, Loh YH, McLoughlin EM *et al.* Telomere elongation in induced pluripotent stem cells from dyskeratosis congenita patients. *Nature* 464(7286), 292–296 (2010).
- Marchetto MC, Carromeu C, Acab A *et al.* A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell* 143(4), 527–539 (2010).
- Brennan KJ, Simone A, Jou J *et al.* Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature* 473(7346), 221–225 (2011).
- Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK *et al.* Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321(5893), 1218–1221 (2008).
- Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr *et al.* Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 457(7227), 277–280 (2009).
- Cheung AY, Horvath LM, Grafodatskaya D *et al.* Isolation of MECP2-null Rett syndrome patient hiPS cells and isogenic controls through X-chromosome inactivation. *Hum. Mol. Genet.* 20(11), 2103–2115 (2010).
- Zhang J, Lian Q, Zhu G *et al.* A human iPSC model of Hutchinson Gilford Progeria reveals vascular smooth muscle and mesenchymal stem cell defects. *Cell Stem Cell* 8(1), 31–45 (2010).
- Liu GH, Barkho BZ, Ruiz S *et al.* Recapitulation of premature ageing with iPSCs from Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Nature* 472(7342), 221–225 (2011).
- Freund C, Mummery CL. Prospects for pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in cardiac cell therapy and as disease models. *J. Cell Biochem.* 107(4), 592–599 (2009).
- Moretti A, Bellin M, Welling A *et al.* Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. *N. Engl. J. Med.* 363(15), 1397–1409 (2010).
- Itzhaki I, Maizels L, Huber I *et al.* Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature* 471(7337), 225–229 (2011).
- Anderson SL, Coli R, Daly IW *et al.* Familial dysautonomia is caused by mutations of the IKAP gene. *Am. J. Hum. Genet.* 68(3), 753–758 (2001).
- Lee G, Papapetrou EP, Kim H *et al.* Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* 461(7262), 402–406 (2009).
- Karumbayaram S, Novitsch BG, Patterson M *et al.* Directed differentiation of human-induced pluripotent stem cells generates active motor neurons. *Stem Cells* 27(4), 806–811 (2009).
- Tateishi K, He J, Taranova O, Liang G, D'Alessio AC, Zhang Y. Generation of insulin-secreting islet-like clusters from human skin fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 283(46), 31601–31607 (2008).
- Si-Tayeb K, Noto FK, Nagaoka M *et al.* Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology* 51(1), 297–305 (2010).

- 25 Taura D, Sone M, Homma K *et al.* Induction and isolation of vascular cells from human induced pluripotent stem cells – brief report. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29(7), 1100–1103 (2009).
- 26 Narazaki G, Uosaki H, Teranishi M *et al.* Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation* 118(5), 498–506 (2008).
- 27 Meissner A. Epigenetic modifications in pluripotent and differentiated cells. *Nat. Biotechnol.* 28(10), 1079–1088 (2010).
- 28 Chan EM, Ratanasirintrao S, Park IH *et al.* Live cell imaging distinguishes bona fide human iPSCs from partially reprogrammed cells. *Nat. Biotechnol.* 27(11), 1033–1037 (2009).
- 29 Tchieu J, Kuoy E, Chin MH *et al.* Female human iPSCs retain an inactive X chromosome. *Cell Stem Cell* 7(3), 329–342 (2010).
- 30 Bruck T, Benvenisty N. Meta-analysis of the heterogeneity of X chromosome inactivation in human pluripotent stem cells. *Stem Cell Res.* 6(2), 187–193 (2010).
- 31 Zhu H, Lensch MW, Cahan P, Daley GQ. Investigating monogenic and complex diseases with pluripotent stem cells. *Nat. Rev. Genet.* 12(4), 266–275 (2011).
- 32 Lister R, Pelizzola M, Kida YS *et al.* Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471(7336), 68–73 (2011).
- **Describes the first whole-genome profiles of DNA methylation at single-base resolution in hiPSCs showing that hiPSCs present significant reprogramming variability, including somatic memory and aberrant reprogramming of DNA methylation.**
- 33 Mayshar Y, Ben-David U, Lavon N *et al.* Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 7(4), 521–531 (2010).
- 34 Hussein SM, Batada NN, Vuoristo S *et al.* Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature* 471(7336), 58–62 (2011).
- 35 Gore A, Li Z, Fung HL *et al.* Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471(7336), 63–67 (2011).
- **Describes that the reprogramming process induces somatic coding mutations, in particular in genes implicated in the cell cycle regulation.**
- 36 Raya A, Rodriguez-Piza I, Guenechea G *et al.* Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature* 460(7251), 53–59 (2009).
- 37 Tulpule A, Lensch MW, Miller JD *et al.* Knockdown of Fanconi anemia genes in human embryonic stem cells reveals early developmental defects in the hematopoietic lineage. *Blood* 115(17), 3453–3462 (2010).
- 38 Eiges R, Urbach A, Malcov M *et al.* Developmental study of fragile X syndrome using human embryonic stem cells derived from preimplantation genetically diagnosed embryos. *Cell Stem Cell* 1(5), 568–577 (2007).
- 39 Urbach A, Bar-Nur O, Daley GQ, Benvenisty N. Differential modeling of fragile X syndrome by human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 6(5), 407–411 (2010).
- **Highlights the discordance between the same disease modeled by preimplantation genetic diagnosis human embryonic stem cells and hiPSCs.**
- 40 Pick M, Stelzer Y, Bar-Nur O, Mayshar Y, Eden A, Benvenisty N. Clone- and gene-specific aberrations of parental imprinting in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 27(11), 2686–2690 (2009).
- 41 Stadtfeld M, Apostolou E, Akutsu H *et al.* Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. *Nature* 465(7295), 175–181 (2010).
- 42 Yang J, Cai J, Zhang Y *et al.* Induced pluripotent stem cells can be used to model the genomic imprinting disorder Prader–Willi syndrome. *J. Biol. Chem.* 285(51), 40303–40311 (2010).
- 43 Chamberlain SJ, Chen PF, Ng KY *et al.* Induced pluripotent stem cell models of the genomic imprinting disorders Angelman and Prader–Willi syndromes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107(41), 17668–17673 (2010).
- 44 Papapetrou EP, Lee G, Malani N *et al.* Genomic safe harbors permit high β -globin transgene expression in thalassemia induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 29(1), 73–78 (2011).
- 45 Chang S, Biswas K, Martin BK, Stauffer S, Sharan SK. Expression of human BRCA1 variants in mouse ES cells allows functional analysis of BRCA1 mutations. *J. Clin. Invest.* 119(10), 3160–3171 (2009).
- 46 Huber I, Itzhaki I, Caspi O *et al.* Identification and selection of cardiomyocytes during human embryonic stem cell differentiation. *FASEB J.* 21(10), 2551–2563 (2007).
- 47 Ma Y, Jin J, Dong C *et al.* High-efficiency siRNA-based gene knockdown in human embryonic stem cells. *RNA* 16(12), 2564–2569 (2010).
- 48 Watanabe K, Ueno M, Kamiya D *et al.* A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 25(6), 681–686 (2007).
- 49 Zou J, Maeder ML, Mali P *et al.* Gene targeting of a disease-related gene in human induced pluripotent stem and embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 5(1), 97–110 (2009).
- 50 Hockemeyer D, Soldner F, Beard C *et al.* Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* 27(9), 851–857 (2009).
- 51 Brons IG, Smithers LE, Trotter MW *et al.* Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 448(7150), 191–195 (2007).
- 52 Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA *et al.* New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 448(7150), 196–199 (2007).
- 53 Buecker C, Chen HH, Polo JM *et al.* A murine ESC-like state facilitates transgenesis and homologous recombination in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 6(6), 535–546 (2010).
- **Describes the technique to convert hiPSCs to a status closer to mouse counterparts, allowing easier transgenesis and homologous recombination.**
- 54 Hanna J, Cheng AW, Saha K *et al.* Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107(20), 9222–9227 (2010).
- 55 Nakagawa M, Takizawa N, Narita M, Ichisaka T, Yamanaka S. Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient Myc. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107(32), 14152–14157 (2010).
- 56 Yu J, Hu K, Smuga-Otto K *et al.* Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 324(5928), 797–801 (2009).
- 57 Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322(5903), 945–949 (2008).
- 58 Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc. Jpn Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 85(8), 348–362 (2009).
- 59 Carey BW, Markoulaki S, Hanna J *et al.* Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106(1), 157–162 (2009).

- 60 Inoue H, Yamanaka S. The use of induced pluripotent stem cells in drug development. *Clin. Pharmacol. Ther.* 89(5), 655–661 (2010).
- 61 Zhou H, Wu S, Joo JY *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4(5), 381–384 (2009).
- 62 Anokye-Danso F, Trivedi CM, Jühr D *et al.* Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 8(4), 376–388 (2011).
- 63 Warren L, Manos PD, Ahfeldt T *et al.* Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 7(5), 618–630 (2010).
- 64 Feng B, Ng JH, Heng JC, Ng HH. Molecules that promote or enhance reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 4(4), 301–312 (2009).
- 65 Peviani M, Caron I, Pizzasogola C, Gensano F, Tortarolo M, Bendotti C. Unraveling the complexity of amyotrophic lateral sclerosis: recent advances from the transgenic mutant *SOD1* mice. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 9(4), 491–503 (2010).
- 66 Marchetto MC, Muotri AR, Mu Y, Smith AM, Cezar GG, Gage FH. Non-cell-autonomous effect of human *SOD1* G37R astrocytes on motor neurons derived from human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 3(6), 649–657 (2008).
- 67 Di Giorgio FP, Boulting GL, Bobrowicz S, Eggen KC. Human embryonic stem cell-derived motor neurons are sensitive to the toxic effect of glial cells carrying an ALS-causing mutation. *Cell Stem Cell* 3(6), 637–648 (2008).
- **Describes the first use of human embryonic stem cells to model non-cell-autonomous mechanisms in the development of neurological disorder.**
- 68 Hedlund E, Isacson O. ALS model glia can mediate toxicity to motor neurons derived from human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 3(6), 575–576 (2008).
- 69 Kim JE, O'Sullivan ML, Sanchez CA *et al.* Investigating synapse formation and function using human pluripotent stem cell-derived neurons. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 108(7), 3005–3010 (2011).
- 70 Spence JR, Mayhew CN, Rankin SA *et al.* Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue *in vitro*. *Nature* 470(7332), 105–109 (2011).
- 71 Chiang CH, Su Y, Wen Z *et al.* Integration-free induced pluripotent stem cells derived from schizophrenia patients with a *DISC1* mutation. *Mol. Psychiatry* 16(4), 358–360 (2011).
- 72 Seibler P, Graziotto J, Jeong H, Simunovic F, Klein C, Krainc D. Mitochondrial Parkin recruitment is impaired in neurons derived from mutant *PINK1* induced pluripotent stem cells. *J. Neurosci.* 31(16), 5970–5976 (2011).
- 73 Wood-Kaczmar A, Gandhi S, Yao Z *et al.* *PINK1* is necessary for long term survival and mitochondrial function in human dopaminergic neurons. *PLoS One* 3(6), e2455 (2008).
- 74 Jarecki J, Chen X, Bernardino A *et al.* Diverse small-molecule modulators of SMN expression found by high-throughput compound screening: early leads towards a therapeutic for spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 14(14), 2003–2018 (2005).
- 75 Kruman II, Pedersen WA, Springer JE, Mattson MP. ALS-linked Cu/Zn-SOD mutation increases vulnerability of motor neurons to excitotoxicity by a mechanism involving increased oxidative stress and perturbed calcium homeostasis. *Exp. Neurol.* 160(1), 28–39 (1999).
- 76 Klivenyi P, Ferrante RJ, Matthews RT *et al.* Neuroprotective effects of creatine in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Med.* 5(3), 347–350 (1999).
- 77 Groeneveld GJ, Veldink JH, van der Tweel I *et al.* A randomized sequential trial of creatine in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 53(4), 437–445 (2003).
- 78 Liu Y, Lacson R, Cassaday J *et al.* Identification of small-molecule modulators of mouse SVZ progenitor cell proliferation and differentiation through high-throughput screening. *J. Biomol. Screen.* 14(4), 319–329 (2009).
- 79 Desbordes SC, Placantonakis DG, Ciro A *et al.* High-throughput screening assay for the identification of compounds regulating self-renewal and differentiation in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2(6), 602–612 (2008).
- **Describes the first technical development to use human embryonic stem cells for high-throughput screening.**
- 80 Andrews PD, Becroft M, Aspegren A *et al.* High-content screening of feeder-free human embryonic stem cells to identify pro-survival small molecules. *Biochem. J.* 432(1), 21–33 (2010).
- 81 Borowiak M, Maehr R, Chen S *et al.* Small molecules efficiently direct endodermal differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 4(4), 348–358 (2009).
- 82 Greenbaum LE. From skin cells to hepatocytes: advances in application of iPSC cell technology. *J. Clin. Invest.* 120(9), 3102–3105 (2010).
- 83 Dambrot C, Passier R, Atsma D, Mummery CL. Cardiomyocyte differentiation of pluripotent stem cells and their use as cardiac disease models. *Biochem. J.* 434(1), 25–35 (2011).
- 84 Asai Y, Tada M, Otsuji TG, Nakatsuji N. Combination of functional cardiomyocytes derived from human stem cells and a highly-efficient microelectrode array system: an ideal hybrid model assay for drug development. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 5(3), 227–232 (2010).
- 85 Tanaka T, Tohyama S, Murata M *et al.* *In vitro* pharmacologic testing using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 385(4), 497–502 (2009).
- 86 Yokoo N, Baba S, Kaichi S *et al.* The effects of cardioactive drugs on cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 387(3), 482–488 (2009).
- 87 Behbahan IS, Duan Y, Lam A *et al.* New approaches in the differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells toward hepatocytes. *Stem Cell Rev.* 7(3), 748–759 (2011).
- 88 Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, Tomishima M, Sadelain M, Studer L. Highly efficient neural conversion of human ES and iPSC cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat. Biotechnol.* 27(3), 275–280 (2009).
- 89 McNeish J, Roach M, Hambor J *et al.* High-throughput screening in embryonic stem cell-derived neurons identifies potentiators of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate-type glutamate receptors. *J. Biol. Chem.* 285(22), 17209–17217 (2010).
- 90 Anson B, Nuwaysir E, Wang WB, Swanson B. Industrialized production of human iPSC-derived cardiomyocytes for use in drug discovery and toxicity testing. *BioPharm Int.* 24(3), 58–67 (2011).
- 91 Tropel P, Tournois J, Come J *et al.* High-efficiency derivation of human embryonic stem cell lines following pre-implantation genetic diagnosis. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 46(3–4), 376–385 (2010).
- 92 Mateizel I, De Temmerman N, Ullmann U *et al.* Derivation of human embryonic stem cell lines from embryos obtained after IVF and after PGD for monogenic disorders. *Hum. Reprod.* 21(2), 503–511 (2006).
- 93 Urbach A, Benvenisty N. Studying early lethality of 45,XO (Turner's syndrome) embryos using human embryonic stem cells. *PLoS One* 4(1), e4175 (2009).

- 94 Maehr R, Chen S, Snitow M *et al.* Generation of pluripotent stem cells from patients with Type 1 diabetes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106(37), 15768–15773 (2009).
- 95 Wang Y, Jiang Y, Liu S, Sun X, Gao S. Generation of induced pluripotent stem cells from human β -thalassemia fibroblast cells. *Cell Res.* 19(9), 1120–1123 (2009).
- 96 Soldner F, Hockemeyer D, Beard C *et al.* Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* 136(5), 964–977 (2009).
- 97 Kazuki Y, Hiratsuka M, Takiguchi M *et al.* Complete genetic correction of iPS cells from Duchenne muscular dystrophy. *Mol. Ther.* 18(2), 386–393 (2010).
- 98 Carvajal-Vergara X, Sevilla A, D'Souza SL *et al.* Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome. *Nature* 465(7299), 808–812 (2010).
- 99 Baek KH, Zaslavsky A, Lynch RC *et al.* Down's syndrome suppression of tumour growth and the role of the calcineurin inhibitor DSCR1. *Nature* 459(7250), 1126–1130 (2009).
- 100 Matsa E, Rajamohan D, Dick E *et al.* Drug evaluation in cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells carrying a long QT syndrome type 2 mutation. *Eur. Heart J.* 32(8), 952–962 (2011).
- 101 Yazawa M, Hsueh B, Jia X *et al.* Using induced pluripotent stem cells to investigate cardiac phenotypes in Timothy syndrome. *Nature* 471(7337), 230–234 (2011).

3.4. Modélisation pathologique de la DM1 à I-STEM

I-STEM est un laboratoire spécialisé dans l'utilisation des cellules souches pluripotentes pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour des maladies monogéniques. Trois grandes approches y sont développées, 1) La modélisation pathologique de maladies monogéniques par l'utilisation des hESC ou iPSC 2) L'utilisation des modèles pathologiques pour effectuer des criblages à visée thérapeutiques et 3) L'utilisation des cellules hESC et hiPSC pour des applications de thérapies cellulaires.

La DM1 est une des premières pathologies à avoir été étudiée au laboratoire, et le développement de nouveaux modèles cellulaires humains pour cette pathologie a été initié par le Dr Peschanski et le Dr Pietu. En 2005, le laboratoire I-STEM a obtenu, d'une collaboration avec le Dr Karen Sermon (Academisch Ziekenhuis Vrije Universiteit, Bruxelles-Belgique), trois lignées de cellules souches embryonnaires humaines porteuses de la mutation causale de la DM1 issues de trois DPI indépendants. Ces trois lignées de cellules hESCs pouvaient présenter un modèle d'autant plus intéressant qu'elles portaient différentes tailles de répétitions CTG (VUB03 :=1000CTG ; VUB19 :400CTG ; VUB24 :<2000CTG). Ces cellules ont été utilisées pour: 1) la modélisation pathologique pour la recherche de nouveaux marqueurs pathologiques et l'exploration de leurs mécanismes, ceci par une approche transcriptomique, 2) le criblage HTS de composés thérapeutiques sur les biomarqueurs connus comme les *foci* ou l'IR pour trouver de nouvelles « molécules médicaments » capables de reverser ces défauts (Figure 24). L'ensemble des travaux effectués au laboratoire a porté sur les lignées VUB03 et VUB24 dans la mesure où la lignée VUB19 ne présentait aucune anomalie associée à la DM1.

Mon projet de thèse, dirigé par le Dr Martinat, a porté sur la recherche de nouveaux « marqueurs pathologiques » et l'étude de leurs mécanismes pathologiques dans la DM1 à l'aide de ces nouveaux modèles cellulaires.

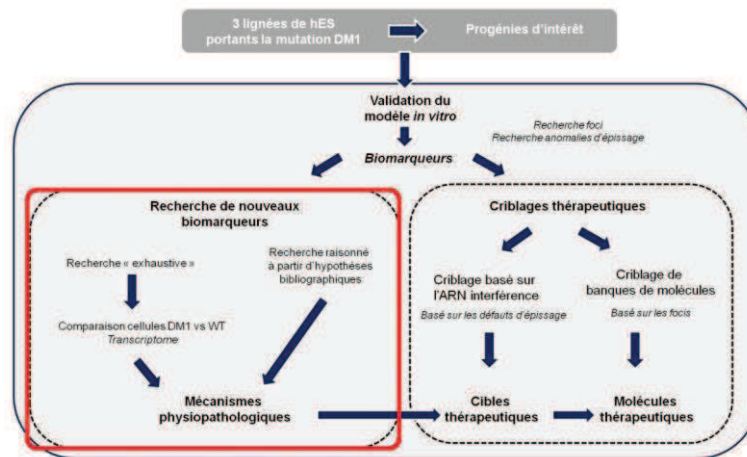


Figure 24 : Stratégie de mon projet de thèse à I-STEM

3.4.1. Dérivation de progéniteurs d'intérêts pour la DM1

Un des intérêts majeurs des hESC est de pouvoir suivre l'effet d'une mutation dans un type cellulaire d'intérêt. La DM1 étant une maladie neuromusculaire, les systèmes cellulaires idéaux seraient donc le système neural et le système musculaire. Pour cela, l'équipe du Dr Piétu a mis en place des protocoles de différenciation permettant la conversion des hESC en progéniteurs neuraux (NPC) et mésenchymateux (MPC) (Denis, Rochon-Beaucourt et al. 2011) puisqu'à ce jour le protocole de dérivation des hESC en cellules musculaires, sans modifications génétiques, est inconnu.

-MPC (Mesenchymal Progenitor Cell)

Les MPC possèdent les caractéristiques des cellules souches mésenchymateuse issues de la moelle osseuse. Cette population se présente sous la forme de cellules à la morphologie fibroblastique (Figure 25), très homogène et facilement amplifiable. Elle partage, avec les cellules MSC de la moelle osseuse, l'expression d'un certain nombre de marqueurs de surface incluant CD29, CD44, CD54, CD73, CD105 et CD166 ainsi que des protéines STRO-1 et SMA (*Smooth Muscle Actin*). Sur le plan fonctionnel, ces cellules ont un potentiel de différenciation vers les ostéocytes, les adipocytes et les cellules du muscle lisse (Delorme, Ringe et al. 2009). Le protocole de dérivation des hESC en MPC à I-STEM est décrit dans la figure 25. Brièvement, ce protocole consiste en l'arrêt des traitements nécessaires au maintien de la pluripotence et à la différenciation à l'aide de milieu riche en sérum.

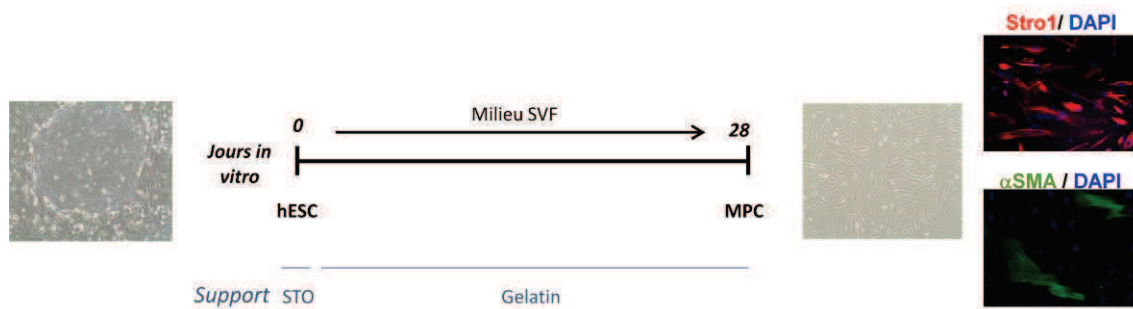


Figure 25: Protocole de différenciation des hESC en MPC

Les hESC cultivées en milieu KSR sur un support STO sont découpées manuellement et déposées sur de la gélatine dans un milieu riche en sérum (SVF) pendant 28 jours (Giraud-Triboult, Rochon-Beaucourt et al. 2011)

-NPC (Neural Precursor cells)

Les hESC peuvent être dérivées en progéniteurs neuraux en 30 jours, et nécessite une étape de différenciation intermédiaire, les rosettes neurales (formation d'un épithélium cylindrique organisé radialement). Ces structures contiennent des progéniteurs neuro-épithéliaux semblables aux progéniteurs du neuroépithélium cylindrique qui constituent, au cours de la 4^{ème} semaine du développement embryonnaire chez l'Homme, la plaque neurale puis le tube neural. Les rosettes neurales expriment des marqueurs neurectodermiques comme les facteurs de transcription PAX6 et SOX1 et sont compétentes pour répondre à des signaux développementaux leur permettant de se différencier en différents types de neurones et en cellules gliales (Perrier, Tabar et al. 2004; Li, Du et al. 2005). Le protocole de dérivation des hESC en NPC utilisé à I-STEM est décrit dans la figure 26.

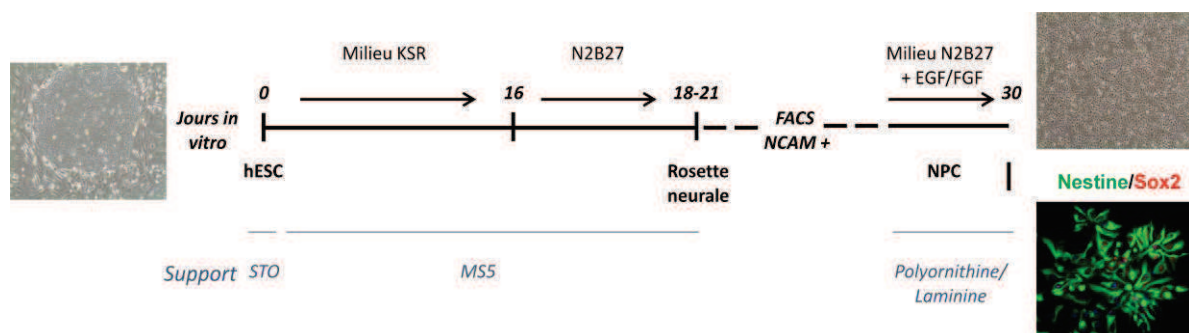


Figure 26 Protocole de différenciation des hESC en NPC

Les hESC cultivées sur un support STO sont découpées manuellement et posées sur des cellules stromales MS5 dans un milieu KSR. Après 16 jours le milieu est remplacé par du milieu N2B27 jusqu'à obtention des structures rosettes neurales. Les cellules sont triées sur la présence du marqueur NCAM par FACS et la fraction positive est posée sur Polyornithine/Laminine dans un milieu N2B27 riche en mitogènes EGF/FGF (Basé sur (Perrier, Tabar et al. 2004))

La deuxième étape de ce protocole nécessite un tri des rosettes neurales sur la présence du marqueur NCAM pour purifier les NPC. Ces cellules sont homogènes, facilement amplifiables, et se caractérisent par l'expression des marqueurs neuraux tels que SOX2, NCAM, SOX1, LHX2. Les NPC ont la capacité de se différencier en neurones et en cellules gliales (Denis, Rochon-Beaucourt et al. 2011).

3.4.2. Etude transcriptomique comparative

La relevance pathologique des hESC_DM1 et de leurs progénies (MPC et NPC) a été validée précédemment par la présence des biomarqueurs déjà décrits dans la DM1. Ainsi, les NPC et MPC dérivés d'hESC porteuses de la mutation DM1 présentent des *foci* co-localisés avec la protéine MBNL1. Associé à cette rétention nucléaire de MBNL1, les MPC présentent le défaut d'épissage du récepteur à l'insuline (Figure 27).

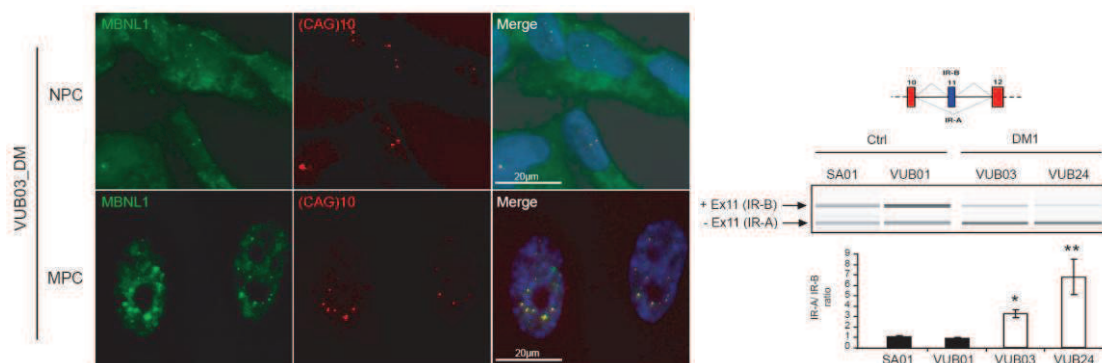


Figure 27 : Les NPC et MPC dérivés d'hESC DM1 présentent des marqueurs de la DM1

Hybridation *in situ* combiné à un immunomarquage montrant la colocalisation des transcrits mutants (rouge) et MBNL1 (vert) dans les MPC et les NPC DM1. Présence du défaut d'épissage de l'IR dans des MPC DM1. (Marteyn, Maury et al. 2011)

Afin de générer un profil d'expression différentielle entre les cellules contrôles et DM1, une analyse transcriptomique a été effectuée. Cette étude, basée sur l'utilisation de puces Affimetrix (« *Human Genome U133 plus 2.0 array* »), a permis l'établissement d'une liste de gènes différentiellement exprimés dans la DM1. Au total, sept gènes ont été validés comme étant sur-exprimés et huit gènes sous-exprimés dans les cellules DM1 (Tableau 12) (Marteyn, Maury et al. 2011).

Gene Downregulated in VUB03_DM							
Gene Title	Gene Symbol	Chromosome Number	Entrez Gene	Unigene	Fold Change hES	Fold Change NPC	Fold Change MPC
Zinc finger protein 37a (KOX 21)	ZNF37A	chr10	7587	Hs.292575	3.78	11.85	10.71
Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 5	PSMD5	chr9	5711	Hs.193725	8.34	3.21	
Zinc finger protein 248	ZNF248	chr10	57209	Hs.25275		54.62	
SLIT and NTRK-like family, member 4	SLITRK4	chrX	139065	Hs.272284		20.84	
EPH receptor A5	EPHA5	chr4	2044	Hs.479853			22.36
Paired related homeobox 1	PRRX1	chr1	5396	Hs.283416			9.22
Nicotinate phosphoribosyltransferase domain containing 1	NAPRT1	chr8	93100	Hs.493164			7.72
Ribosomal protein L31	RPL31	chr2	6160	Hs.518551			6.17
Gene Upregulated in VUB03_DM							
Gene Title	Gene Symbol	Chromosome Number	Entrez Gene	Unigene	Fold Change	Fold Change	Fold Change
Trafficking protein particle complex 3	TRAPPC3	chr1	27095	Hs.523131	2.61	3.20	
Cathepsin B	CTSB	chr8	1508	Hs.520898	2.09	3.17	
Maternally expressed 3	MEG3	chr14	55384	Hs.279815	8.79		90.57
NAD(P)H dehydrogenase, quinone 2	NQO2	chr6	4835	Hs.533050	5.16		3.08
Interleukin 13 receptor, alpha 1	IL13RA1	chrX	3597	Hs.496646		5.41	
Eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3 gamma, 52 kDa	EIF2S3	chr12	1968	Hs.539684		2.57	
Prickle-like 1 (<i>Drosophila</i>)	PRICKLE1	chr12	144165	Hs.524348	2.92		

Tableau 12 : Listes de gènes retrouvés dérégulés par le transcriptome différentiel DM1

Dès lors, l'équipe de mon encadrante, le Dr Martinat, s'est intéressée à comprendre les potentielles implications physiopathologiques de ces anomalies d'expression. Ma thèse a consisté à l'étude de deux d'entre elles : celle touchant l'expression d'un facteur de transcription à doigt de zinc, *ZNF37A* et celle affectant l'expression du gène codant le récepteur aux éphrines, *EphA5*, connu pour être impliqué dans les processus de guidance axonale et de plasticité synaptique. Ces deux parties seront détaillées dans deux articles (en révision pour *ZNF37A* et en préparation pour *l'EphA5*) dans le chapitre suivant.

Résultats

1. Identification d'un facteur de transcription à domaine Krab participant aux altérations myogéniques de la DM1

La première partie de ma thèse a porté sur l'étude de l'altération du gène *ZNF37A* dans les cellules DM1. Nous nous sommes intéressés à ce gène car son expression était fortement diminuée dans les cellules DM1 et ce, quelque soit leur état de différenciation. De plus, bien qu'aucune donnée n'existe sur ce gène et en particulier sur sa fonction, il fait parti d'un cluster de gènes qui présentent tous de fortes homologues de séquence avec les gènes codant pour les facteurs répresseurs de la transcription à domaine Krab. Nous avons validé la diminution spécifique de *ZNF37A* en comparant son expression aux autres ZNF du cluster dans une lignée possédant environ 1000CTG (appelé VUB03). De plus, nous avons confirmé la diminution d'expression de *ZNF37A* dans une autre lignée d'hESC porteuse de la mutation DM1 qui possède plus de 2000CTG (appelé VUB24). De façon intéressante, la diminution d'expression de *ZNF37A* ne semble pas être corrélée au nombre de répétitions. Nous avons également retrouvé cette anomalie à la fois dans des biopsies cérébrales de patients DM1 mais également dans des cultures primaires de myotubes issus également de patients.

Fort de ces résultats, mon travail a consisté dans un premier temps, à comprendre les mécanismes moléculaires par lesquelles la mutation DM1 entraînait cette diminution d'expression de *ZNF37A*. De par les mécanismes physiopathologiques connus dans la DM1, deux hypothèses étaient possibles: un défaut d'épissage alternatif ou une modification de la stabilité des transcrits *ZNF37A*. Nous avons démontré que la diminution de *ZNF37A* n'était pas liée à un défaut d'épissage mais plutôt à un défaut de stabilité de ses ARNm. En effet, le traitement des MPC contrôles et DM1 par l'Actinomycine D entraîne une dégradation plus rapide des transcrits *ZNF37A* au cours du temps dans le contexte DM1. Par ailleurs, l'hypothèse de l'épissage alternatif a été supprimée par une approche PCR qui n'a révélé aucune différence de séquence des transcrits *ZNF37A*. Afin de comprendre comment les transcrits étaient déstabilisés, nous avons étudié l'implication des protéines MBNL1 et CUGBP1 sur la région 5'UTR de *ZNF37A*, riche en motifs de fixation GU. Grâce à une construction contenant une partie de cette région sous le contrôle de la luciférase et la modulation d'expression de ces protéines, nous avons montré que l'instabilité semblait due à la protéine CUGBP1 puisque la surexpression de cette protéine entraîne une diminution de l'expression de la luciférase. Nous avons confirmé ces résultats en démontrant l'interaction physique entre CUGBP1 et la région 5'UTR de *ZNF37A* par la technique de retard sur gel.

Parallèlement, je me suis intéressée aux conséquences physiopathologiques de cette altération génique. Dans la mesure où la DM1 se caractérise principalement par une atteinte musculaire, nous avons voulu évaluer le rôle de *ZNF37A* dans le développement et le maintien du système musculaire. Pour cela, une approche de perte de fonction de *ZNF37A* a été développée à l'aide de siRNA dans des cultures primaires de myoblastes, obtenus d'une collaboration avec le Dr Furling (Institut de Myologie). La diminution de *ZNF37A* par un siRNA spécifique dans des myoblastes contrôle entraîne un défaut de myogenèse et plus particulièrement de fusion des myoblastes, similaire à celui observé à partir de myoblastes issus de patients DM1. Ces résultats ont été confirmés avec un deuxième siRNA dirigé contre *ZNF37A*.

Afin de comprendre par quels mécanismes la diminution d'expression de *ZNF37A* altérerait la myogenèse, nous nous sommes intéressées à ces potentielles fonctions. Comme mentionné précédemment, *ZNF37A* présente de fortes homologies de séquences avec les facteurs de transcription répresseur à domaine Krab. En effet, il possède deux domaines Krab ainsi que sept domaines à doigt de zinc pour se fixer à l'ADN. De plus, par immunomarquage et par western blot, nous avons montré que *ZNF37A* a une localisation principalement nucléaire, consistant avec une fonction de facteur de transcription. Afin de déterminer les cibles potentielles de *ZNF37A*, nous avons postulé que sa diminution d'expression devait aboutir à la surexpression de ses cibles. Ainsi, en croisant les listes de gènes sous et sur exprimés dans les cellules DM1, nous avons sélectionné le gène codant la sous-unité $\alpha 1$ du récepteur à l'IL13/IL4 (*IL13RA1*) comme une cible potentielle de *ZNF37A*. Ce gène nous est apparu d'autant plus intéressant que :

1) L'IL13 et l'IL4 partagent un récepteur hétéro-dimère, composé de la sous-unité *IL13R α 1* et la sous unité *IL4R α* . L'IL13 se fixe principalement à la sous-unité *IL13R α 1* tandis que l'IL4 passe préférentiellement par la sous unité *IL4R α* . Ces affinités ne sont pas exclusives puisque l'IL13 peut se fixer à la sous-unité *IL4R α* mais avec une affinité différente (Miloux, Laurent et al. 1997).

2) Des études récentes suggèrent fortement un rôle des cytokines IL13 et IL4 comme modulateurs de la myogenèse. En effet, le traitement de cultures primaires de myoblastes par l'IL13 et/ou l'IL4 aboutit à une augmentation du nombre de fibres de plus de 5 noyaux. De plus, un modèle de souris KO *IL4*^{-/-} présente des défauts myogéniques tels qu'une diminution de la taille et du nombre de noyaux par fibres musculaires. Suite à ces travaux, il a été proposé que l'IL4 serait sécrétée par les myotubes naïfs permettant le recrutement d'autres myoblastes

pour la deuxième phase de fusion (Horsley, Jansen et al. 2003). Parallèlement, il a été montré que l'IL13 pouvait augmenter la fusion des myotubes et ceci suite à une induction par l'IGF1 (*Insulin Growth Factor 1*), facteur connu pour provoquer une hypertrophie musculaire et intervenant dans la protection contre l'atrophie (Vandenburgh, Karlisch et al. 1991; Barton-Davis, Shoturma et al. 1998; Musaro and Rosenthal 1999; Semsarian, Suttrave et al. 1999). L'IL13 permettrait le recrutement des cellules réserves (cellules proches des cellules satellites en culture) pour augmenter la fusion musculaire (Jacquemin, Butler-Browne et al. 2007). De plus, il a été montré récemment que l'IL13 et l'IL4 modulaient positivement l'expression du marqueur d'adhésion VCAM1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*) dans des myoblastes de souris. Ceci suggère que l'IL13 et l'IL4 interviendraient dans la fusion musculaire en modifiant l'expression de protéines d'adhésion cellulaire (Gentile, Toietta et al. 2011).

Dans un premier temps, nous avons validé, par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine, que le facteur ZNF37A se fixait bien sur le promoteur de l'*IL13RA1*. Parallèlement, la diminution d'expression de ZNF37A, par une approche de siRNA, aboutit à une augmentation modérée de l'expression de l'*IL13RA1*, appuyant l'idée que ZNF37A pourrait participer à la modulation de l'expression de ce récepteur.

Confortant notre hypothèse, des cultures primaires de myoblastes DM1 ne répondent pas à un traitement avec un cocktail composé d'IL13 et d'IL4 alors que le même traitement entraîne une augmentation de la myogenèse *in vitro* sur des myoblastes contrôles. De façon intéressante, la diminution d'expression de ZNF37A par un siRNA dans des myoblastes contrôles entraîne également une perte de réponse de ces cellules au traitement par l'IL13/IL4, similaire à celle observée dans des myoblastes DM1.

Pour conclure, nous avons identifié un facteur de transcription ZNF37A dont l'expression est altérée dans un contexte DM1. Son mécanisme de régulation passerait par la protéine CUGBP1, altérée dans la DM1. Nous avons identifiés un des potentiels rôles physiopathologiques de ZNF37A dans la fusion des myoblastes qui semble relié à la modulation de l'*IL13RA1*.

1.1. Article 1 : “*A defective Krab-domain zinc finger transcription factor contributes to altered myogenesis in myotonic dystrophy type 1*”. Gauthier et al

A defective Krab–domain zinc finger transcription factor contributes to altered myogenesis in myotonic dystrophy type 1

Morgane Gauthier^{1,2}, Antoine Marteyn^{1,2}, Jérôme Denis^{1,2}, Karine Giraud-Triboult³, Sophie Aubert³, Camille Lecuyer³, Joelle Marie⁴, Denis Furling⁵, Christine Baldeschi^{1,2}, Geneviève Pietu^{1,2}, Marc Peschanski^{1,2} and Cécile Martinat^{1,2*}

¹ *INSERM UMR 861, I-Stem AFM, 91030 Evry Cedex, France;*

² *UEVE UMR 861 I-Stem AFM, 91030 Evry Cedex, France*

³ *CECS/I-Stem, AFM, 91030 Evry Cedex, France*

⁴ *Centre de Génétique Moléculaire, UPR2167, CNRS, 1 avenue de la Terrasse, 91198 Gif sur Yvette, France*

⁵ *UMR S 787/INSERM/UPMC-Institut de Myologie, 75634 Paris Cedex 13, France;*

* corresponding author; cmartinat@istem.genethon.fr

Running Title: Defective zinc finger transcription factor in DM1

Key words: human embryonic stem cells, myopathy, pathological modelling, zinc finger transcription factor

ABSTRACT

Myotonic Dystrophy type 1 (DM1) is an RNA-mediated disorder caused by a non-coding CTG repeat expansion that, in particular, provokes functional alteration of CUG-binding proteins. As a consequence, several genes with misregulated alternate splicing have been linked to clinical symptoms. In a search for additional molecular mechanisms that would trigger functional defects in DM1, we have taken the opportunity of mutant gene-carrying human embryonic stem cell lines to identify differentially expressed genes. Among the different genes found to be misregulated by DM1 mutation, one strongly downregulated gene encodes a transcription factor, ZNF37A. We show here that this defect in expression, which derives from a loss of RNA stability, is controlled by CUGBP1 and that it is associated to impaired myogenesis, a functional defect reminiscent of that observed in DM1. Loss of the ZNF37A protein results in changes in expression of the IL13RA1 subunit of the receptor for IL13, suggesting that pathological molecular mechanisms linking ZNF37A and myogenesis may involve that signalling pathway, which is known to promote myoblast recruitment during development and regeneration.

INTRODUCTION

Myotonic dystrophy type 1 (DM1), the most common form of adult-onset muscular dystrophy, is caused by an abnormal CTG repeat expansion in the 3' UTR (untranslated region) of the gene encoding a protein kinase (DMPK). This disease has a peculiar molecular basis as a large part of its symptoms are not directly due to a defect in the function of the mutant DMPK gene (Machuca-Tzili et al., 2005; Mahadevan et al., 1992). Instead, abnormalities are introduced in the processing of a variety of genes by an indirectly triggered defective activity of proteins involved in mRNA processing, due to the presence of the mutant DMPK RNA in the cell nucleus (Ranum and Cooper, 2006). The identification of RNA-binding proteins bound to the abnormal CUG repeat expansion pointed to an RNA gain-of-function model for DM1, and a number of changes in tissue-specific patterns of gene alternate splicing have been shown to contribute to particular symptoms in DM1 patients (Ranum and Cooper, 2006; Wheeler and Thornton, 2007).

In addition to those mechanisms, or as a secondary consequence of abnormal splicing in a signaling cascade, more recent studies have highlighted the existence of gene expression alterations in DM1 cells. Using differential transcriptomics, we have in particular identified 15 genes that exhibited up- or down-regulation in cells differentiated from stem cell lines derived from human embryos characterized as carrying the DM1 gene in a preimplantation genetic diagnosis procedure (Marteyn et al., 2011; Mateizel et al., 2006). How such changes in gene expression may contribute to the disease phenotype remains to be established. Within that framework, ZNF37A –one of the most down-regulated genes- has particularly attracted our attention because it was a potential transcription factor. Modification of expression of transcription factors by leaching from chromatin or other mechanisms have been described in DM1 and may provide a powerful explanation for broad gene expression changes, as revealed for the abnormal heart Nkx2.5 induction in a DM1 mouse model (Ebralidze et al., 2004;

Yadava et al., 2008). These findings also highlight the notion that the requirement for transcription factors in different tissues expressing the mutation might account for the multisystemic nature of DM1.

In the general framework of our search for new pathological mechanisms of DM1, we have built up on the identification of the expression defect of ZNF37A and explored its role in the DM1 pathophysiology. Derivatives of human ES cell lines have been exploited for that study, as they provide the dual advantage of the production of an unlimited amount of cells, due to their indefinite capacity at self-renewal, and the ability to differentiate into homogenous cell populations of discrete phenotypes (Maury et al., 2011). PGD permits, as a complement for such studies, to characterize precisely the genomic defect of the cell lines.

Our study reveals that the altered expression of the Krab-domain zinc-finger transcriptional repressor factor ZNF37A bears functional consequences in myogenesis. The myogenic function of ZNF37A may be related to its transcriptional effect on IL13RA1, the expression of which was also altered in our original transcriptomic analysis (Marteyn et al., 2011), as it is a sub-unit for the receptor to the myoblast recruitment factor IL13.

RESULTS

ZNF37A expression is specifically altered in cells with DM1 mutation

In our original transcriptomic analysis of cells differentiated from stem cell lines derived from embryos carrying a DM1 gene (data available at GEO Data Bank; accession number GSE721), *ZNF37A* was the most down-regulated gene of the list, with up to a 12 fold decrease on chips and up to a 120 fold decrease in real-time RT-PCR, independently of the stage and type of cell differentiation. This gene encodes a zinc finger protein that exhibits all the characteristics of the Krab-containing zinc-finger proteins family. *ZNF37A* belongs to a cluster of genes encoding members of that family, which is located in the pericentromeric region of the chromosome 10p11.2-10q11.2 (Figure 1A). Specific down expression of *ZNF37A* was confirmed (Figure 1B and 1C). Decreased expression was confirmed by *in situ* hybridization (Figure S1). At the protein level, similar results were obtained (Figure 1D-F), showing that *ZNF37A* was barely detected in DM1 hES-derived mesodermal progenitor cells (MPC), whereas the protein could be easily detected in the nucleus of control wild-type cells. A similarly gene expression defect was detected both in neural biopsies and human primary myotubes obtained from DM1 patients (Figure 1G).

DM1 affects ZNF37A expression through the CUGBP1 control of its mRNA stability

Molecular mechanisms linking this defect with DM1 were explored by analyzing first the hypothesis that stability of *ZNF37A* mRNA was compromised in diseased cells. Thus, Actinomycin D treatment resulted in a specific instability of *ZNF37A* mRNA in DM1 hES-derived MPC, as compared with control cells (Figure 2A), whereas no effect of the treatment was observed on *ZNF33A* and *ZNF37B*, two other genes of the same family that belong to the same chromosomal cluster located in the pericentromeric region of chromosome 10 (10p11.2-10q11.2, Figures 1A, 2A and S3).

The sequence of the 5' UTR region of the ZNF37A mRNA contains (GCU) and (GCC) repeats (Figure 2B), previously shown to be a CUGBP1 binding site. This observation, together with the fact that CUGBP1 function is known to be aberrant in DM1, suggested a link between CUGBP1 and the ZNF37A mRNA instability. This was confirmed using a luciferase reporter plasmid in which the 5'UTR_ZNF37A had been cloned upstream the luciferase gene under a CMV promoter (Figure 2B). Transient transfection of this construct in DM1 hES-derived MPC resulted in a statistically significant lower level of luciferase expression as compared with control cells (Figure 2C). Similar results were obtained in wild-type HEK 293 cells after co-transfection of the luciferase construct together with a plasmid expressing a DMPK minigene that contains an abnormally long stretch of 960 CUG repeats (Philips et al., 1998). The overexpression of CUGBP1 led to a similar reduction of the luciferase expression whereas the overexpression of MBNL1, another RNA binding protein known to be affected in DM1, had no effect (Figure 2D and Figure S3). Completing the demonstration that CUGBP1 controls the expression of ZNF37A by acting on a specific site in its 5'UTR, a close examination by gel shift of the 5'UTR of ZNF37A mRNA revealed a region on which CUGBP1 bound directly (Figure 2E and 2F).

The alternative hypothesis of a potential alternate splice site in the 5'UTR of ZNF37A was tested by inserting the construct in an inverse position, upstream of the luciferase gene. Similar results were obtained whatever the sense of the insertion (Figure S3), ruling out the hypothesis of an alternate splicing defect. This was further confirmed by the lack of effect of either CUGBP1 overexpression or the introduction of the construct carrying 960 CUG repeats on the alternate splicing of this region (Figure S3). Altogether, these results indicate that DM1 specific ZNF37A down expression is linked to a CUGBP1-dependent mRNA destabilization mechanism.

ZNF37A down expression results in an altered myogenesis that may involve the IL13 receptor alpha 1 sub-unit

In the search for a functional correlate of the defect in ZNF37A, its role was explored in muscle cell differentiation, the alteration of which is one of the main pathological features of DM1. Control myoblasts, transfected either with one of two different siRNA against ZNF37A or with control siRNA, were differentiated into myotubes. Specific down expression of ZNF37A resulted in altered myogenesis, similar to that DM1 observed with myoblast cells (Figure 3A-B, S2). Specificity of ZNF37A siRNA was validated by RT-PCR (Figure S2).

Mechanisms by which ZNF37A is involved in myogenesis were then explored. From its nuclear subcellular localization (Figure 1D-E) and its sequence analysis, ZNF37A exhibits all the characteristics of Krab-containing zinc-finger proteins, which generally function as transcriptional repressors (Urrutia, 2003). Accordingly, co-immunoprecipitation on nuclear fraction of control hES-derived MPC demonstrated a direct interaction of ZNF37A and Kap1, a common co-repressor of Krab-domain transcription factors (Figure S2).

It was, therefore, postulated that ZNF37A down-expression in DM1 cells might induce upregulation of its target genes in the same cells. Among the list of 7 up-regulated genes found in mutant cells in our original study (Marteyn et al., 2011), the one that encodes the $\alpha 1$ chain of the receptor to IL13 (IL13RA1) was especially appealing because its expression levels were inversely correlating those of *ZNF37A* in mutant hES cells and derivatives at all stages and types of differentiation (Figure 4A and Figure S2). IL13RA1 overexpression were also found in human primary myotubes from DM1 patients (Figure-4B). The knockdown of expression of *ZNF37A* by specific siRNA in wild-type H9 hES-derived MPCs led to an increased expression of *IL13RA1*, confirming its negative control (Figure 4C). As a control of the specificity of this effect, *ZNF37A*-directed siRNA had no effect on the expression level of eIF2S3, another gene upregulated in the mutant cells (Figure S2 and Table 1). Chromatin

immunoprecipitation directed against ZNF37A, followed by a quantitative PCR analysis with primers covering the entire *IL13RA1* promoter, revealed a potential binding site for ZNF37A that did not exist in the promoter region of eIF2S3 (Figure 4D).

IL13RA1 is part of the common receptor for IL4 and IL13, two cytokines that participate to the recruitment of myoblasts and the promotion of myogenic fusion (Horsley et al., 2003; Jacquemin et al., 2007). Whereas IL4/IL13 treatment increased the ability of wild-type myoblasts to mature into multinucleated myotubes, no effect of the treatment was observed in DM1 myoblasts (Figure 4E-F). A similar abnormal resistance to cytokine treatment was observed in wild-type myotubes after knocking down the expression of ZNF37A using specific siRNAs (Figure 4E-F), thus confirming a role of ZNF37A in the myogenic effect of IL4/IL13.

DISCUSSION

The main finding of this study is the demonstration that the decreased expression of the transcription factor ZNF37A is a consequence of the presence of the DM1 mutation, due to molecular mechanisms that involve an abnormal control of its mRNA stability by CUGBP1. The loss of ZNF37A protein in DM1 cells was shown to bear functional consequences for myogenesis. Other cell types and functions may additionally be impacted as expression of the factor is ubiquitous. Studies of RNA toxicity in DM1 have focused on the identification of misregulated genes on the basis of a “candidate gene” approach, starting from clinical symptoms they could be related to. Here, we underline the value of a complementary model, namely the combined analysis of global effects of the DM1 mutation on gene expression and cellular function in mutant gene-carrying human stem cell lines obtained from pre-implantation genetically diagnosed embryos.

The currently accepted pathological model of DM1 holds that manifestations result from alteration of two main proteins involved in pre-mRNA splicing, namely MBNL1, which is sequestered in the nucleus through its association with the repeat-containing mRNA (Mankodi et al., 2001), and CUGBP1, which is overexpressed and hyperphosphorylated in the nucleus of DM1 cells (Kuyumcu-Martinez et al., 2007). Recent studies have shown that DM1 pathological mechanisms may not all be explained directly by altered alternate RNA splicing. Osborne et al., suggested that RNA with a (CUG) expansion might interfere at both transcriptional and post-transcriptional levels by characterizing affected genes in a DM1 transgenic mouse model expressing 250 CUG repeats in 3' UTR of the skeletal actin mRNA (Osborne et al., 2009). In the same way, the misexpression of CUGBP1 may contribute to the alteration in muscle development in DM1 by affecting the translation efficiency of p21 via binding to a GC-rich sequence located within the 5' region of p21 mRNA (Timchenko et al., 2001; Timchenko et al., 1999). CUGBP1 may also act as a mRNA stabilizing factor

associated with short lived mRNAs (Vlasova et al., 2008) and contribute to muscle wasting in DM1 by affecting the decay of TNF mRNA in DM1 muscle cells (Zhang et al., 2008). . Altogether, these observations and our results concur to the conclusion that the function of CUGBP1 on the turnover of mRNA has a more extensive impact on DM1 pathogenesis than previously thought.

The DM1 mutation interferes with myogenesis but the exact mechanism of this phenomenon has not been clarified, yet (Amack and Mahadevan, 2004; Ranum and Cooper, 2006). IL13 and IL4 may be considered, however, as interesting candidates because of their role in myoblasts fusion during muscle development and regeneration (Horsley et al., 2003; Jacquemin et al., 2007; Lafreniere et al., 2006). It was, therefore, particularly interesting to observe that *ZNF37A* – the defect of which interfered with myogenesis -was found to modulate the expression of *IL13RA1* that encodes a receptor subunit that participates with *IL4RA* to the heterodimeric receptor for the IL4 and IL13 cytokines (Wills-Karp and Finkelman, 2008). *IL13RA1* expression also increases soon after muscle injury suggesting a role of this receptor during muscle regeneration (Goetsch et al., 2003). Increased expression of *IL13RA1* in DM1 cells as a consequence of a loss of expression of *ZNF37A* may, therefore, bear some significance for myogenesis and regeneration (Gomes-Pereira et al., 2007; Mankodi et al., 2000; Mastroiannopoulos et al., 2008; Thornell et al., 2009). Consistent with those suggestions, our results indicate that DM1 myoblasts do not respond as control cells to IL13/IL4 treatment in an in vitro model of myotubes maturation.

Involvement of a zinc-finger transcription factor in DM1 calls for a comparison with DM2, a myotonic dystrophy disorder characterized by CCUG mRNA expansions (Liquori et al., 2001) in another member of the same family, *ZNF9*. The clinical analogies between DM1 and DM2 have led to the suggestion of a common trans-acting mechanism with depletion of similar transcription factors (Cho and Tapscott, 2007). The observation that

haploinsufficiency for *Znf9* is associated with multiorgan abnormalities resembling myotonic dystrophy reinforces this notion (Chen et al., 2007; Raheem et al., 2010). It is therefore tempting to postulate that a common requirement for transcription factors in tissues expressing the mutant DMPK may account in part for some of the multisystemic symptomatology of DM1 (e.g., myotonia, myopathy, insulin resistance, cognitive impairment). In order to address that issue, it will be interesting to undertake a systematic search for target genes impacted by the loss of *ZNF37A* expression in DM1.

Most previous analyses of DM1 pathological mechanisms aimed at associating clinical symptoms and alteration of the processing of specific candidate proteins. These hypothesis-driven studies have unavoidably left out genes, the defect of which could not be directly linked to symptoms. We have started to provide a complementary list of genes that appear to be specifically modified by the presence of DM1 mutation by combining the use of DM1-mutant hES cells-derived progenies and a global gene expression profiling. Although validation of the exact mechanisms by which DM1 impacts these genes has yet to be brought, and the effect of their abnormal expression on cell metabolism must be defined, these genes are candidates for new pathological pathways associated to DM1. We previously demonstrated that this approach could be used to identify new physiopathological mechanisms implicated in the neuritogenesis and synaptogenesis of motoneurons (Marteyn et al., 2011). The present study confirms the usefulness of such a resource-driven approach based upon gene-carrying pluripotent stem cell lines. This study also highlights the potential offered by the use of disease-specific human pluripotent stem cells to decipher physiopathological mechanisms in a large spectrum of cell types, and therefore points out the added value of this approach for multisystemic diseases.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Mutants hES cell line (VUB03_DM, XX, passages p70-p90; and VUB24_DM; XX, passages p30-40, derived in AZ-VUB) and wild type human ES cells (H9, XX, passages 40–60; WiCell Research Institute; VUB01, XY, passages p80-90) were maintained as previously described (Lefort et al., 2008). Control and DM1 myoblasts (kindly gift by Dr.D.Furling) were cultured in D-MEM/F-12 medium (Invitrogen) supplemented with 20% SVF (Eurobio) and 0,1% of penicillin-streptomycin (Gibco). For differentiation, cells were switched to 2% SVF D-MEM/F-12 medium for 6 days. Neural and mesenchymal differentiation were performed as previously described (Denis et al., 2010; Marteyn et al., In press; Perrier et al., 2004).

DM1 tissues

DM1 myoblasts were obtained from quadriceps muscles biopsies (kindly gift by Dr. D. Furling). DM1 myoblasts presented >2000 repeats. The fetal brains RNA (kindly gift by Dr. G. Gourdon) were derived from fetuses aged from 12 to 25 amenorrhea weeks. DM1 samples were affected to different degrees (97-1500 CTG repeats).

Real Time - Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and Agilent DNA Chips analysis

Total RNA from cells was isolated by “RNeasy Mini Protocol” (Quiagen). cDNA was synthesized by using SuperScript III (Invitrogen). Quantitative real-time RT-PCR were optimized to determine the linear amplification range by using a Chromo4 Real-Time system (Bio-Rad) with Syber Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). For Agilent Chips analysis, PCR products were quantified using the DNA 1000 kit for the Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, France) according to the manufacturer's protocol. Primers are listed in Supplementary Table 1.

Actinomycin treatment

hES-derived MPC control (H9) and DM1 (VUB03_DM) were plated at 5×10^4 cells per well (70-80% confluency in 24-well plate) and were treated with $5 \mu\text{g/ml}$ of Actinomycin (Sigma) during 30min, 90min and 180min. Total RNA from cells was isolated as described above and quantitative real-time RT-PCR was performed.

Luciferase assays

Plasmid constructs were described in Supplementary Methods. HEK293 cells were plated at 2.5×10^4 cells/cm² in 96-wells plate in Alpha MEM medium supplemented with 10% SVF (Hyclone) and 1% Glutamax, 1% nonessential amino acids and 1% penicillin-streptomycin (Gibco). 24 hours after plating, the cells were co-transfected with 100ng of the 5'UTR_ZNF37A-luc, 250ng of pCTG(960 repeats), pCUGBP1 or pMBNL1 plasmids in OptiMEM medium using Lipofectamine™ LTX PlusReagent (Invitrogen) . 48h after transfection, the luciferase substrate was applied using Enduren™ Live Cell Substrate (Promega). Luminescence reading was performed using Analyst GT (Molecular Devices). For cell normalization, CellTiterGlo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega) was used.

Transient siRNA knockdown.

The sequences targeted by chemically synthesized siRNAs in transient knockdown experiments were as follows: Hs_ZNF37A_7 HP siRNA (Qiagen), Hs_ZNF37A_9 HP siRNA (Qiagen) and Silencer® Negative Control siRNA (Ambion, Applied Biosystems). MPC cells were plated at 5×10^4 cells per well (70-80% confluency in 24-well plate) and were transfected the day after with 10-40 nmol siRNA in OptiMEM medium by using LiporNAiMax (Invitrogen). Myoblasts were plated at 8×10^4 cells per well in 12-well plate. The day after, they were transfected with 10pmol siRNA in OptiMEM medium by using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) in differentiated medium. 48h after transfection, ARN were isolated and quantitative real-time RT-PCR was performed as described above to check the specific ZNF37A downexpression.

Immunocytochemistry

Cultured cells were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS and were incubated with the monoclonal antibody against ZNF37A (R&D System, 1/500) at 4°C for 12 h. Appropriate FITC-labeled secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch) were used. For myogenic characterization, cells were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS and were incubated with the monoclonal antibody MF20 (DSHB, 1/200) and Desmin (1/25 R&D System) at RT for 2h. Then cells were incubated with Monoclonal Cy3 and Cy2 and Dapi at RT for 2h. Images were captured using a fluorescent Zeiss microscope.

Chromatin Immunoprecipitation

Chromatin immunoprecipitation analyses were carried out as described (Dahl and Collas, 2008; Nelson et al., 2006). Briefly, genomic DNA and proteins were cross-linked by formaldehyde (1% final) and quenched with glycine 1M. Cells were sonicated 8 times to generate 100-1000bp DNA fragments. Before addition of antibody, 100ul of lysate was saved as the input sample. Either anti-acetyl H3, CT, pan A3S (Millipore, 5ug), monoclonal anti-ZNF37A (R&D system, 5ug), monoclonal anti-Isl2 or MAP2 (DSBH bank, 5ug) were incubated with lysates overnight at 4°C. Immune complexes were purified using Dyead beads (Invitrogen) and eluted at 100°C for 10 min. DNA was extracted using purification columns (Nalgene) and quantitative PCR were carried out and analysed as described in (Martinat et al., 2006) using primers described in supplementary table 1.

In vitro transcription and gel shift assay

RNAs for gel shift experiments were transcribed using a cap analogue and SP6 polymerase in the presence of α -³²P-[UTP]. RNA mobility shift assays were performed with growing range of recombinant CUGBP1 as indicated previously (Sauliere et al., 2006). Recombinant proteins were diluted in buffer D containing 0.5mg/ml bovine serum albumin. The reaction was incubated for 15min at 30 °C and the protein complexes were resolved by

electrophoresis on a 6% nondenaturing polyacrylamide gel (39/1), 0.5xTBE. RNA bands were quantified using a PhosphorImager (Molecular Dynamics)

Western Blot Analysis

For ZNF37A blots, nuclear and cytoplasm proteins were extracted using NEPER extraction kit (Pierce). For minigène experiments, proteins were extracted using RIPA buffer (Invitrogen). After lysis, proteins were quantified using BCA protein assay kit (Pierce). Proteins were loaded on NuPAGE 4-12% Bis Tris Gel (Invitrogen) and incubated with following antibodies: ZNF37A antibodies (1/500, Abnova), H3 PAN (1/1000 Millipore), β -Actin (1/50000 Sigma), MBNL1 (1/7000 kindly gift by Dr Furling), CUGBP1 (1/1000 Santa Cruz Biotechnology), ETR3 (1/1000 Santa Cruz Biotechnology)

IL13/IL4 treatment

Myoblasts were plated at 8×10^4 cells per well in 12-well plate. The day after, they were treated with 50ng/ml of IL13 and IL4 (R&D System) in differentiation medium. Medium was changed after 4 days, and cells were fixed at 6 days.

Statistical analysis

The data were processed using Prism5.0c. Values are reported as means \pm s.e.m. Comparisons between two groups were performed with a Student t test (ANOVA). For comparisons of more than 2 groups, "Bonferroni's Multiple Comparison Test" (one-way ANOVA) was performed.

Acknowledgements:

We thank Gillian Butler-Brown and Vincent Mouly, UMR S 787 Paris, France and Jack Puymirat at CHUQ, Quebec, Canada, for helpful discussions, Genevieve Gourdon INSERM U781, Paris, France for performing the CTG repeat analysis and the platform of Institut Curie, Paris for performing the DNA chips analysis, Nicolas Charlet, INSERM U596, Ullkirch, France for providing minigene plasmids, Karen Sermon, AZ-VUB Brussels, for providing the DM1 mutant ES cell lines and Noel Buckley, King's London College, UK for chromatin immunoprecipitation analysis. This work was supported in part by additional grants from MediCen (IngeCell program) and Genopole. MG has a fellowship from the French Ministry of Research and Higher Education. AM had a fellowship from the Regional Council Ile de France (StemPôle).

Figure 1- Gauthier et al.

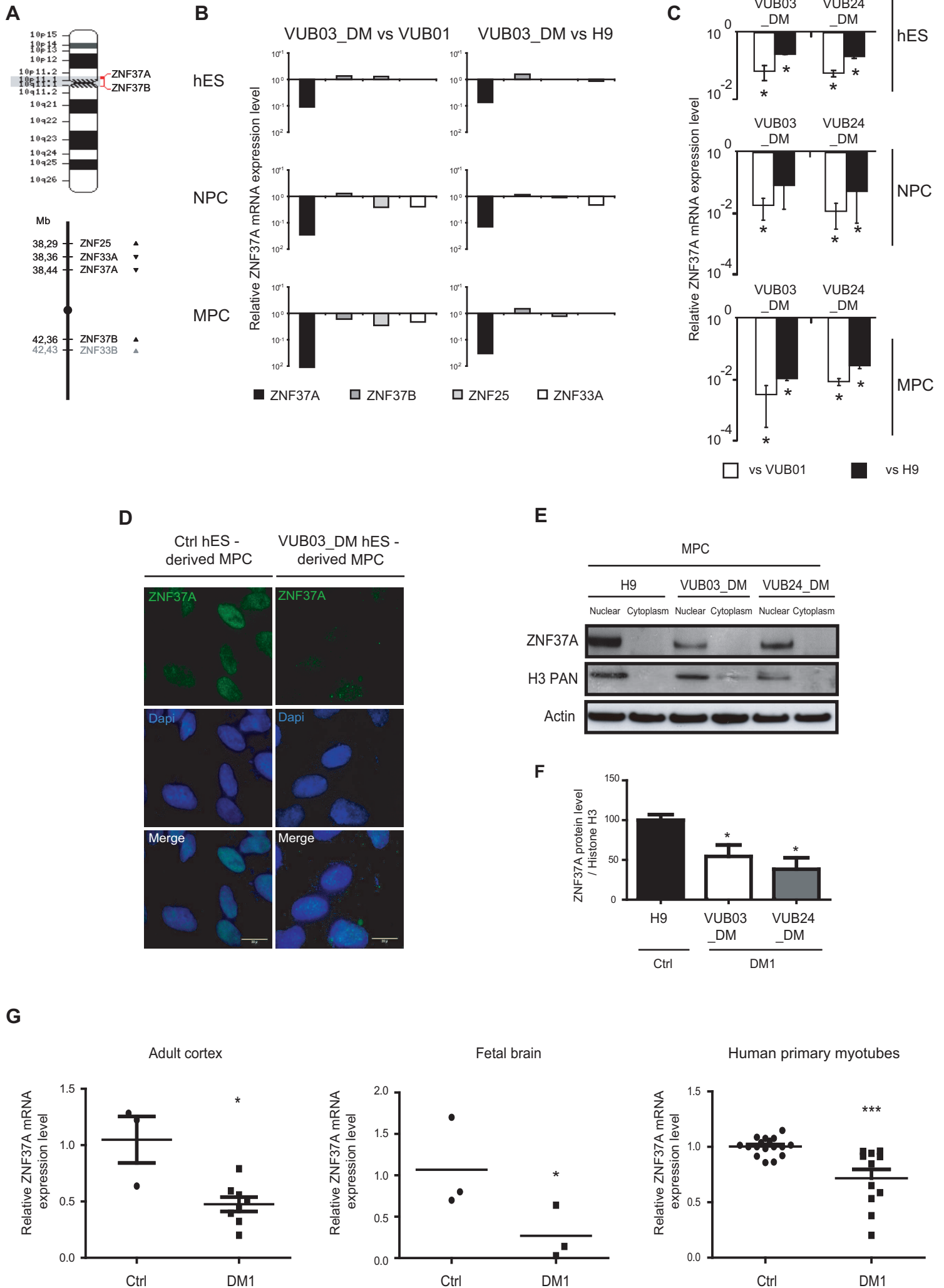
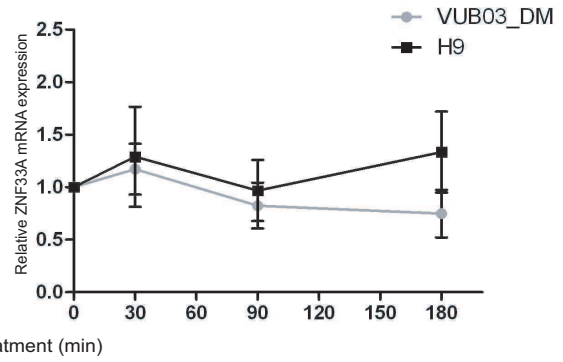
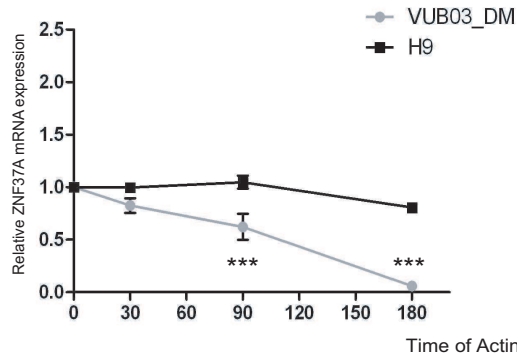
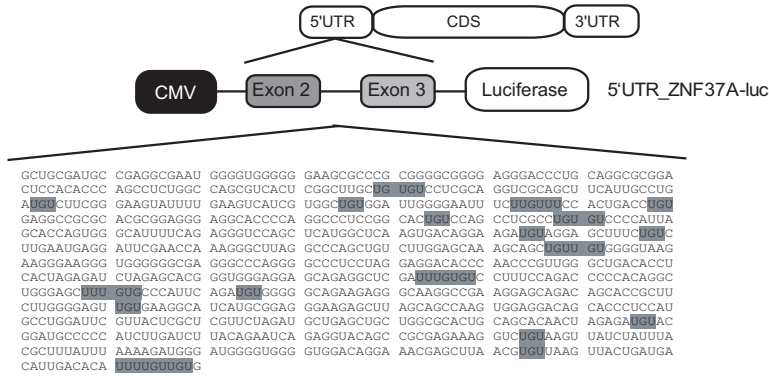


Figure 2- Gauthier et al.

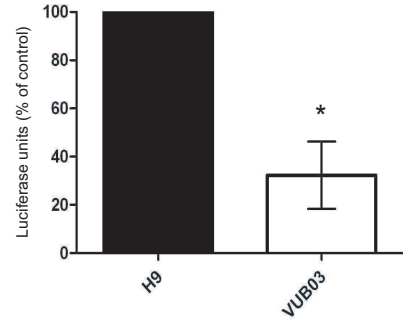
A



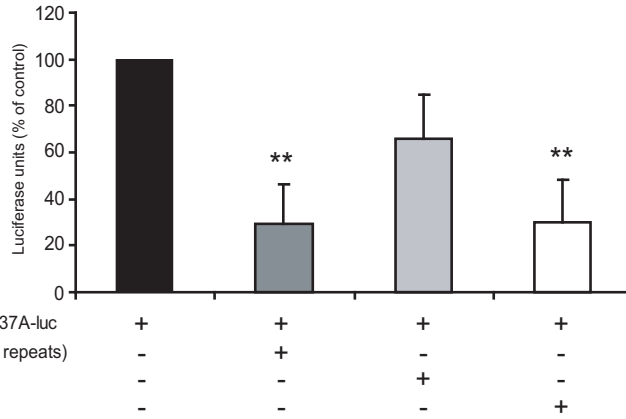
B



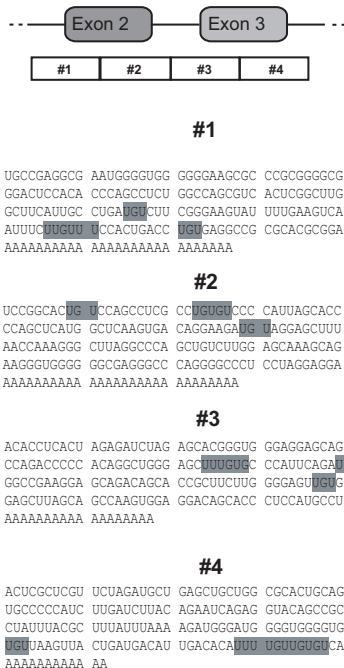
C



D



E



F

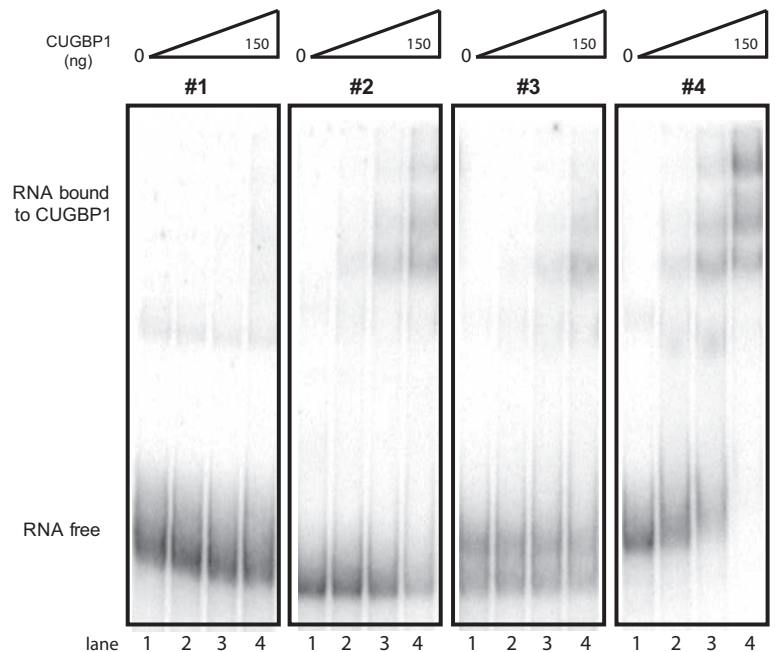
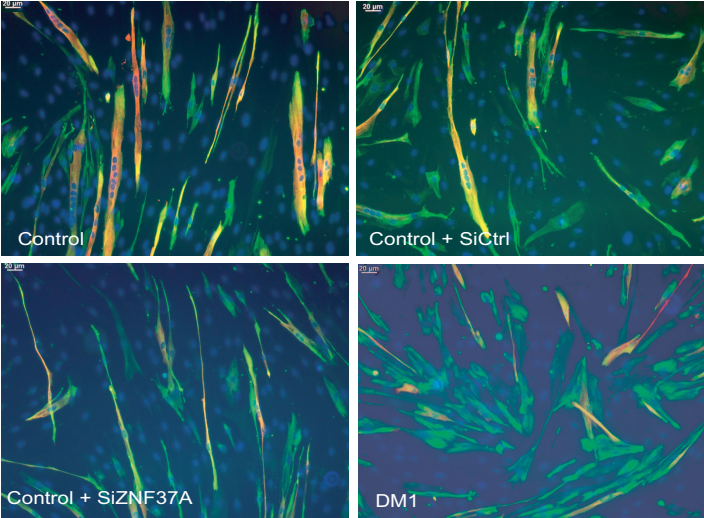


Figure 3- Gauthier et al.

A



B

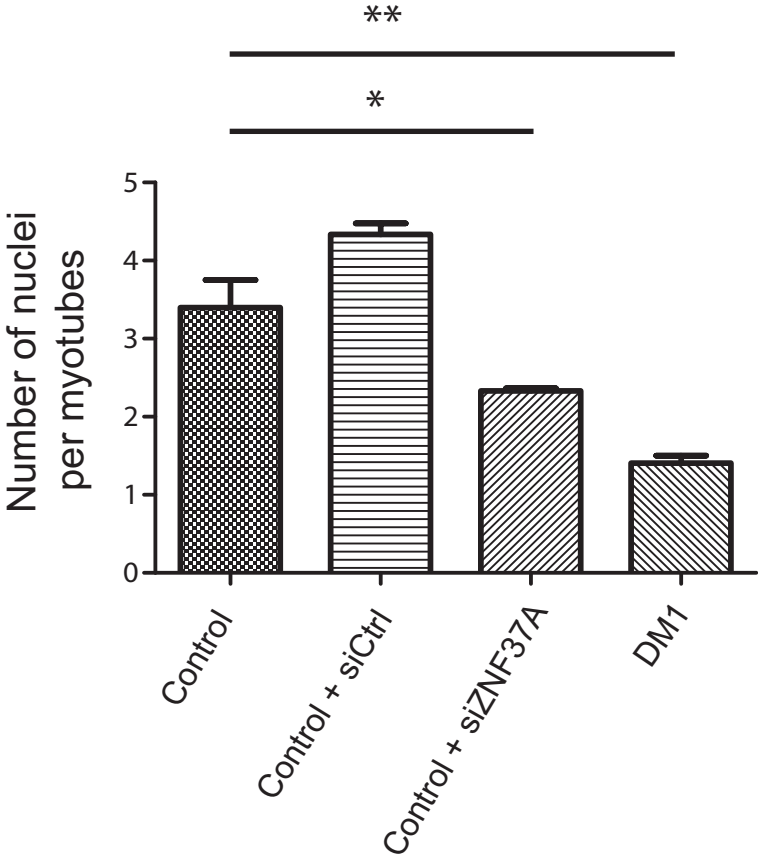
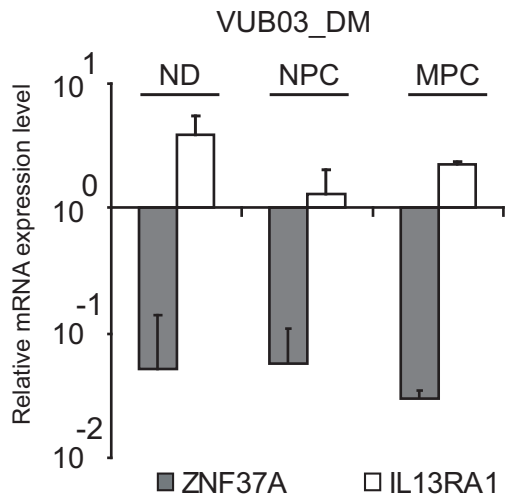
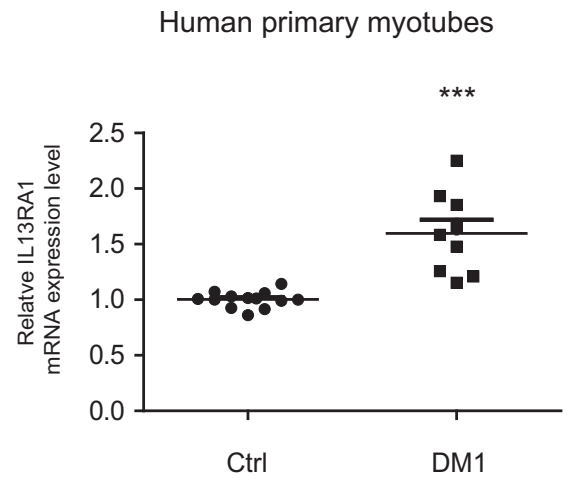


Figure 4 - Gauthier et al.

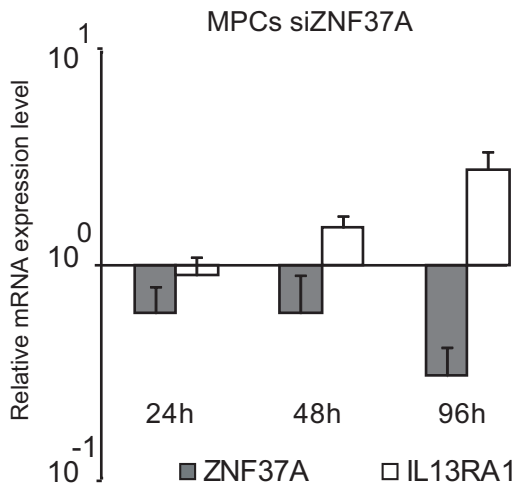
A



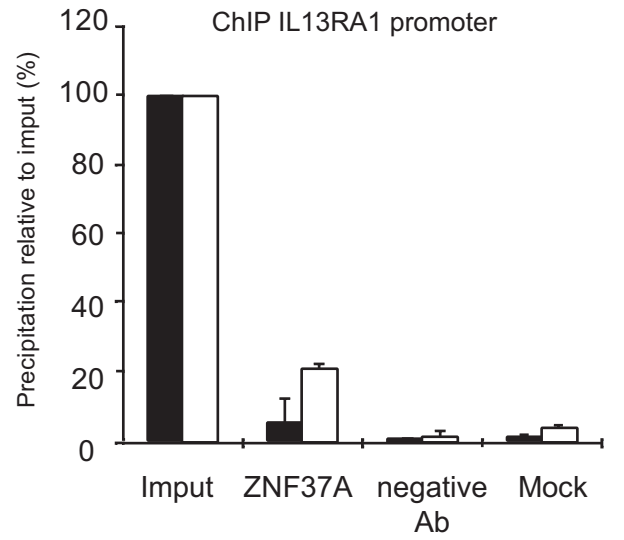
B



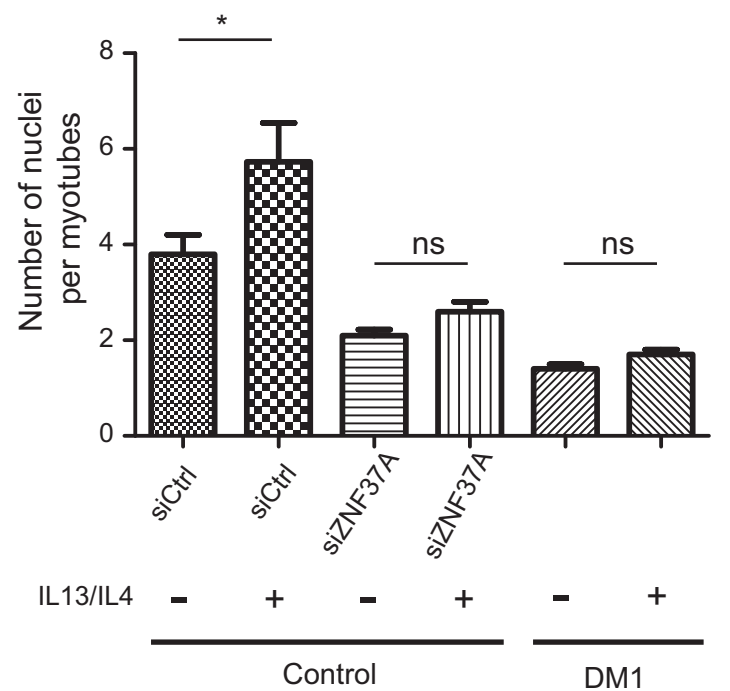
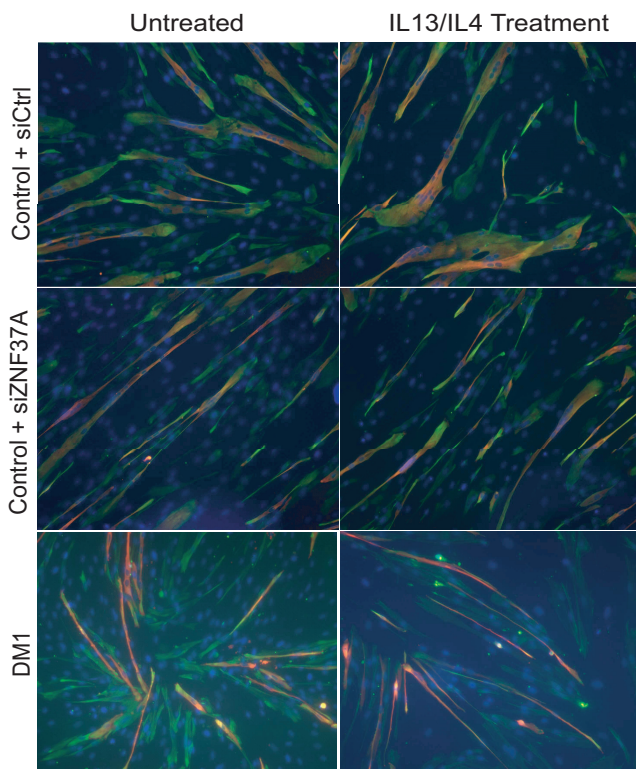
C



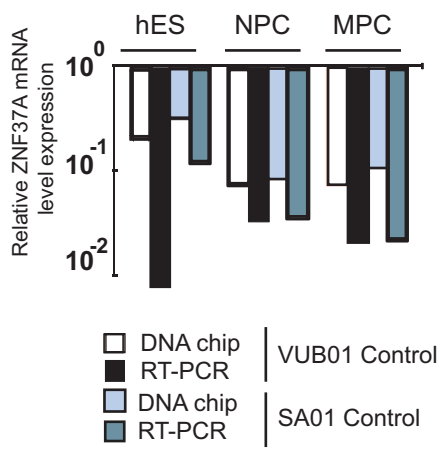
D



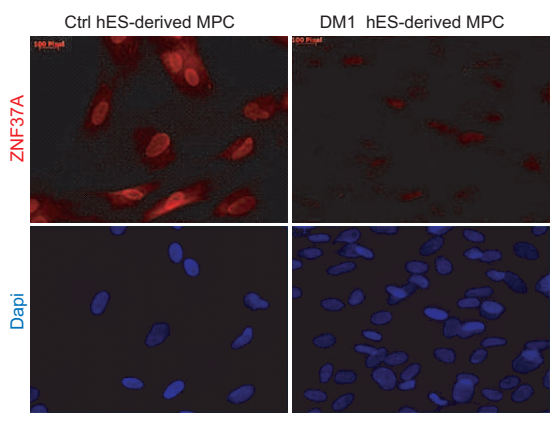
E

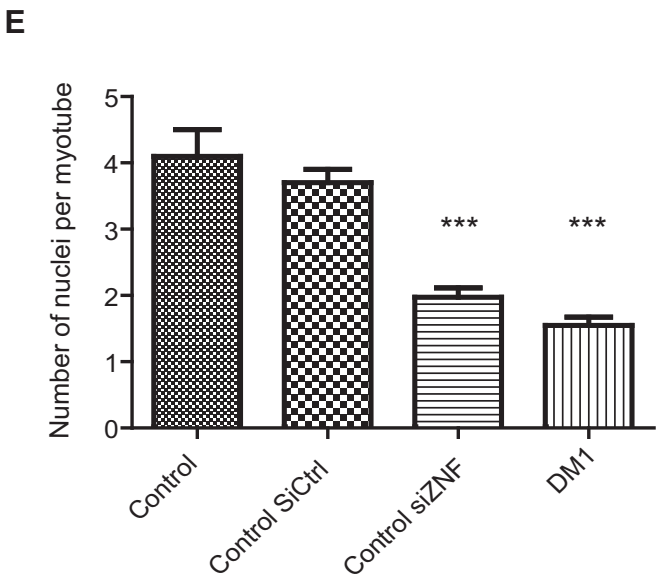
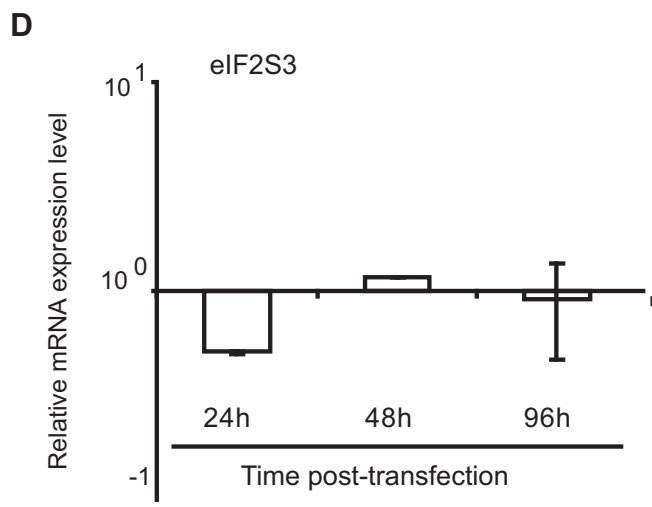
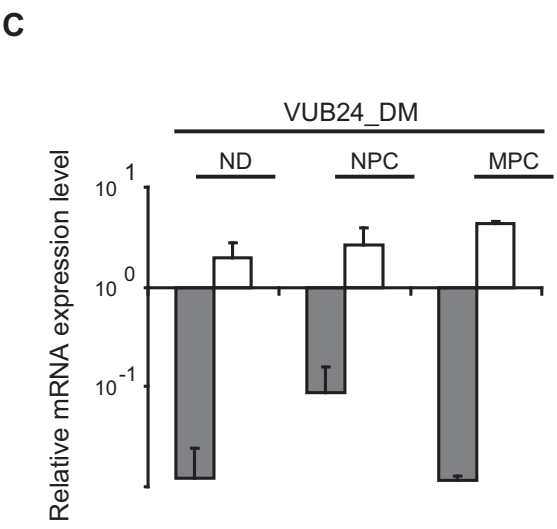
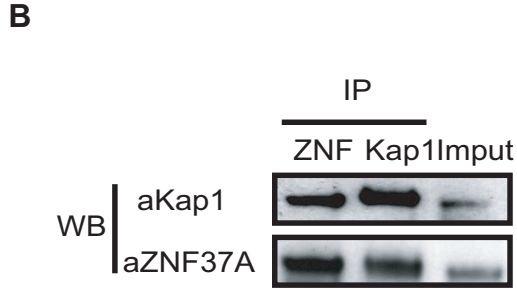
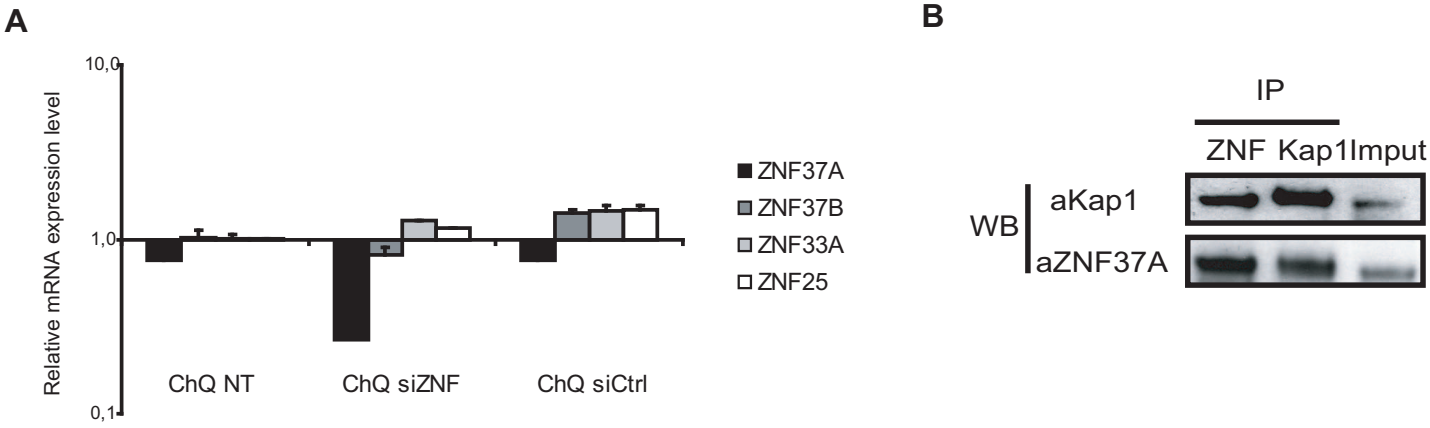


A

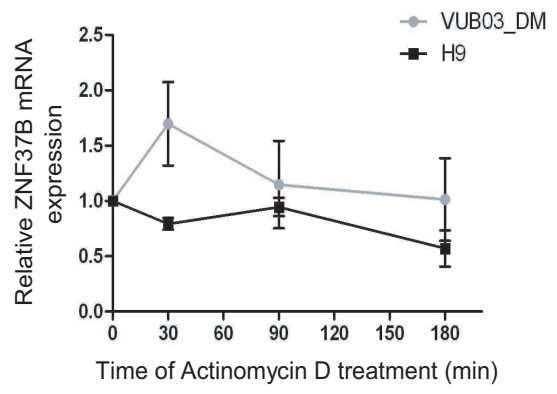


B

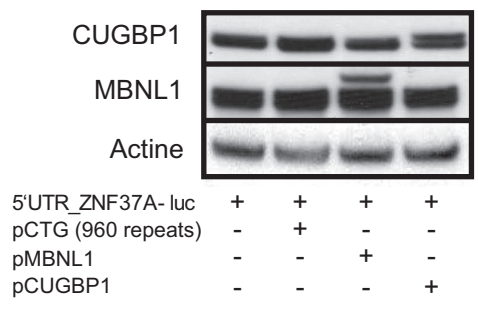




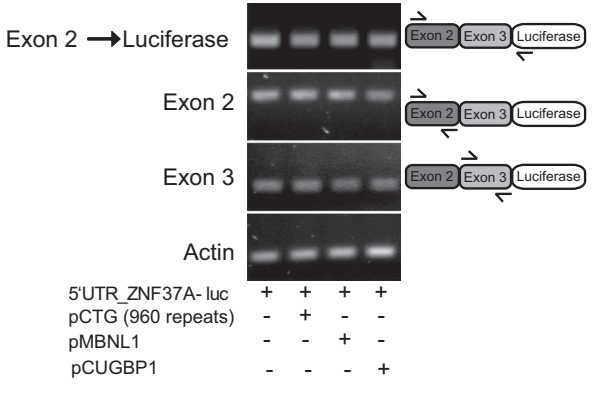
A



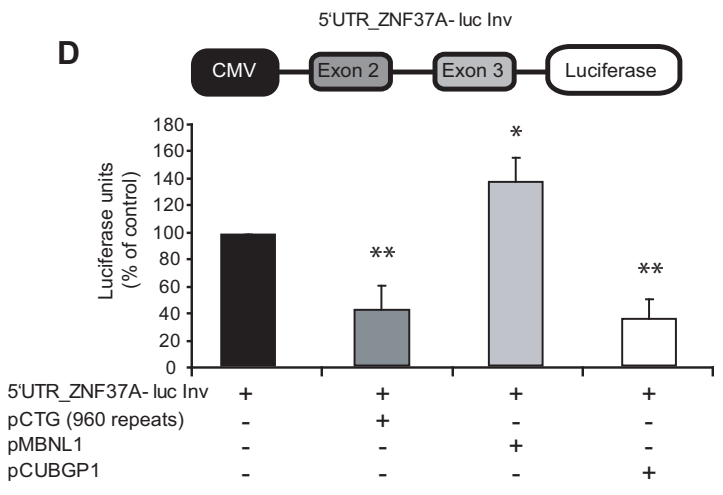
B



C



D



LEGENDS

Figure 1: *ZNF37A* is a transcription factor specifically down-regulated in DM1 hESC, its progeny and patients biopsies

(A) *ZNF37A* belongs to a genes cluster localized on the pericentromeric part of the chromosome 10. (B) Quantitative real time RT-PCR analysis of *ZNF37A*, *ZNF37B*, *ZNF33A* and *ZNF25* expression in mutated cell line VUB03_DM hES, NPC and MPC. Data were normalized with two different control hES cell lines (H9 and VUB01). (C) Quantitative real time RT-PCR analysis of *ZNF37A* expression in the two DM1 hES cell lines, independently of their differentiated state (hES, NPC and MPC). Data (n=3) are presented as values of the control VUB01 cell lines or H9 cell lines and were analysed by ANOVA followed by Student's t test. * $p \leq 0.005$. (D) *ZNF37A* nuclear localization by immunostaining on control hES-derived MPC (H9) compared to DM1 hES-derived MPC (VUB03_DM). Nuclei are stained with Dapi. Bar scale = 20 μ m. (E) Nuclear and cytoplasm western blot analysis of *ZNF37A* expression in DM1 hES-derived MPC (VUB03_DM and VUB24_DM) in comparison to the wild type cell line (H9). H3 PAN was used as a nuclear positive fraction control, actin was used as a loading control. (F) Quantification of *ZNF37A* protein level after western blot by using ImageJ software. Similar results were obtained with 10, 5, 2.5, 1.25 μ g of proteins loaded. Datas (n=3) were normalized with actin level and were analysed with a t test ANOVA, * $p < 0.0001$. (G) Quantitative real time RT-PCR analysis of *ZNF37A* expression in cerebral tissues from DM1 patients as well as in primary cultures of myotubes isolated from DM1 patients (results were normalized with the average of control samples). Datas are presented as scatter dot plot (line at mean) and were analysed with a t test, * $p < 0.05$.

Figure 2: *ZNF37A* mis-expression is due to mRNA instability modulated by CUGBP1.

(A) Quantitative real time RT-PCR of *ZNF37A* in DM1 hES-derived MPC treated with actinomycin D in comparison with control cells (H9). Data are presented as the mean \pm s.e.m (n= 3) and were analysed with a t test ANOVA, *** $p < 0.001$. (B) Schematic representation of 5'UTR_*ZNF37A*-luc constructs containing between the luciferase gene and under the control of CMV promoter the *ZNF37A*-5'UTR potential RNA-binding proteins motifs (highlight in grey). (C) Luciferase expression of 5'UTR_*ZNF37A*-luc construct after transfection in DM1 hES-derived MPC, as compared to controls. Normalization was done

with cell viability. Data are presented as the mean \pm s.e.m (n= 3) and were analysed with a t Test (ANOVA), * p< 0.05. **(D)** Luciferase expression of 5'UTR_ZNF37A-luc construct in HEK293 cells, cotransfected with the RNA-binding protein CUGBP1, MBNL1 and DMPK 3'-UTR containing 960 CUG repeats (pCTG). Normalization was done with cell viability. Data are presented as the mean \pm s.e.m (n= 3) and were analysed with a t-test (ANOVA), ** p< 0.001. **(E)** Design of 300 nt sequences in UGU rich region of ZNF37A 5'UTR named #1, #2, #3, #4. **(F)** Gel shift assay of CUGBP1 binding to the 4 different regions of ZNF37A 5'UTR. Increasing amounts of CUGBP1 protein were incubated with the different ZNF37A 5'UTR regions (lane 1:0 ng; lane 2:37,5ng; lane 3:75ng; lane 4:150ng).

Figure 3: Down expression of ZNF37A expression induces a myogenic differentiation impairment *in vitro*

(A) Immunostaining for myogenic markers 6 days later of specific ZNF37A siRNA transient transfection in control myoblasts. Desmin detects muscular population (green), MF20 detects differentiated myotubes (red) and Dapi (blue) labels nuclei. Scale bar =50 μ m. **(B)** Quantification of the myogenic impairment by measuring the number of nuclei per MF20 positive cells over the total number of nuclei. Data are presented as mean \pm s.e.m (n= 3) and were analysed with a "Bonferroni's Multiple Comparison Test" (oneway ANOVA), * p< 0.05, **p<0.001.

Figure 4: ZNF37A modulate myogenic differentiation through IL13RA1

(A) Quantitative real time RT-PCR of *ZNF37A* and *IL13RA* expression in DM1 hES cell lines (VUB03_DM) independently to the differentiated states (hES, NPC and MPC). **(B)** Quantitative real time RT-PCR of *IL13RA* expression in DM1 human primary myotubes (results normalized on the average of control samples). **(C)** Quantitative real time RT-PCR of *ZNF37A* and *IL13RA1* expression after siRNA-induced knock down in controls hES-derived MPC (H9). **(D)** Chromatin immunoprecipitation of ZNF37A on *IL13RA1* promoter. Example of results obtained with 2 primers pairs located differently on the *IL13RA1* promoter. Datas are expressed as percent precipitation relative to input (mean values \pm s.e.m, n=4). **(E)** Immunostaining of control and DM1 myoblasts treated with IL13/IL4 (50 ng/ml / 50ng/ml) at 6 days of differentiation. Desmin detects muscular population (green), MF20 detects differentiated myotubes (red) and Dapi (blue) labels nuclei. Scale bar =50 μ m. **(F)** Quantification of the myogenic impairment by measuring the number of nuclei per MF20

positive cells over the total number of nuclei. Data are presented as mean \pm s.e.m (n= 3) and were analysed with a "Bonferroni's Multiple Comparison Test" (oneway ANOVA), * p< 0.05.

Supplementary Figure 1: Validation of ZNF37A down expression in DM1.

(A) Correlation of ZNF37A down expression between DNA Chip and real-time RT-PCR for hES, NPC and MPC in VUB03_DM compared either with control VUB01 (white box, DNA Chip; black box, RT-PCR) and with SA01 (blue box, DNA Chip; dark blue box, RT-PCR). **(B)** *In situ* hybridization using a Dig-labelled ZNF37A probe confirms ZNF37A decreased expression in DM1 hES-derived MPC (VUB03_DM) as compared with control hES-derived MPC (VUB01). Nuclei are stained with Dapi. Scale bar = 100 μ m.

Supplementary Figure 2: Physiopathological mechanisms of ZNF37A

(A) Quantitative real time RT-PCR of ZNF37A and other ZNFs expression of transient transfection of ZNF37A specific siRNA in myoblasts after 48h in differentiation medium. **(B)** ZNF37A and Kap1 proteins co-immunoprecipitate in control hES-derived MPC (H9). **(C)** Quantitative real time RT-PCR of *ZNF37A* and *IL13RA1* expression in the other DM1 cell line (VUB24_DM). **(D)** Quantitative real time RT-PCR of eIF2S3 expression after transfection on control H9 hES-derived MPC. **(E)** Quantification of the myogenic impairment after transient siZNF37A transfection, by measuring the number of nuclei per MF20 positive cells over the total number of nuclei. Data are presented as mean \pm s.e.m (n= 3) and were analysed with a "Bonferroni's Multiple Comparison Test" (oneway ANOVA), *** p< 0.001.

Supplementary Figure 3: ZNF37A molecular mechanisms and functions

(A) Quantitative real time RT-PCR of *ZNF37B* expression after Actinomycin treatment in hES-derived MPC control (H9) and mutated (VUB03_DM). **(B)** Confirmation by western blot of the specific overexpression of MBNL1 and CUGBP1 after transfection of pMBNL1 and pCUGBP1 constructs. **(C)** Absence of splicing products from the 5'UTR_ZNF37A by RT-PCR analysis on HEK293 cells after transfection of the 5'UTR_ZNF37A-luc with combination of pCTG(960 repeats), pMBNL1, CUGBP1. Primers used amplified exon2 or exon3 or both, showing an absence of alternative splicing mechanism of this sequence. **(F)** Effect of DMPK 3'-UTR containing 960 CUG repeats and CUGBP1 on the luciferase expression in HEK293 cells when cotransfected with an inverted 5'UTR_ZNF37A-luc construct.

Amack, J. D., and Mahadevan, M. S. (2004). Myogenic defects in myotonic dystrophy. *Dev Biol* 265, 294-301.

Chen, W., Wang, Y., Abe, Y., Cheney, L., Udd, B., and Li, Y. P. (2007). Haploinsufficiency for *Znf9* in *Znf9*^{+/-} mice is associated with multiorgan abnormalities resembling myotonic dystrophy. *J Mol Biol* 368, 8-17.

Cho, D. H., and Tapscott, S. J. (2007). Myotonic dystrophy: emerging mechanisms for DM1 and DM2. *Biochim Biophys Acta* 1772, 195-204.

Dahl, J. A., and Collas, P. (2008). A rapid micro chromatin immunoprecipitation assay (microChIP). *Nat Protoc* 3, 1032-1045.

Denis, J. A., Rochon-Beaucourt, C., Champon, B., and Pietu, G. (2010). Global transcriptional profiling of neural and mesenchymal progenitors derived from human embryonic stem cells reveals alternative developmental signaling pathways. *Stem Cells Dev*. Ebraldze, A., Wang, Y., Petkova, V., Ebraldise, K., and Junghans, R. P. (2004). RNA leaching of transcription factors disrupts transcription in myotonic dystrophy. *Science* 303, 383-387.

Goetsch, S. C., Hawke, T. J., Gallardo, T. D., Richardson, J. A., and Garry, D. J. (2003). Transcriptional profiling and regulation of the extracellular matrix during muscle regeneration. *Physiol Genomics* 14, 261-271.

Gomes-Pereira, M., Foiry, L., Nicole, A., Huguet, A., Junien, C., Munnich, A., and Gourdon, G. (2007). CTG trinucleotide repeat "big jumps": large expansions, small mice. *PLoS Genet* 3, e52.

Horsley, V., Jansen, K. M., Mills, S. T., and Pavlath, G. K. (2003). IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth. *Cell* 113, 483-494.

Jacquemin, V., Butler-Browne, G. S., Furling, D., and Mouly, V. (2007). IL-13 mediates the recruitment of reserve cells for fusion during IGF-1-induced hypertrophy of human myotubes. *J Cell Sci* 120, 670-681.

Kuyumcu-Martinez, N. M., Wang, G. S., and Cooper, T. A. (2007). Increased steady-state levels of CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation. *Mol Cell* 28, 68-78.

Lafreniere, J. F., Mills, P., Bouchentouf, M., and Tremblay, J. P. (2006). Interleukin-4 improves the migration of human myogenic precursor cells in vitro and in vivo. *Exp Cell Res* 312, 1127-1141.

Lefort, N., Feyeux, M., Bas, C., Feraud, O., Bennaceur-Griscelli, A., Tachdjian, G., Peschanski, M., and Perrier, A. L. (2008). Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21. *Nat Biotechnol* 26, 1364-1366.

Liquori, C. L., Ricker, K., Moseley, M. L., Jacobsen, J. F., Kress, W., Naylor, S. L., Day, J. W., and Ranum, L. P. (2001). Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of *ZNF9*. *Science* 293, 864-867.

Machuca-Tzili, L., Brook, D., and Hilton-Jones, D. (2005). Clinical and molecular aspects of the myotonic dystrophies: a review. *Muscle Nerve* 32, 1-18.

Mahadevan, M., Tsilfidis, C., Sabourin, L., Shutler, G., Amemiya, C., Jansen, G., Neville, C., Narang, M., Barcelo, J., O'Hoy, K., and et al. (1992). Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science* 255, 1253-1255.

Mankodi, A., Logigian, E., Callahan, L., McClain, C., White, R., Henderson, D., Krym, M., and Thornton, C. A. (2000). Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science* 289, 1769-1773.

Mankodi, A., Urbinati, C. R., Yuan, Q. P., Moxley, R. T., Sansone, V., Krym, M., Henderson, D., Schalling, M., Swanson, M. S., and Thornton, C. A. (2001). Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2. *Hum Mol Genet* *10*, 2165-2170.

Marteyn, A., Maury, Y., Gauthier, M., Lecuyer, C., Denis, J., Pietu, G., Peschanski, M., and Martinat, C. (In press). Mutant human embryonic stem cells reveal neurite and synapse formation defects in Type 1 Myotonic Dystrophy. *Cell Stem Cell*.

Marteyn, A., Maury, Y., Gauthier, M. M., Lecuyer, C., Vernet, R., Denis, J. A., Pietu, G., Peschanski, M., and Martinat, C. (2011). Mutant human embryonic stem cells reveal neurite and synapse formation defects in type 1 myotonic dystrophy. *Cell Stem Cell* *8*, 434-444.

Martinat, C., Bacci, J. J., Leete, T., Kim, J., Vanti, W. B., Newman, A. H., Cha, J. H., Gether, U., Wang, H., and Abeliovich, A. (2006). Cooperative transcription activation by Nurr1 and Pitx3 induces embryonic stem cell maturation to the midbrain dopamine neuron phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 2874-2879.

Mastroiannopoulos, N. P., Chrysanthou, E., Kyriakides, T. C., Uney, J. B., Mahadevan, M. S., and Phylactou, L. A. (2008). The effect of myotonic dystrophy transcript levels and location on muscle differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* *377*, 526-531.

Mateizel, I., De Temmerman, N., Ullmann, U., Cauffman, G., Sermon, K., Van de Velde, H., De Rycke, M., Degreef, E., Devroey, P., Liebaers, I., and Van Steirteghem, A. (2006). Derivation of human embryonic stem cell lines from embryos obtained after IVF and after PGD for monogenic disorders. *Hum Reprod* *21*, 503-511.

Maury, Y., Gauthier, M., Peschanski, M., and Martinat, C. (2011). [Human pluripotent stem cells: opening key for pathological modeling]. *Med Sci (Paris)* *27*, 443-446.

Nelson, J. D., Denisenko, O., and Bomsztyk, K. (2006). Protocol for the fast chromatin immunoprecipitation (ChIP) method. *Nat Protoc* *1*, 179-185.

Osborne, R. J., Lin, X., Welle, S., Sobczak, K., O'Rourke, J. R., Swanson, M. S., and Thornton, C. A. (2009). Transcriptional and post-transcriptional impact of toxic RNA in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet*.

Perrier, A. L., Tabar, V., Barberi, T., Rubio, M. E., Bruses, J., Topf, N., Harrison, N. L., and Studer, L. (2004). Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 12543-12548.

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

Raheem, O., Olufemi, S. E., Bachinski, L. L., Vihola, A., Siritto, M., Holmlund-Hampf, J., Haapasalo, H., Li, Y. P., Udd, B., and Krahe, R. (2010). Mutant (CCTG)_n expansion causes abnormal expression of zinc finger protein 9 (ZNF9) in myotonic dystrophy type 2. *Am J Pathol* *177*, 3025-3036.

Ranum, L. P., and Cooper, T. A. (2006). RNA-Mediated Neuromuscular Disorders. *Annu Rev Neurosci*.

Sauliere, J., Sureau, A., Expert-Bezancon, A., and Marie, J. (2006). The polypyrimidine tract binding protein (PTB) represses splicing of exon 6B from the beta-tropomyosin pre-mRNA by directly interfering with the binding of the U2AF65 subunit. *Mol Cell Biol* *26*, 8755-8769.

Thornell, L. E., Lindstrom, M., Renault, V., Klein, A., Mouly, V., Ansved, T., Butler-Browne, G., and Furling, D. (2009). Satellite Cell Dysfunction Contributes To The Progressive Muscle Atrophy In Myotonic Dystrophy Type 1. *Neuropathol Appl Neurobiol*.

Timchenko, N. A., Cai, Z. J., Welm, A. L., Reddy, S., Ashizawa, T., and Timchenko, L. T. (2001). RNA CUG repeats sequester CUGBP1 and alter protein levels and activity of CUGBP1. *J Biol Chem* *276*, 7820-7826.

Timchenko, N. A., Welm, A. L., Lu, X., and Timchenko, L. T. (1999). CUG repeat binding protein (CUGBP1) interacts with the 5' region of C/EBPbeta mRNA and regulates translation of C/EBPbeta isoforms. *Nucleic Acids Res* 27, 4517-4525.

Urrutia, R. (2003). KRAB-containing zinc-finger repressor proteins. *Genome Biol* 4, 231.

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., and Bohjanen, P. R. (2008). Conserved GU-rich elements mediate mRNA decay by binding to CUG-binding protein 1. *Mol Cell* 29, 263-270.

Wheeler, T. M., and Thornton, C. A. (2007). Myotonic dystrophy: RNA-mediated muscle disease. *Curr Opin Neurol* 20, 572-576.

Wills-Karp, M., and Finkelman, F. D. (2008). Untangling the complex web of IL-4- and IL-13-mediated signaling pathways. *Sci Signal* 1, pe55.

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., and Mahadevan, M. S. (2008). RNA toxicity in myotonic muscular dystrophy induces NKX2-5 expression. *Nat Genet* 40, 61-68.

Zhang, L., Lee, J., Wilusz, J., and Wilusz, C. (2008). The RNA-binding Protein CUGBP1 Regulates Stability of Tumor Necrosis Factor mRNA in Muscle Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 283, 22457-22463.

2. Identification d'un nouveau défaut d'épissage associé à la DM1 affectant l'expression du récepteur aux Ephrines-A5 (EphA5)

La deuxième partie de ma thèse a porté sur la caractérisation d'un nouveau défaut d'épissage associé à la DM1 affectant l'expression du récepteur aux Ephrines-A5.

Historiquement, nous nous sommes intéressés à ce gène pour plusieurs raisons.

1) Les récepteurs aux éphrines, correspondant à la famille la plus large de récepteurs à tyrosine kinases, et leurs ligands participent à un large spectre de processus cellulaires dans la plupart des organes à la fois durant le développement mais également dans des étapes plus tardives de maturation tissulaire. Les Ephs sont classés en deux sous-familles, les EphA (A1-A10) et EphB (B1-B6) par le type de ligands capable d'interagir avec eux. De manière générale, les Ephrines-A se fixent préférentiellement aux EphA et les Ephrines-B se fixent aux EphB. Cette propriété n'est pas exclusive puisque des interactions interclasses sont possibles (Gale, Holland et al. 1996; Himanen and Nikolov 2003). A la différence d'autres récepteurs à tyrosines kinase, les ligands des Ephs sont eux-mêmes liés à la membrane cellulaire, les Ephrines-A sont accrochées à la membrane par une ancre GPI (glycophosphatidylinositol) et les Ephrines-B sont transmembranaires.

2) Parmi ces molécules, les EphA ont été plus particulièrement impliquées dans une grande variété de processus neuronaux comme le développement, la prolifération, la migration topographique cellulaire, la guidance axonale ainsi que la plasticité synaptique (Flanagan and Vanderhaeghen 1998; O'Leary and Wilkinson 1999; Cooke and Moens 2002; Martinez and Soriano 2005; Nicol and Gaspar 2008; Pasquale 2008). Bien que la DM1 ait été longtemps caractérisée comme une maladie principalement musculaire, de plus en plus d'études s'intéressent aux différentes affections associées à cette pathologie. En particulier, il existe un nombre croissant de preuves d'une affection du système nerveux central dans la DM1 incluant des altérations de la personnalité, des comportements schyzotypiques, une hypersomnolence, et même un retard mental pour les formes les plus sévères (de Leon and Cisneros 2008). Cependant, les bases moléculaires de ces affections restent encore peu connues. Des inclusions ribonucléoprotéiques contenant le facteur d'épissage MBNL1 ont été observées à la fois dans des biopsies cérébrales et dans des moelles épinières de patients adultes DM1 (Jiang, Mankodi et al. 2004; Wheeler, Krym et al. 2007). Consécutivement à ces observations, différents défauts d'épissages ont été décrits affectant l'expression des protéines

Tau, APP et de NMDAR1 (Jiang, Mankodi et al. 2004; Leroy, Wang et al. 2006; Dhaenens, Tran et al. 2011). Au niveau cellulaire, et bien que les mécanismes de ces altérations ne soient pas connus, des anomalies de plasticité synaptique ont également été décrites chez des patients DM1 et dans le modèle murin DMSXL (Wheeler, Krym et al. 2007; Panaite, Kielar et al. 2011). De plus, l'étude transcriptomique réalisée sur les hESC-DM1 avait permis d'identifier des altérations d'anomalies de gènes SLITRK, impliqués dans l'arborisation neuritique (Marteyn, Maury et al. 2011).

3) Ce gène était sorti dans la liste du transcriptome pour être sous exprimé dans les MPC. Bien que nous ayons validé ce résultat par RT-qPCR, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à cette classe de récepteur au niveau du système nerveux central de par leur rôle important dans le développement et le maintien de ce tissu.

Pour cela, l'expression des récepteurs EphA possédant des variants d'épissage alternatif, selon la base de données NCBI, a été quantifiée par RT-qPCR sur des biopsies corticales de patients DM1 (obtenus en collaboration avec les Dr. Gomez-Pereira et Gourdon, INSERM U781). Un défaut d'expression du récepteur aux Ephrines-A5 a été ainsi identifié. Ce gène, comprenant 18 exons, est décrit dans les banques de données NCBI pour avoir deux variants, différant par la présence de l'exon 9. Ce dernier est composé de 66 nucléotides et code pour une séquence protéique localisée juste sous le domaine transmembranaire.

Une augmentation spécifique de l'expression, et plus particulièrement de l'isoforme contenant l'exon 9, est observée dans des biopsies de cortex de patients DM1. Les défauts d'épissage associés à la DM1 correspondent généralement à un maintien anormal de l'isoforme fœtale (Buj-Bello, Furling et al. 2002; Charlet, Savkur et al. 2002; Jiang, Mankodi et al. 2004; Kalsotra, Xiao et al. 2008). L'analyse de l'expression de l'isoforme contenant l'exon 9 de l'EphA5 dans des biopsies cérébrales de patients DM1 adultes et fœtales ne confirme pas le maintien de la forme fœtale versus la forme adulte. Ces résultats ont été confirmés dans le modèle murin sévère de la DM1, le modèle DMSXL, caractérisé par la présence de plus de 1000 répétitions CTG (Gomes-Pereira, Foiry et al. 2007). Il est intéressant de noter que deux autres altérations d'épissage associés à DM1 et ne respectant pas cette règle du maintien de la forme fœtale concernent des gènes exprimés au niveau du système nerveux central, Grin1 et Tau (Dhaenens, Schraen-Maschke et al. 2008; Suenaga, Lee et al. 2012) suggérant l'implication potentielle de protéines d'épissages ou de mécanismes similaires.

Afin de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans ce défaut d'épissage, un minigène a été construit. Ce minigène contient l'exon 9 ainsi que les parties adjacentes des introns correspondants. La co-transfection de ce minigène avec des plasmides exprimant MBNL1, CUGBP1 et ETR3 indiquent que la présence du facteur ETR3 est suffisante pour induire l'augmentation de l'inclusion de l'exon9.

L'ensemble de ce travail nous a permis d'identifier un nouveau défaut d'épissage associé à la DM1. Bien que les conséquences physiopathologiques de cette anomalie restent à déterminer, de par les fonctions connues du récepteur EphA5, cette altération pourrait être impliquée dans certains troubles du système nerveux central de la DM1.

Ces résultats sont présentés sous la forme d'un manuscrit qui est en cours de préparation. En particulier, différentes expériences sont actuellement développées au laboratoire pour :

1) Mieux caractériser les mécanismes moléculaires par lesquels la mutation DM1 affecte l'inclusion de l'exon 9. En particulier, nos expériences ne permettent pas de conclure quant au potentiel rôle du facteur MBNL1 dans la régulation de cet épissage. Pour cela, l'effet de la perte de fonction de MBNL1, à l'aide de siRNA, sur l'inclusion de l'exon 9 sera étudiée.

2) Comprendre les conséquences physiopathologiques de cette anomalie d'expression.

La question des conséquences pathologiques de nos résultats reste le point essentiel à étudier. La fonction du récepteur EphA5 a été plus particulièrement étudiée dans la guidance axonale et la plasticité synaptique durant le développement (Cheng, Nakamoto et al. 1995; Yue, Chen et al. 2002). Ce récepteur et son ligand agissent comme des signaux répulsifs empêchant les axones d'entrer dans des territoires inappropriés (Wilkinson 2001)

Au niveau cellulaire, la fixation du ligand Ephrines-A5 sur des neurones exprimant le récepteur aboutit à différentes conséquences en fonction du type cellulaire. Il a ainsi été montré que cette interaction entraîne l'inhibition de la pousse neuritique de neurones de l'hippocampe, du striatum et de la rétine alors que cette même interaction résulterait, en tout cas *in vitro*, en une augmentation de l'arborisation neuritique des neurones sympathiques (Gao, Zhang et al. 1996; Gao, Yue et al. 1998; Brownlee, Gao et al. 2000; Gao, Sun et al. 2000). L'expression chez des souris d'un mutant négatif du récepteur EphA5, forme tronquée du récepteur ne possédant plus la partie intracellulaire contenant le domaine tyrosine kinase, aboutit à des anomalies de la topographie des projections neuronales de l'hippocampe et de l'hypothalamus conduisant à des troubles comportementaux des animaux (Yue, Chen et al.

2002; Mamiya, Hennesy et al. 2008). Le récepteur EphA5 et son ligand ont également été impliqués dans la mise en place de la synaptogenèse au niveau de l'hippocampe (Akaneya, Sohya et al. 2010). Cette étude suggère que l'interaction du ligand au récepteur EphA5 induirait l'expression des complexes synaptiques PSD-95/NMDA ainsi qu'une maturation morphologique des épines dendritiques. Les mécanismes par lesquels l'interaction du ligand au récepteur EphA5 résulte en une altération de la croissance neuritique ainsi qu'une modification de l'activité synaptique ne sont pas encore bien compris. Il semblerait que l'interaction du récepteur EphA5 à son ligand aboutisse en une modification du cytosquelette d'actine dans le cône de croissance. De plus, il a été montré que cette interaction pourrait activer le facteur de transcription CREB résultant en des modifications d'activités transcriptionnelles (Akaneya, Sohya et al. 2010).

Comme les autres récepteurs à tyrosine kinase, les Ephs sont activés par la fixation de leurs ligands, nécessitant un contact cellule-cellule. Lorsque le ligand se fixe au récepteur, leurs domaines Nter vont former des dimères puis des agrégats au site de contact (Himanen, Rajashankar et al. 2001). Ce *clustering* des complexes Eph/Ephrines est augmenté grâce à leurs domaines intracytoplasmiques FN3, SAM et PDZ (Lackmann, Oates et al. 1998; Stapleton, Balan et al. 1999; Thanos, Faham et al. 1999). L'interaction Eph/Ephrines entraîne donc une autophosphorylation du récepteur (Kalo and Pasquale 1999) qui résulte en l'activation du domaine kinase et l'apparition de sites d'ancrage pour les molécules des voies de signalisation Rho Kinases. Cependant des protéines telles que la PI3K et certaines protéines GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) de la famille des Rho interagissent avec le récepteur indépendamment de sa phosphorylation.

Cette interaction est cependant plus complexe puisqu'elle entraîne une stimulation bidirectionnelle (Figure 28), c'est-à-dire à la fois du côté du récepteur (appelé signal *forward*) et du côté ligand (appelé signal *reverse*) (Kullander and Klein 2002; Pasquale 2008).

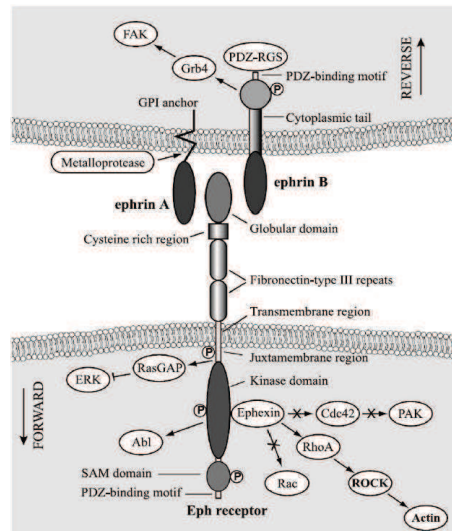


Figure 28 : Voie de signalisation des récepteurs aux Ephrines

(Huot 2004)

Aucune donnée n'existe dans la littérature concernant une potentielle différence d'activité du récepteur EphA5 en fonction de la présence ou non de l'exon9. Les domaines tyrosine kinases ainsi que les autres domaines ne sont pas affectés par cette modification. Cependant, nous avons obtenus des données préliminaires suggérant que l'inclusion de l'exon 9 résulterait en une modification structurale du domaine intracellulaire du récepteur qui pourrait ainsi modifier l'accessibilité de ces domaines.

Nous testons actuellement cette piste en étudiant la voie de signalisation du récepteur EphA5. Différentes protéines appartenant à cette voie et leur état de phosphorylation ont été vérifiées par Western Blot et les premiers résultats ne démontrent pas d'altérations majeures (Figure 29).

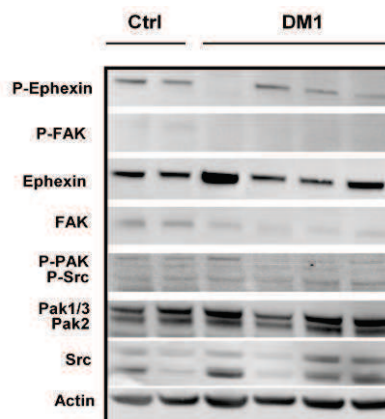


Figure 29: Premières observations de la voie de signalisation de l'EphA5 dans des biopsies corticales de patients DM1

Western blot des protéines de la voie de signalisation de l'EphA5 et leur état de phosphorylation, réalisé sur des échantillons protéiques de cortex de patients (2 Ctrl et 4 DM1).

Une étude in vitro est actuellement en cours au laboratoire afin d'étudier cette voie de signalisation après stimulation du récepteur EphA5 avec son ligand. Pour cela, nous avons mis en place des cultures de neurones cholinergiques issus des lignées hESC-DM1 dans lesquelles l'anomalie d'expression de l'EphA5 est retrouvée (Figure 30). Ce système cellulaire nous permettra également d'évaluer l'expression de l'isoforme contenant l'exon 9 sur l'arborisation neuritique.

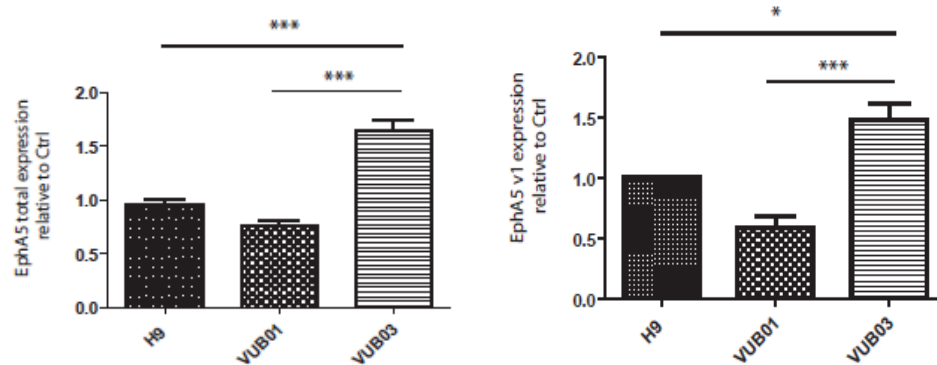


Figure 30: Défaut d'expression de l'EphA5 et de son variant 1 dans des neurones cholinergiques issus de la lignée hESC-DM1 (VUB03 DM)

2.1. Article 2 : “*Abnormal expression of the axonal guidance cue Ephrin-A5 receptor in Myotonic Dystrophy Type 1*”.Gauthier *et al*

Abnormal expression of the axonal guidance cue Ephrin-A5 receptor in Myotonic Dystrophy Type1

Morgane Gauthier^a, Mario Gomez-Pereira^b, Antoine Marteyn^b, Christine Baldeschi^a, Geneviève Piétu^a, Geneviève Gourdon^b, Marc Peschanski^a, and Cécile Martinat^{a*}

^a INSERM/UEVE U-861, I-STEM, AFM, Institute for Stem cell Therapy and Exploration of Monogenic diseases, 5 rue Henri Desbrùères, 91030 Evry cedex, France

^b INSERM U781, Université Paris Descartes, Hôpital Necker Enfants Malades, 156 rue de Vaugirard, Paris Cedex 15, France

* To whom correspondence should be addressed. Email: cmartinat@istem.fr

Running title: Abnormal EphA5 expression in DM1

Keys words: axonal guidance cues; Myotonic Dystrophy type 1; human embryonic stem cells; pathological modelling;

Although Myotonic Dystrophy type 1 (DM1) has long been characterized as a primarily muscular disease, a growing number of studies point out the importance of the central nervous system involvement in the clinical features of DM1. Psychological dysfunction, excessive daytime sleepiness, and neuropathological abnormalities have been described in DM1 patients (Abe, Fujimura et al. 1994; Turnpenny, Clark et al. 1994; Delaporte 1998; Perini, Menegazzo et al. 1999; Meola, Sansone et al. 2003) Alterations of personality that are associated with DM1 include avoidant personality (Meola, Sansone et al. 2003), obsessive-compulsive, passive-aggressive, and schizotypic traits, whose occurrence is not attributable to the disabling condition of patients (Delaporte 1998). Other studies have found severe impairment in all measures of general intelligence and verbal fluency and particularly frontal, executive, visuospatial, arithmetic, and attention ability deficits (Abe, Fujimura et al. 1994; Modoni, Silvestri et al. 2004; Winblad, Lindberg et al. 2006) The congenital forms of DM1 have been also associated with mental retardation (Modoni, Silvestri et al. 2004). Nevertheless, the molecular bases of these neuronal affections are still misunderstood.

DM1 is caused by an expanded CTG trinucleotide repeat in the 3' UTR of the dystrophin myotonia protein kinase (*DMPK*) gene (Brook, McCurrach et al. 1992). Mutant *DMPK* transcripts containing up to thousands of expanded CUG repeats are trapped in the nucleus within nuclear ribonucleic foci where their accumulation alters the regulation of alternative splicing, which consequently leads to mis-splicing of several mRNA transcripts and neuromuscular dysfunction. In the central nervous system, ribonuclear foci were found widely distributed in neuronal populations, including cerebral cortex, hippocampus, dentate gyrus, thalamus, substantia nigra, brainstem tegmentum and spinal cord (Jiang, Mankodi et al. 2004; Wheeler, Krym et al. 2007). Transcripts encoding Tau, N-methyl-D-aspartate receptor 1 (NMDAR1), and amyloid precursor protein (APP) have been subsequently found to be misregulated in brains of patients with DM1 (Sergeant, Sablonniere et al. 2001; Jiang, Mankodi et al. 2004; Leroy, Dhaenens et al. 2006; Leroy, Wang et al. 2006). At the cellular level, the exact functional consequences of the presence of expanded CUG repeats are still unknown. Alterations of neuronal differentiation, proliferation, neurite outgrowth and synaptic plasticity have been suggested (Hernandez-Hernandez, Bermudez-de-Leon et al. 2006; Andrade, de Leon et al. 2007; Marteyn, Maury et al. 2011; Velazquez-Bernardino, Garcia-Sierra et al. 2012).

Eph receptor tyrosin kinase and their corresponding ligands, ephrins, are membrane-anchored proteins that are considered as a crucial system in the development and maturation

of the central nervous system. The main characteristics of ephrin/Eph interactions are that their effect is mediated by cell-to-cell contacts and that they can propagate bidirectional signals downstream and upstream of the ligand–receptor complex. The Eph are classified into two subfamilies, EphA (A1-A10) and EphB (B1-B6), by the type of ligands they interact with. Thus, ephrin-A ligands bind preferentially to EphA receptor and ephrin-B bind to EphB receptor. This property is not exclusive, since the interactions between classes are possible (Gale, Holland et al. 1996; Himanen and Nikolov 2003). A-type ephrins are anchored to the membrane through a glycosylphosphatidylinositol (GPI) linkage and B-type ephrins have both transmembrane and cytoplasmic regions (Gale, Holland et al. 1996; Flanagan and Vanderhaeghen 1998). Among these molecules, EphAs have been especially implicated in the regulation of migrating cells or axons, and in the establishment of tissue patterns and topographic maps in distinct regions of the developing central nervous system. In addition, they have been involved in the regulation of synapse formation and plasticity (Klein 2001; Pasquale 2008). Despite the importance of EphA5 in the development and maintenance of the central nervous system, their potential contribution in DM1 has never been analyzed.

We determined whether expanded CUG repeats could affect the expression of EphA receptors by quantifying the expression of all splice variants described for EphA members in NCBI database by RT-PCR in human cortical biopsies from post-mortem DM1 patients (Figure 1A). A statistical increased expression of EphA5 receptor variant 1 was detected in DM1 samples in comparison with controls, which led to an increased expression of its total form. EphA5 variant 1 differs from variant 2 by the inclusion of exon 9 (Figure 1B). Similar results were observed in a murine DM1 model (Gomes-Pereira, Foiry et al. 2007). An increased expression of the murine ortholog of EphA5 variant 1 was observed in different regions of the central nervous system of DMSXL mice in comparison with controls (Figure 2A). Most of the splice defects associated to DM1 are characterized by the defect in the switch between foetal and adult isoform leading to an abnormal maintenance of the foetal isoform expression (Philips, Timchenko et al. 1998) Buj-Bello, Furling et al. 2002; Charlet, Savkur et al. 2002; Jiang, Mankodi et al. 2004; Kalsotra, Xiao et al. 2008). The alternate splicing of EphA5 observed in DM1 mouse CNS did not follow this rule as illustrated in Figure 2A. A similar result was observed in DM1 patients (Figure 2B). Whereas the most conspicuous effect on alternative splicing that we observed in DM1 adult brain was a 3-fold increase in the fraction of EphA5 receptor mRNA that includes exon 9, a decreased expression of this isoform is observed in foetal cerebral biopsies from DM1 patients when compared with control (Figure 2C). It is interesting to note that the two other splice defects

related to DM1 that do not correspond to a maintenance of foetal isoform expression affect the expression of two genes in the central nervous system, *Grin1* and *Tau* (Dhaenens, Schraen-Maschke et al. 2008; Suenaga, Lee et al. 2012).

We hypothesized that the *EphA5* pre-mRNA could be affected by aberrant regulation of alternate splicing as previously demonstrated in DM1. Two known pathways have been shown to be implicated in the DM1-related mis-splicing. First, the CUG repeats sequester the RNA-binding protein, Muscleblind-like 1 (MBNL1), resulting in its depletion and loss of function (Miller, Urbinati et al. 2000). Second, a gain-of-function of CUG-binding protein (CUGBP1) and Elav-type RNA protein 3 (ETR3) through its stabilization and phosphorylation by PKC is also instrumental to DM1 pathophysiology (Timchenko, Cai et al. 2001; Kuyumcu-Martinez, Wang et al. 2007; Orengo, Chambon et al. 2008). To investigate the role of MBNL1, CUGBP1 and ETR3 in mediating the aberrant splicing of *EphA5* pre-mRNA, we coexpressed each of these factors with an *EphA5* exon 9 minigene. Surprisingly, only the co-expression of ETR3 with the minigene strongly induces the retention of exon 9, reproducing the aberrant splicing pattern observed in DM1 patients and in DMSXL mice (Figure 3). Altogether, our results identify a new aberrant splice associated specifically to DM1 which affects the expression of *EphA5* receptor.

From predictive sequence analysis, inclusion of exon 9 of *EphA5* does not modify any of the intracytoplasmic catalytic domains such as tyrosine kinase domain. However, predictive structural analyses suggest that the inclusion of the exon 9 could modify the intracytoplasmic domain and therefore the possible accessibility to the catalytic domains (Figure 4). Whereas further studies are required to determine the exact pathological contributions of this increased inclusion of exon9 of *EphA5*, we can hypothesis that inclusion of this exon might influences the behavior of *EphA5* receptor. *EphA5* function is required for establishment and maintenance of plasticity in adult mammalian brain (Cheng, Nakamoto et al. 1995; Yue, Chen et al. 2002). Expression of a dominant negative *EphA5* receptor led to neurochemical and behavioral deficits (Halladay, Tessarollo et al. 2004; Numachi, Yoshida et al. 2007). *EphA5* knockout mice also exhibit behavioral changes accompanied by altered concentrations of serotonin in the hypothalamus (Mamiya, Hennesy et al. 2008). Alteration of the *ephrinA5* signaling by over-expressing a soluble *EphA5* receptor led to defects in synaptogenesis and neural connectivity in hippocampus (Martinez and Soriano 2005). It seems possible, therefore, that altered splicing of exon 9 may contribute to the neuronal impairment observed in DM1 patients.

Materials and methods

DM1 tissues

Cerebral region of 1 month, 4 month and postnatal mice DMSXL and human adult cortical samples were obtained from Dr Mario Gomes-pereira. Mice DMSXL exhibited DM1 features as described previously (Gomes-Pereira, Foiry et al. 2007).

Real Time - Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and Agilent DNA Chips analysis

Total RNA from cells was isolated by "RNeasy Mini Protocol" (Quiagen). cDNA was synthesized by using SuperScript III (Invitrogen). Quantitative real-time RT-PCR were optimized to determine the linear amplification range by using a Chromo4 Real-Time system (Bio-Rad) with Syber Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). PCR products were loaded in 2% agarose gel with SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen).

Minigene transfection assays.

A PCR-amplified segment of the EphA5 gene containing EphA5 minigen contain 449bp of intron8 followed by total exon9 (66bp) followed by 512bp of intron9 was cloned in p β globin vector (p4 11.12 MCS kindly gift by Dr Charlet-B). HEK cells were plated at 5×10^4 cells per well (70-80% confluency in 24-well plate) and were transfected the day after with 500ng of plasmids (pMBNL1, pCUGBP1, pETR3-GFP, pGFP) in OptiMEM medium by using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). 48h after transfection, proteins were extracted the same day followed by Western blot analysis to check overexpression.

Western Blot analysis

Proteins were extracted using RIPA buffer (Invitrogen) with anti-protease (Sigma). After lysis, proteins from centrifugated supernatant were quantified using BCA protein assay kit (Pierce). 30ug of protein were loaded on NuPAGE 4-12% Bis Tris Gel (Invitrogen). Antibodies against MBNL1 (kindly gift by Dr Furling), CUGBP1 (Santa-Cruz Biotechnology), ETR3 (Santa-Cruz Biotechnology) were used at 1/1000

Statistical analysis

The data were processed using Prism5.0c. Values are reported as means \pm s.e.m. Comparisons between two groups were performed with a Student t test (ANOVA). For comparisons of more than 2 groups, "Bonferroni's Multiple Comparison Test" (one-way ANOVA) was performed.

Legend

Figure 1: Increased expression of EphA5 and its variant 1 in association to DM1

A. RTqPCR analysis of total RNA from normal and DM1 cortex tissue. EphAs expressions were analyzed using specific primers against variants or total form. **B.** Schematic organization of EphA5 spliced regions and variants transcripts. Data were analyzed by ANOVA using Student's t test ** $p < 0.005$. *** $p < 0.0005$.

Figure 2: Increased expression of EphA5 variant 1 is not associated with the maintenance of the foetal protein.

A. PCR analysis of EphA5 variant1 in different cerebral regions of normal and DM1 mice (DMSXL). **B.** PCR analysis of EphA5 variant1 in adult and foetal brain tissues from control or DM1 patients. Ratio inclusion was calculated as followed: $(+ex9 * 100) / \text{total}$, total representing $+ex9 + -ex9$. Data were analyzed by ANOVA using Student's t test * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.

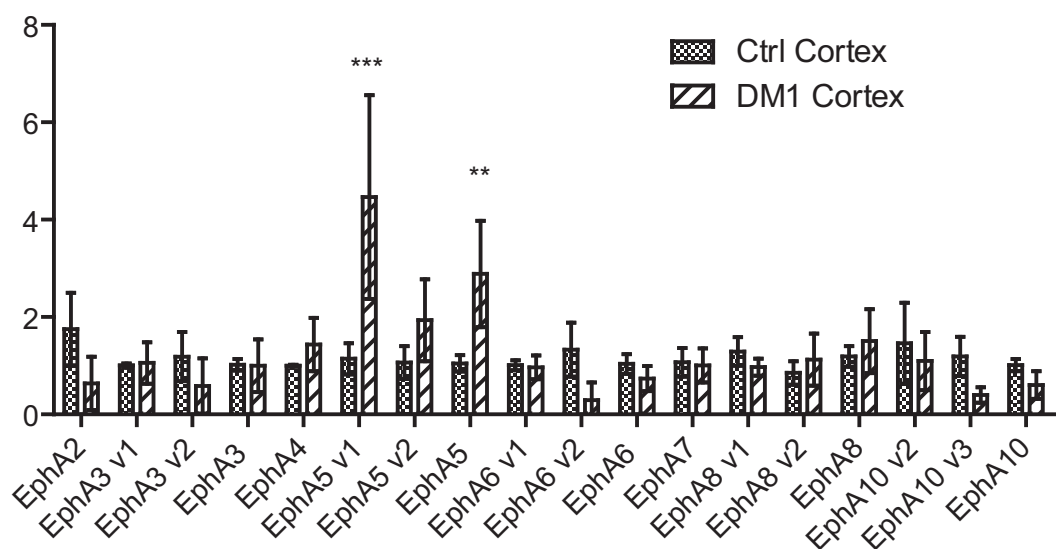
Figure 3: Inclusion of Exon9 of EphA5 is dependent of ETR3 protein.

A. Measurement of exon 9 inclusion in HEK cells co-transfected with EphA5 minigene and RNA binding proteins vectors (pMBNL1, pCUGBP1, pETR3) and control plasmid pGFP. Ratio inclusion was calculated as followed: $(+ex9 * 100) / \text{total}$, total representing $+ex9 + -ex9$. Data were analyzed by “Bonferroni's Multiple Comparison Test” (one-way ANOVA) ** $p < 0.001$. **B.** Overexpression of the different RNA-binding proteins was validated by western blot.

Figure 4: Predictive structural conformation of EphA5 intracytoplasmic domain with or without exon 9

Images were obtained by using Phyre2 software.

A



B

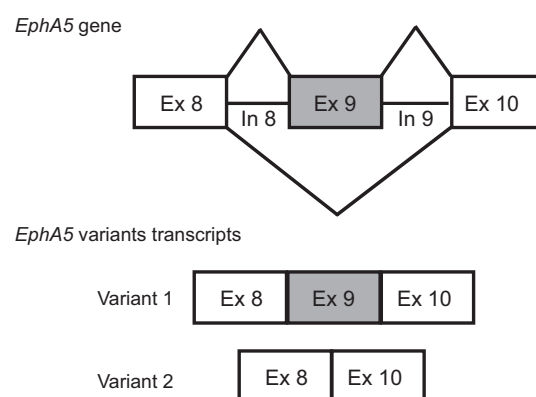
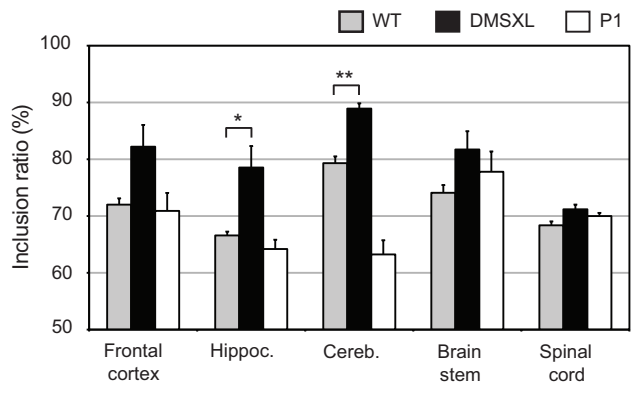
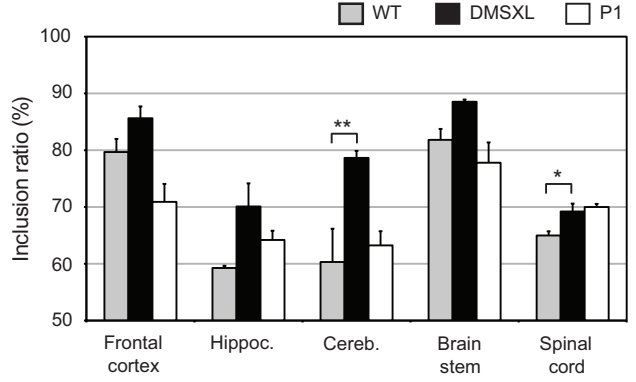
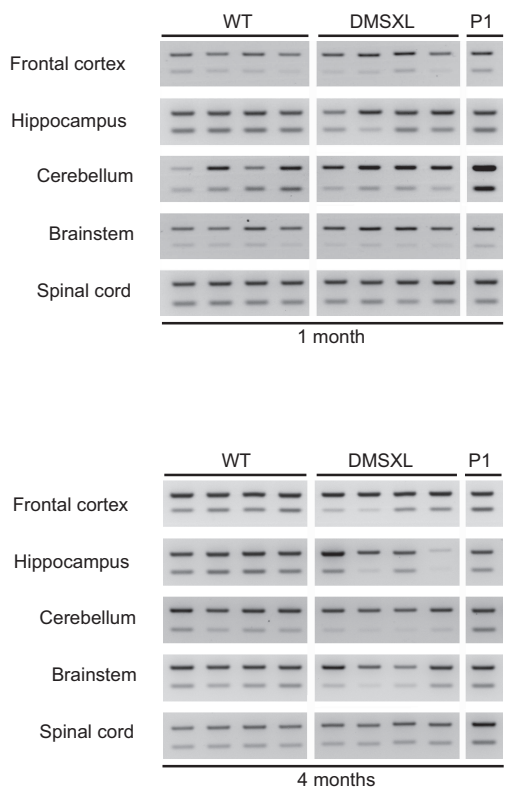
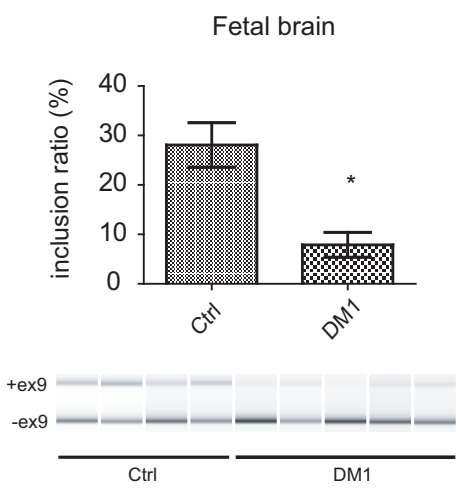
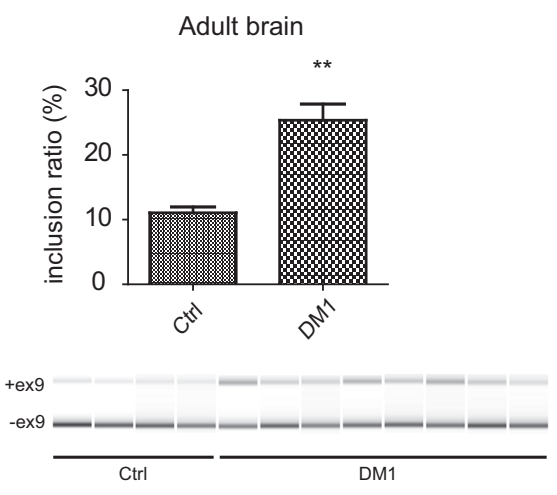


Figure 2 Gauthier et al

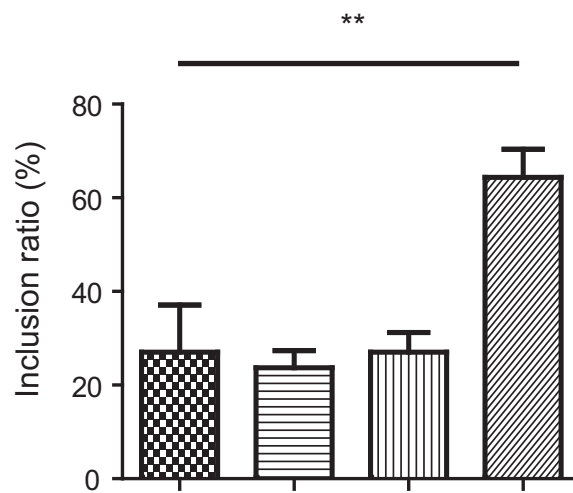
A



B

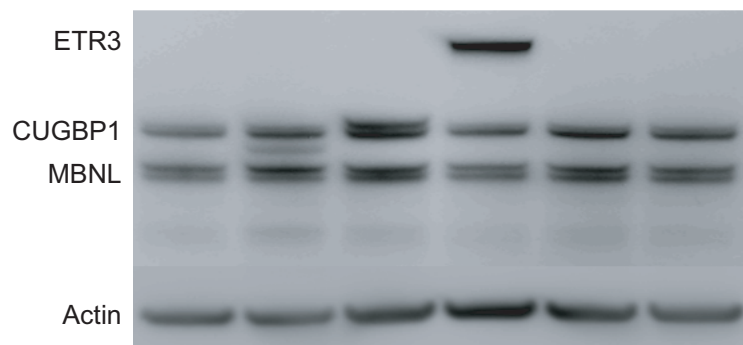


A.



EphA5 Minigene	+	+	+	+
pMBNL1	-	+	-	-
pCUGBP1	-	-	+	-
pETR3	-	-	-	+
pGFP	+	-	-	-

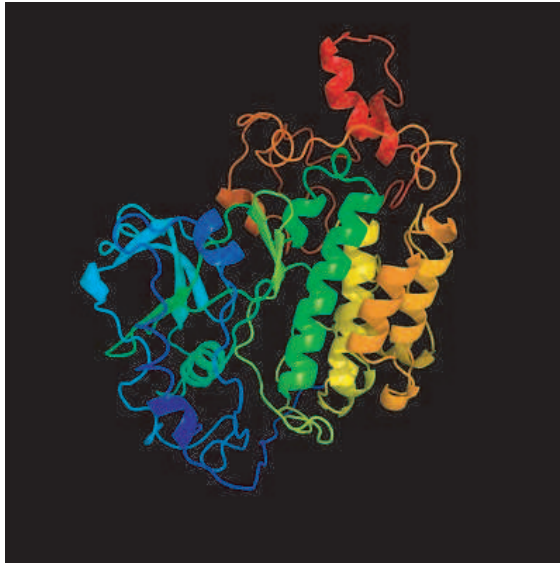
B.



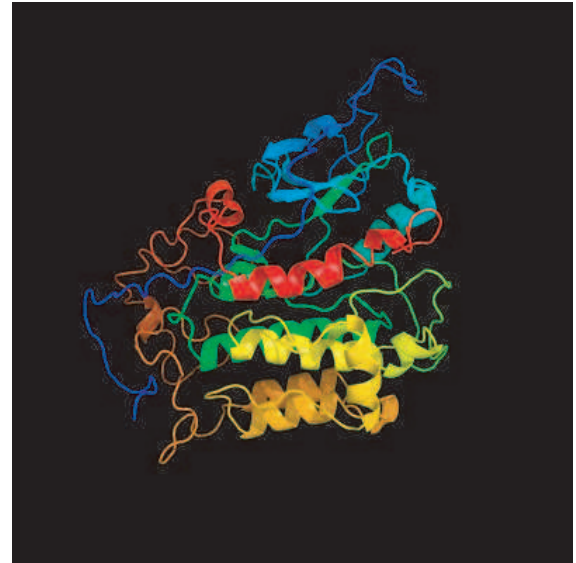
EphA5 Minigene	+	+	+	+	+	-
pMBNL1	-	+	-	-	-	-
pCUGBP1	-	-	+	-	-	-
pETR3	-	-	-	+	-	-
pGFP	-	-	-	-	+	-

A.

With exon9



Without exon9



- Abe, K., H. Fujimura, et al. (1994). "Involvement of the central nervous system in myotonic dystrophy." J Neurol Sci **127**(2): 179-185.
- Andrade, A., M. B. de Leon, et al. (2007). "Myotonic dystrophy CTG repeat expansion alters Ca²⁺ channel functional expression in PC12 cells." FEBS Lett **581**(23): 4430-4438.
- Brook, J. D., M. E. McCurrach, et al. (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 **69**(2): 385.
- Cheng, H. J., M. Nakamoto, et al. (1995). "Complementary gradients in expression and binding of ELF-1 and Mek4 in development of the topographic retinotectal projection map." Cell **82**(3): 371-381.
- Delaporte, C. (1998). "Personality patterns in patients with myotonic dystrophy." Arch Neurol **55**(5): 635-640.
- Dhaenens, C. M., S. Schraen-Maschke, et al. (2008). "Overexpression of MBNL1 fetal isoforms and modified splicing of Tau in the DM1 brain: two individual consequences of CUG trinucleotide repeats." Exp Neurol **210**(2): 467-478.
- Flanagan, J. G. and P. Vanderhaeghen (1998). "The ephrins and Eph receptors in neural development." Annu Rev Neurosci **21**: 309-345.
- Gale, N. W., S. J. Holland, et al. (1996). "Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis." Neuron **17**(1): 9-19.
- Gomes-Pereira, M., L. Foiry, et al. (2007). "CTG trinucleotide repeat "big jumps": large expansions, small mice." PLoS Genet **3**(4): e52.
- Halladay, A. K., L. Tessarollo, et al. (2004). "Neurochemical and behavioral deficits consequent to expression of a dominant negative EphA5 receptor." Brain Res Mol Brain Res **123**(1-2): 104-111.
- Hernandez-Hernandez, O., M. Bermudez-de-Leon, et al. (2006). "Myotonic dystrophy expanded CUG repeats disturb the expression and phosphorylation of tau in PC12 cells." J Neurosci Res **84**(4): 841-851.
- Himanan, J. P. and D. B. Nikolov (2003). "Eph receptors and ephrins." Int J Biochem Cell Biol **35**(2): 130-134.
- Jiang, H., A. Mankodi, et al. (2004). "Myotonic dystrophy type 1 is associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of muscleblind proteins and deregulated alternative splicing in neurons." Hum Mol Genet **13**(24): 3079-3088.
- Klein, R. (2001). "Excitatory Eph receptors and adhesive ephrin ligands." Curr Opin Cell Biol **13**(2): 196-203.
- Kuyumcu-Martinez, N. M., G. S. Wang, et al. (2007). "Increased steady-state levels of CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation." Mol Cell **28**(1): 68-78.
- Leroy, O., C. M. Dhaenens, et al. (2006). "ETR-3 represses Tau exons 2/3 inclusion, a splicing event abnormally enhanced in myotonic dystrophy type I." J Neurosci Res **84**(4): 852-859.
- Leroy, O., J. Wang, et al. (2006). "Brain-specific change in alternative splicing of Tau exon 6 in myotonic dystrophy type 1." Biochim Biophys Acta **1762**(4): 460-467.
- Mamiya, P. C., Z. Hennesy, et al. (2008). "Changes in attack behavior and activity in EphA5 knockout mice." Brain Res **1205**: 91-99.
- Marteyn, A., Y. Maury, et al. (2011). "Mutant human embryonic stem cells reveal neurite and synapse formation defects in type 1 myotonic dystrophy." Cell Stem Cell **8**(4): 434-444.

- Martinez, A. and E. Soriano (2005). "Functions of ephrin/Eph interactions in the development of the nervous system: emphasis on the hippocampal system." Brain Res Brain Res Rev **49**(2): 211-226.
- Meola, G., V. Sansone, et al. (2003). "Executive dysfunction and avoidant personality trait in myotonic dystrophy type 1 (DM-1) and in proximal myotonic myopathy (PROMM/DM-2)." Neuromuscul Disord **13**(10): 813-821.
- Miller, J. W., C. R. Urbinati, et al. (2000). "Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy." EMBO J **19**(17): 4439-4448.
- Modoni, A., G. Silvestri, et al. (2004). "Characterization of the pattern of cognitive impairment in myotonic dystrophy type 1." Arch Neurol **61**(12): 1943-1947.
- Numachi, Y., S. Yoshida, et al. (2007). "Altered EphA5 mRNA expression in rat brain with a single methamphetamine treatment." Neurosci Lett **424**(2): 116-121.
- Orengo, J. P., P. Chambon, et al. (2008). "Expanded CTG repeats within the DMPK 3' UTR causes severe skeletal muscle wasting in an inducible mouse model for myotonic dystrophy." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(7): 2646-2651.
- Pasquale, E. B. (2008). "Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease." Cell **133**(1): 38-52.
- Perini, G. I., E. Menegazzo, et al. (1999). "Cognitive impairment and (CTG)n expansion in myotonic dystrophy patients." Biol Psychiatry **46**(3): 425-431.
- Philips, A. V., L. T. Timchenko, et al. (1998). "Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy." Science **280**(5364): 737-741.
- Sergeant, N., B. Sablonniere, et al. (2001). "Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1." Hum Mol Genet **10**(19): 2143-2155.
- Suenaga, K., K. Y. Lee, et al. (2012). "Muscleblind-like 1 knockout mice reveal novel splicing defects in the myotonic dystrophy brain." PLoS One **7**(3): e33218.
- Timchenko, N. A., Z. J. Cai, et al. (2001). "RNA CUG repeats sequester CUGBP1 and alter protein levels and activity of CUGBP1." J Biol Chem **276**(11): 7820-7826.
- Turnpenny, P., C. Clark, et al. (1994). "Intelligence quotient profile in myotonic dystrophy, intergenerational deficit, and correlation with CTG amplification." J Med Genet **31**(4): 300-305.
- Velazquez-Bernardino, P., F. Garcia-Sierra, et al. (2012). "Myotonic dystrophy type 1-associated CTG repeats disturb the expression and subcellular distribution of microtubule-associated proteins MAP1A, MAP2, and MAP6/STOP in PC12 cells." Mol Biol Rep **39**(1): 415-424.
- Wheeler, T. M., M. C. Krym, et al. (2007). "Ribonuclear foci at the neuromuscular junction in myotonic dystrophy type 1." Neuromuscul Disord **17**(3): 242-247.
- Winblad, S., C. Lindberg, et al. (2006). "Cognitive deficits and CTG repeat expansion size in classical myotonic dystrophy type 1 (DM1)." Behav Brain Funct **2**: 16.
- Yue, Y., Z. Y. Chen, et al. (2002). "Mistargeting hippocampal axons by expression of a truncated Eph receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(16): 10777-10782.

Conclusions

Les travaux effectués au cours de ma thèse permettent d'apporter de nouveaux éléments en vue d'une meilleure compréhension de la physiopathologie de la Dystrophie Myotonique de type 1. En parallèle, ils renforcent les démonstrations actuelles quant à la pertinence des cellules souches pluripotentes humaines pour des applications de modélisation pathologique. En effet, l'utilisation des hESC_DM1 nous a permis d'identifier de nouvelles altérations pouvant contribuer aux conséquences physiopathologiques de la DM1 et ce, dans deux systèmes biologiques affectés dans la DM1 : le système musculaire et le système neuronal. Dans les deux cas, la démarche intellectuelle a été similaire, à savoir comprendre par quels mécanismes la mutation DM1 aboutit au défaut d'expression génique identifié et en parallèle, comprendre les conséquences physiopathologiques de ces affections.

1. Identification d'un facteur de transcription altéré dans la DM1, participant aux altérations myogéniques

Une approche par « *ressource driven* » utilisant le potentiel de lignées hESC_DM1 a été choisie pour la recherche à large échelle de gènes affectés dans la pathologie. Les hESC et leurs progenies sont facilement amplifiables, homogènes et stables et dès lors respectent les critères nécessaires pour ce type d'approche d'expression différentielle. Nous avons ainsi mis en évidence un facteur de transcription, ZNF37A, fortement diminué dans les trois stades de différenciation.

Par quel mécanisme la mutation DM1 entraîne-t-elle une altération de ZNF37A ?

Ces dernières années, les études mécanistiques de la DM1 se sont essentiellement focalisées sur l'identification de défauts d'épissages alternatifs, conséquences majeures du gain de fonction toxique des ARNm *DMPK* mutants. A ce jour, le nombre de pré-ARNm avec un défaut d'épissage s'élève à une trentaine, majoritairement musculaire. Cependant, un nombre croissant de données suggèrent que la DM1 n'est pas uniquement associée à des défauts d'épissage. En effet, des défauts post-transcriptionnels et traductionnels semblent également intervenir dans le développement de cette pathologie. Il a ainsi été montré que des facteurs de transcription, tel que le facteur Sp1, pouvaient être également séquestré au niveau des inclusions ribonucléiques. Consécutivement il peut entraîner une diminution de l'expression de certains transcrits comme le canal chlore, mécanisme pouvant potentiellement intervenir dans l'établissement de la myotonie (Ebraldize, Wang et al. 2004). Différentes

études ont également montré que la protéine CUGBP1 pouvait être à l'origine d'altérations post-transcriptionnelles et traductionnelles. Ainsi, la surexpression spécifique de CUGBP1 dans des muscles squelettiques de souris aboutit à l'augmentation de la traduction de deux transcrits, p21 et Mef2A, ayant pour conséquence un retard dans la maturation musculaire et l'apparition d'une dystrophie musculaire (Timchenko, Patel et al. 2004). Plus récemment, il a été montré que l'augmentation d'expression de CUGBP1 entraînait une stabilité et donc une augmentation des ARNm codant le TNF. CUGBP1 se fixerait au niveau de la région 3' UTR de l'ARNm. De façon intéressante, il semblerait que cette fixation ne dépende pas des sites de fixation consensus de CUGBP1 (motifs UGU) et serait plutôt lié à la structure secondaire des ARNm du TNF. Bien que ces résultats n'aient pas été validés au niveau de biopsies de patients DM1, ils suggèrent que la fonction cytoplasmique de CUGBP1 dans le *turnover* des ARNm pourrait intervenir dans les processus pathologiques de la DM1 (Zhang, Lee et al. 2008). Nos résultats montrant que l'instabilité des ARNm de ZNF37A soit dépendante de CUGBP1 confirment le rôle important joué par la fraction cytoplasmique de CUGBP1. Cependant, dans le cas de ZNF37A, CUGBP1 semble intervenir dans la diminution de sa stabilité. Bien que nous ayons démontré l'interaction physique de CUGBP1 avec la région 5'UTR de ZNF37A, les mécanismes exacts par lesquels CUGBP1 interfère avec la stabilité des ARNm de ZNF37A doivent être élucidés. Dans un premier temps, des expériences de perte et de gain de fonction de CUGBP1 devraient nous permettre de mesurer directement l'effet de CUGBP1 sur les ARNm de ZNF37A. De plus, des expériences de mutagenèse dirigée sont actuellement en cours pour déterminer exactement les motifs de liaison de CUGBP1 au niveau de la région 5' UTR des ARNm de ZNF37A.

Quels sont les conséquences pathologiques de l'altération de ZNF37A dans la DM1 ?

Comme la DM1 est une maladie affectant majoritairement le muscle, nous avons recherché le rôle de ZNF37A dans ce contexte biologique. A l'heure actuelle, aucun protocole de différenciation des hESC en cellules musculaires n'est possible sans modifications génétiques, nous avons donc testé cette perte de fonction dans des cultures primaires de muscles de patients. La diminution de ZNF37A par différents siRNA, entraîne une altération de la myogenèse des myoblastes contrôles, et plus particulièrement une diminution de la capacité des myoblastes à fusionner. La myogenèse des cellules musculaires DM1 est affectée et se traduit par un défaut de fusion et l'altération de nombreux facteurs de transcription tel que *MyoD*, *myogénine* ou encore *MHC* (Furling, Lemieux et al. 2001; Timchenko, Iakova et

al. 2001; Amack, Reagan et al. 2002; Salisbury, Sakai et al. 2008; Beffy, Del Carratore et al. 2010; Faenza, Blalock et al. 2012). Afin de valider le défaut de fusion des myoblastes contrôles suite à la perte de fonction de ZNF37A, nous sommes actuellement en train de tester l'effet d'un gain de fonction de ce facteur dans des myoblastes DM1 par une approche virale afin de voir une possible restauration myogénique. Ces expériences nous permettront de valider l'implication de ZNF37A dans la DM1 et son rôle dans la myogenèse.

Par quel mécanisme la diminution de ZNF37A altère-t-elle la myogenèse ?

Comme ZNF37A est un facteur de transcription répresseur diminué dans la DM1, la recherche de ses cibles a été basée sur l'hypothèse qu'elles devaient être surexprimées. L'*IL13RA1* a été considéré puisque son expression était augmentée dans la DM1 et qu'il est impliqué dans le processus myogénique. En effet, ce récepteur est capable de former des hétérodimères avec l'IL4R, pour l'IL13 et l'IL4, deux cytokines impliquées dans les étapes de fusion durant la myogenèse (Horsley, Jansen et al. 2003; Lafreniere, Mills et al. 2006; Jacquemin, Butler-Browne et al. 2007) et la réponse à une lésion musculaire (Prokopchuk, Liu et al. 2007). L'application de ces deux cytokines *in vitro* entraîne une augmentation de la fusion des myoblastes contrôles tandis que les myoblastes DM1 y sont insensibles. Par des approches de siRNA, nous avons démontré que ZNF37A pouvait moduler l'expression de l'*IL13RA1*. Il est tentant de penser que c'est par cette interaction qu'il entrainerait des défauts myogéniques. En effet, les myoblastes contrôles dont la perte de fonction de ZNF37A a été induite par un siRNA sont insensibles au traitement par l'IL13 et l'IL4 de manière similaire aux myoblastes DM1. L'implication de l'*IL13RA1* dans la DM1 est d'autant plus intéressante que dans un contexte normal il participe à l'amélioration de la fusion des myotubes. Ceci semble contradictoire puisque dans la DM1, son augmentation d'expression est parallèle à un défaut myogénique. Cependant, nous ne savons pas quelles sont les conséquences d'une augmentation du nombre de récepteurs à l'IL13. Elle pourrait modifier la voie de signalisation de l'IL13RA1 et altérer la réponse des cellules aux cytokines IL13/IL4. Autrement, elle pourrait participer à un mécanisme de compensation de l'altération musculaire dans DM1 en tentant de « réparer » la fusion défectueuse.

La myogenèse étant réduite mais pas nulle dans la DM1 ainsi que dans nos expériences de perte de fonction de ZNF37A, des mécanismes de compensations pourraient limiter le défaut myogénique. Des compensations peuvent se mettre en place lors d'un défaut

d'expression des MRFs. Par exemple lorsque *MyoD* est altéré dans des souris, la myogenèse est possible grâce à une compensation de *Myf5* (Rudnicki, Braun et al. 1992). De la même manière, la myogenèse terminale peut se mettre en place par une compensation de la *Myogénine* suite à un défaut d'expression de *MRF4* (Zhang, Behringer et al. 1995). Un mécanisme similaire serait possible pour *ZNF37A* puisqu'il est nécessaire mais pas limitant à la myogenèse. Bien qu'aucun orthologue de *ZNF37A* n'ait été décrit chez la souris, des altérations myogéniques peuvent être observées dans des modèles murins liés à l'introduction de la mutation DM1. Ceci suggère que *ZNF37A* n'est pas le facteur majeur du défaut musculaire DM1 mais qu'il pourrait toutefois participer au phénotype. Cependant une étude plus approfondie de recherche d'orthologues de *ZNF37A* chez la souris est en cours d'investigation au laboratoire. En effet, nous testons actuellement l'expression de plusieurs facteurs de transcription murins à doigt de zinc présentant une similitude de séquence avec *ZNF37A*.

Quelles autres fonctions pour ZNF37A ?

L'expression du gène *ZNF37A* a été retrouvée diminuée dans les lignées hESC_DM1 indifférenciées et différenciées en progéniteurs neuraux et mésenchymateux. Son expression semble donc ubiquitaire et suggère d'autres rôles physiopathologique participant à la multisystémie DM1.

Un autre facteur de transcription à doigt de zinc, *ZNF9* a été mis en évidence dans la DM2 et est responsable des anomalies physiopathologiques associées. La mutation de la DM2 est présente dans l'intron 1 de *ZNF9* et implique des répétitions CCTG dont les transcrits sont séquestrés dans le noyau sous forme d'inclusions ribonucléiques (Liquori, Ricker et al. 2001) Les données sur l'haploinsuffisance de *ZNF9* sont à ce jour controversées, le mécanisme responsable de l'altération serait soit transcriptionnel soit post-transcriptionnel (Schneider-Gold and Timchenko 2010; Jones, Jin et al. 2011). La diminution de *ZNF9* est responsable de nombreuses altérations multisystémiques similaires à la DM1 tel que la faiblesse musculaire, la myotonie, la cataracte, une insulino-résistance, une insuffisance testiculaire et des problèmes cognitifs (Ricker, Koch et al. 1994; Meola, Sansone et al. 1996; Udd, Krahe et al. 1997; Day, Ricker et al. 2003; Day and Ranum 2005). Il est tentant de faire une analogie entre *ZNF9* et *ZNF37A* et de penser que l'haploinsuffisance de ces facteurs de transcription à doigt de zinc participe à un mécanisme commun entre les deux pathologies.

ZNF37A est-il un nouveau marqueur pathologique pertinent?

Comme décrit dans le paragraphe précédent, l'altération d'expression de ZNF37A a été retrouvée dans des systèmes biologiques extrêmement différents : le système nerveux central et le muscle. Mais est-ce que pour autant ZNF37A est un bon biomarqueur de la pathologie ? Plus précisément est-ce qu'il pourrait être utilisé pour le diagnostic pathologique de la DM1 ? Pour répondre à ces questions, nous avons regardé l'expression de ZNF37A dans des PBL (*Peripheral Blood Lymphocyte*) de patients DM1 et contrôles (obtenus en collaboration avec le Dr. Bassez). Aucune différence n'a été observée entre les contrôles et les DM1. Cependant, de façon intéressante, le niveau d'expression de ZNF37A semble varier après traitement des PBL avec la Metformine (Figure 31). Cet antidiabétique oral est à l'heure actuelle, prescrit à des patients présentant un diabète de type 2. Il est en cours d'étude au laboratoire ISTEM par l'équipe du Dr Baghdoyan pour son potentiel thérapeutique pour la DM1. En effet, il a été identifié par un criblage de molécules pour sa capacité à restaurer un certain nombre d'épissage alternatif de la DM1 (article en soumission).

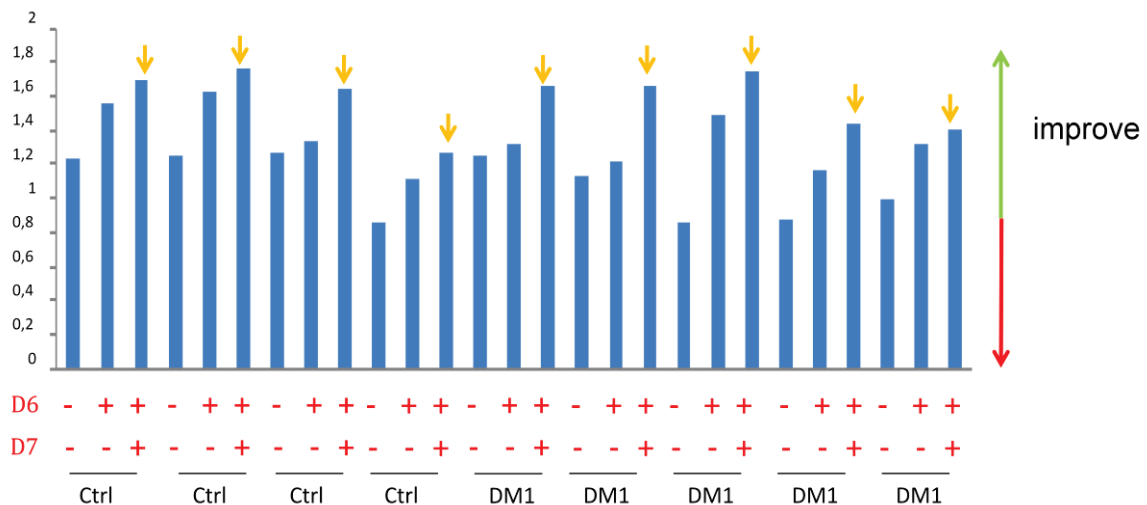


Figure 31: Expression de ZNF37A suite au traitement de PBL de patients DM1 à la Metformine

RT-PCR quantitative de l'expression de ZNF37A dans 4 échantillons de PBL contrôles et 5 échantillons de PBL DM1 après 6 jours (D6) ou 7 jours (D7) de traitement à la Metformine.

2. Identification d'un nouveau défaut d'épissage d'un gène de guidance axonale, l'EphA5 dans la DM1

Dans un deuxième temps une partie de mon travail de thèse a consisté à étudier l'altération d'un autre gène, l'*EphA5* qui se traduit par une augmentation de son expression. Ce travail à l'inverse de l'étude de *ZNF37A* a été basé sur une approche « *hypothesis driven* » c'est-à-dire une recherche ciblée sur un gène connu avec un rôle à priori d'intérêt pour l'explication des phénotypes de la maladie. Ce projet a pris naissance suite aux travaux réalisés précédemment sur les gènes *SLITRK*. Nous avons démontré une altération de l'expression de certains membres de la famille des *SLITRK* dans la DM1 aboutissant à des défauts du réseau neuritique (Marteyn, Maury et al. 2011). Suite à ces travaux, nous nous sommes intéressés à d'autres gènes impliqués dans ce processus ainsi que dans la plasticité synaptique puisque des altérations ont été décrites dans la DM1 (Stranock and Davis 1978; Stranock and Davis 1978; van der Ven, Jansen et al. 1993; Wheeler, Krym et al. 2007; Panaite, Kielar et al. 2011). Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux membres de la famille des récepteurs aux Ephrines-A5. La famille des *Ephs* est composée de récepteurs à tyrosines kinases impliqués dans une grande variété de processus comme le développement neural, la prolifération, la migration topographique cellulaire, la guidance axonale ainsi que la vascularisation (Flanagan and Vanderhaeghen 1998; O'Leary and Wilkinson 1999; Cooke and Moens 2002; Martinez and Soriano 2005; Pasquale 2008).

Nous avons recherché une altération possible de l'expression des récepteurs aux Ephrines-A et avons observé une augmentation spécifique de l'EphA5. Celle-ci a été corrélée à une modification de l'épissage alternatif de l'EphA5 et plus précisément une augmentation de l'inclusion de l'exon9, correspondant au variant 1.

Par quel mécanisme la mutation peut-elle aboutir à ce défaut d'épissage ?

Des expériences avec un minigène comprenant l'exon 9 ainsi que les séquences adjacentes (introns 8 et 9) nous ont permis de montrer que l'inclusion de l'exon 9 semble dépendant de la protéine ETR3. Cette dernière fait partie de la même famille que CUGBP1 et bien que son rôle ait été moins étudié, il est également un régulateur transcriptionnel. Cette protéine dont l'expression est augmentée dans la DM1 (Wang, Kearney et al. 2007; Yadava, Frenzel-McCardell et al. 2008), est responsable de l'épissage alternatif de certains pre-ARNm notamment la Myomesine ou encore Tau (Leroy, Dhaenens et al. 2006; Dhaenens, Tran et al.

2011; Koebis, Ohsawa et al. 2011). Son rôle est souvent associé à CUGBP1 de par leurs homologies structurales mais dans des biopsies cérébrales de patients il semble avoir un rôle indépendant. Il a ainsi été montré que certains épissages de Tau notamment l'exon 2/3 ainsi que l'exon 10 était sous le contrôle d'ETR3 mais pas de CUGBP1. Nos résultats confirment l'intervention spécifique d'ETR3 dans la régulation transcriptionnelle de gènes neuronaux.

Cependant la spécificité d'ETR3 sur l'inclusion de l'exon 9 n'a pas été complètement validée puisque seule la surexpression d'ETR3 modifie l'épissage de notre minigène EphA5. Des expériences de sous-expression basée sur l'utilisation de siRNA avec le minigène EphA5 ont été effectuées sur des cellules T293 et Hela et ne montrent, à l'heure actuelle, aucune modulation d'épissage de l'EphA5. Nous supposons que le type cellulaire est limitant et non approprié pour ces études et que le niveau de base d'inclusion de l'exon9 dans ces cellules n'est pas adéquat pour voir un effet de la perte de fonction d'ETR3. D'autres équipes ont déjà démontré la nécessité de changer de type cellulaire pour ce type d'étude. Dans l'article de Ho *et al*, les auteurs ont testé l'épissage alternatif de l'insuline récepteur (IR) à l'aide une approche similaire par minigène. Pour valider l'effet de la perte et du gain de fonction des protéines de liaisons MBNLs sur l'épissage alternatif de l'IR, ils ont du adapter leurs expériences en changeant de type cellulaire (Ho, Charlet et al. 2004).

La spécificité d'ETR3 dans l'épissage de l'EphA5 pourrait également être validée par la mutation des sites de fixation UGUU du minigène. Cette stratégie est majoritairement utilisée par des équipes travaillant sur l'épissage alternatif et donne une véritable preuve de la spécificité des protéines régulant ce processus.

Parallèlement, et bien que la surexpression de MBNL1 ne semble pas affecter l'inclusion de l'exon 9, nous ne pouvons pas exclure l'intervention des protéines de liaison à l'ARNm tel que MBNL1 ou MBNL2 sur l'épissage alternatif de l'EphA5. Des expériences de perte de fonction sont à prévoir afin de pouvoir définitivement conclure sur ce point.

Il est intéressant de noter que l'inclusion de l'exon 9 est associée à l'augmentation de la forme totale de l'EphA5. Nous supposons que le variant 1 contenant l'exon9 pourrait stabiliser les transcrits EphA5 et ainsi augmenter son expression globale. Pour tester cela, des expériences de dégradation de l'ARNm par un traitement de cellules DM1 à l'Actinomycine D sont en cours de réalisation au laboratoire.

Pour finir, l'utilisation de contrôle isogénique, c'est à dire la réduction du nombre de répétitions CUG au niveau des hESC-DM1 à l'aide de l'anti-sens hU7 (CAG)_n (développé par le Dr.Furling (Institut de Myologie)), décrit pour pouvoir restaurer *in vitro*, certains

phénotypes moléculaires associés à la DM1 (Francois, Klein et al. 2011), devrait nous permettre de définitivement corrélérer le défaut d'expression de l'EphA5 à la mutation DM1.

Quelles sont les conséquences pathologiques de ce défaut d'épissage ?

Le variant 1 contient un exon supplémentaire (exon 9) contenant 66nt codant pour une partie juxtamembranaire du récepteur EphA5. Aucune études sur ces deux variants n'ont encore été effectuées pour comprendre si leurs rôles étaient différents. Cependant, pour d'autres EphAs, il a été montré que deux variants d'un même ARNm pouvait donner deux protéines avec des rôles antagonistes. Notamment, il a été montré qu'un des variant du récepteur *EphA7* pouvaient avoir un rôle répulsif pour la guidance axonale alors que l'autre était attractif (Holmberg, Clarke et al. 2000). Nous avons effectué une étude *in silico* de cristallisation qui suggère que l'ajout de l'exon 9 de l'EphA5 entrainerait une modification de la structure 3D du récepteur principalement de sa partie intracellulaire. Ceci pourrait entrainer une modification des voies de signalisation du récepteur. Les études des protéines de cette voie, Src, Pak, et Ephexin sont en cours d'investigation au laboratoire pour comprendre les changements en *trans* que peut entrainer l'ajout de l'exon 9, ainsi que les potentielles conséquences et fonctionnalités du récepteur.

De par son rôle dans la guidance neuritique, il est tentant de penser qu'une modification de l'expression de l'EphA5 a une conséquence sur la migration axonale des neurones. Pour cela, l'arborisation neuritique de nos neurones cholinergiques sains et DM1 pourraient être étudiée par un système de chambre microfluidique. La pousse et la destination des axones pourraient être suivis et quantifiés en fonction de la présence ou non du ligand Ephrine-A5. Nous disposons au laboratoire d'un microscope à fluorescence automatisé (ArrayScan® VTI Thermo Scientific Cellomics®) associés à un logiciel d'analyse qui permet de quantifier de nombreux paramètres sur des cellules immunomarqués. Les marquages neuronaux cytoplasmiques tels que MAP2 ou Tuj1 permettrait de quantifier la longueur, l'aire et même la complexité de la migration axonale de nos neurones cholinergiques sains et DM1 en présence ou absence d'Ephrine-A5.

Discussion et perspectives

L'utilisation des cellules souches embryonnaires humaines pour de nouvelles approches thérapeutiques est une technologie naissante qui est actuellement en plein développement. L'enthousiasme de la communauté scientifique pour ces cellules a longtemps concerné leurs applications en thérapie substitutive. Parmi les autres applications possibles, l'approche de modélisation pathologique d'une maladie monogénique décrite dans cette thèse représente un puissant outil d'étude physiopathologique.

Apport des hESC comme outil de modélisation pour la DM1

Ces dernières années, une majeure partie de la communauté scientifique DM1 a visé la recherche de nouveaux mécanismes moléculaires permettant de comprendre sa multisystémie. La découverte de ces facteurs spécifiquement dérégulés dans le contexte pathologique n'a été possible que grâce aux croisements des données d'un réseau de plus en plus complet de modèles pathologiques dont chacun apporte sa part d'informations sur les conséquences de la maladie. Cependant, les connaissances incomplètes des mécanismes altérés et l'absence de thérapies reflètent la nécessité de répliquer les perturbations moléculaires dues à la mutation causale dans de nouveaux modèles pertinents. Notre modèle d'hESC porteuses de la mutation DM1 prend sa place parmi les modèles déjà décrits puisqu'il participe à la découverte de nouveaux mécanismes pathologiques complexes. Comme tous les autres, ce modèle comporte un certain nombre d'avantages et d'inconvénients qui nécessitent une validation supplémentaire des altérations décelées.

Les hESC sont un matériel de choix de par leurs deux grandes propriétés : l'auto-renouvellement qui permet d'avoir un matériel stable, homogène et facilement amplifiable et la pluripotence qui permet de dériver, pour peu que l'on connaisse les protocoles adéquats, différents types cellulaires en gardant un même fond génétique. Ceci est d'autant plus intéressant qu'elles permettent de regarder l'effet de la mutation directement sur un type cellulaire spécifique parfois difficile d'accès comme des sous-populations du système nerveux. Mon travail de thèse démontre l'avantage de la pluripotence des hESC pour l'étude de pathologies multisystémiques. En effet, les protocoles de différenciation en cellules du lignage neural et mésenchymal a permis de mettre en évidence de nouvelles altérations qui participeraient aux défauts du système nerveux central et musculaire chez des patients DM1.

Le meilleur exemple de l'utilité de la pluripotence des hESC est sans doute le système nerveux central humain où les seules alternatives d'études possibles, outre l'imagerie

médicale, sont soit les biopsies *post-mortem* de patients soit l'utilisation de cellules souches neurales, prélevées au cours d'opération et dont le potentiel de différenciation est cependant limité. Bien que très informatifs, ces modèles présentent une limitation quant à disponibilité tissulaire. De plus, ces échantillons peuvent refléter les conséquences de la mort comme des défauts d'architectures cellulaires ou des mécanismes de stress et décrivent souvent un stade très avancé d'une pathologie. Les hESC_DM1 peuvent donc représenter une alternative de choix pour l'étude de maladies neurodégénératives puisque la mise en place des mécanismes délétères ou compensatoires peut, en théorie, s'observer. Cependant, modéliser l'évolution d'une pathologie et la vieillesse cellulaire reste difficile dans un modèle *in vitro*. L'âge que peuvent représenter les hESC n'est d'ailleurs pas véritablement établi et les cellules dérivées peuvent être trop immatures pour voir un phénotype d'avancement pathologique tardif.

L'avantage principal des hESC est de pouvoir de travailler dans un contexte génétique humain, facilitant la découverte de gènes dont les mécanismes de régulation sont peut être plus appropriés que chez la souris ou la drosophile. Certaines pathologies sont difficilement modélisables chez la souris comme la SMA (*Spinal Muscular Atrophy*). Cette pathologie résulte d'une mutation récessive du gène *SMN1* (*Survival of Motor Neuron 1*), gène impliqué dans la biogenèse du spliceosome. Le génome humain contient également le gène *SMN2* résultant d'une transition C→T dans l'exon 7 qui entraîne son épissage alternatif. Le gène *SMN2* encode pour 10 à 20% de protéines fonctionnelles qui correspondraient à une sauvegarde en cas de perte de fonction de *SMN1* (Sumner 2007). Comme les humains sont les seuls à posséder le gène *SMN2*, la modélisation murine de cette pathologie reste difficile et rend nécessaire d'humaniser les modèles. Cependant, les hESC ont cet inconvénient majeur de ne rendre compte ni de la complexité d'un organisme ni des systèmes de régulation associés à l'environnement tissulaire. De plus, l'utilisation des hESCs dites pathologiques ne peut pas permettre de refléter la pénétrance généralement associées aux maladies génétiques, ni à la variabilité clinique. Ainsi, de par le fort nombre de répétitions CTG, les deux lignées hESC_DM1 que nous avons utilisé doivent représenter des formes sévères de DM1 mais ce point ne sera que putatif.

Finalement depuis cinq ans, peu d'études démontrent l'utilisation des hESC comme modèle d'étude pathologique. Ceci est du en partie aux tests génétiques réalisés lors d'un DPI restreints à quelques pathologies et limitant le nombre de modèles accessibles. Le groupe de Benvenisti a été le premier à illustrer ce concept en utilisant des hESC modèle pour le

syndrome de l’X fragile (Eiges, Urbach et al. 2007). Cette étude a révélé l’importance de ce nouveau système cellulaire pour mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques précoces du développement. Depuis, d’autres pathologies ont été modélisées grâce aux hESC : la maladie de Huntington (HD), le syndrome de Turner ou encore la myopathie tubulaire liée à l’X (Gauthier, Maury et al. 2011) Cependant, la majorité de ces études se sont limitées à la description des biomarqueurs connus des pathologies sans proposer de nouveaux mécanismes capables d’expliquer les phénotypes de la maladie.

Approche à large échelle vs approche ciblée

L’étude des mécanismes par lesquels une mutation contribue à une maladie peut être décidée de manière différente en utilisant les hESC. On peut utiliser l’approche « *ressource driven* » c’est-à-dire prendre avantage de la ressource par sa facilité d’utilisation, sa quantité ou sa pertinence pour rechercher sans « *a priori* » des différences entre les cellules normales et mutées par une méthode exhaustive comme le transcriptome ou le protéome dans le but d’identifier des gènes ou des protéines modulés pouvant refléter l’action pathologique ou compensatrice de la mutation sur des voies métaboliques. Cette stratégie est potentiellement très puissante car elle permet d’extraire de la masse d’informations que représentent les modulations simultanées de près de 25.000 gènes celles pouvant être reliées à la présence de la mutation. Récemment, une autre équipe du laboratoire ISTEM a utilisé l’approche transcriptomique sur des hESC modèles pour la maladie de Huntington. Celle-ci leur a permis de mettre en évidence et de valider trois gènes particulièrement affectés dans des populations neurales issues d’hESC_HD et qui représentent des nouveaux biomarqueurs HD (Feyeux, Bourgois-Rocha et al. 2012).

Ce type d’approche exhaustive à partir de populations cellulaires parfaitement définies permet donc d’identifier de nouveaux biomarqueurs potentiels et de les relier à un phénotype pathologique ouvrant ainsi de nouvelles pistes pour la compréhension des mécanismes de la maladie. En revanche, il est souhaitable de combiner cette approche avec celle appelée « *hypothesis driven* » dont la recherche de phénotypes informatifs peut alors être facilitée si elle se fonde sur des données solides publiées dans la littérature et des connaissances approfondies de la pathologie. Ces deux approches peuvent être intéressantes, mon travail de thèse démontrant que les deux ne sont pas exclusives mais complémentaires. L’approche transcriptomique (*ressource-driven*) nous a permis d’établir une liste de nombreux gènes dérégulés dont *SLITRK4* et *ZNF37A*. Mais c’est par la découverte du rôle des *SLITRK* dans la

DM1 et la littérature que nous nous sommes intéressés à l'EphA5 (*hypothesis-driven*) ce qui nous a permis de découvrir une nouvelle altération a priori neural dans la DM1, champ d'investigation encore peu étudié.

On peut toutefois s'interroger sur la difficulté de ces deux approches. Le transcriptome a certes permis de mettre en évidence une liste de nombreux gènes dérégulés, mais dont un certain nombre étaient inconnus et dont le défaut était difficilement transposable à la pathologie. Le choix du gène à étudier a été une balance entre la connaissance du gène, sa possible implication dans la pathologie et la pertinence de son altération. Par exemple *ZNF37A* semblait d'autant plus intéressant qu'il était dérégulé dans les trois stades de différenciation des hESC utilisées lors du transcriptome, et donc pouvait représenter potentiellement un nouveau biomarqueur de la pathologie. Comme dit précédemment, le rôle de *ZNF37A* n'était pas décrit, nécessitant de commencer une étude sur un gène dont les mécanismes de régulation et le rôle physiopathologique étaient complètement inconnus. Nous avons fait le pari d'étudier ce gène et avons réussi à identifier son implication dans la myogenèse. Ces obstacles ont été bien moindres dans le cas de l'EphA5. Bien que nous n'ayons pas encore montré l'implication directe de ce gène dans les altérations cognitives de la DM1, le rôle de l'EphA5 est suffisamment connue dans le système neuronal pour associer son altération aux défauts des patients DM1.

Pour conclure ces deux approches forment une balance entre une découverte exhaustive de potentiels biomarqueurs pas très bien connus et le choix précis d'un gène qui nécessite une littérature scientifique conséquente et pertinente.

La limitation de l'accès aux lignées hESC du au DPI peut être contourné par les récentes cellules induites à la pluripotentes (iPSC). En plus de la question éthique posée par les hESC, ces cellules offrent un énorme potentiel quant aux choix de pathologies à étudier. En effet des iPSC d'a priori n'importe quelle pathologie, qu'elle soit rare ou non, monogénique ou polygénique, peut être générés en reprogrammant des cellules somatiques par l'expression forcée de facteurs de pluripotence. Ceci est un atout majeur pour la comparaison avec des échantillons humains puisque contrairement aux hESC, il est suggéré que les iPSC sont plus proches du profil des patients.

Il est de plus en plus admis que les études mécanistiques sur les cellules pluripotentes nécessitent de valider les résultats dans différentes lignées de cellules contrôles et mutantes. Les cellules iPSC permettent d'augmenter le nombre de lignées de cellules pluripotentes

pathologiques par rapport aux hESC. Ceci est un avantage majeur puisque répliquer les perturbations dans des cellules avec un fond génétique différent permet de « lisser » les variabilités inter-individus. Le nombre de modèles iPSC pathologiques est beaucoup plus conséquents (une trentaine) que les hESC (une dizaine) et ceci est dû à la facilité de génération et l'accessibilité de ces cellules.

Comme les hESC, les iPSC sont un modèle supplémentaire pour l'étude physiopathologique et malgré la pression visant à réduire l'expérimentation animale, limiter le nombre de modèles ayant fait ses preuves serait contre-productif pour les connaissances générales de la pathologie et pour la recherche thérapeutique.

Démarrer un projet de modélisation pathologique

Même si hypothétiquement toute pathologie peut être modélisée grâce aux cellules pluripotentes, une certaine prudence est à garder quant à la faisabilité du projet et certaines questions doivent être posées autant que faire se peut au démarrage.

-Quel type de maladie modéliser ?

De façon pragmatique, la difficulté de l'étude d'une pathologie peut être partiellement anticipée par le choix de la maladie. Evidemment, toute maladie mériterait d'être étudiée et le but de ces interrogations n'est pas de faire de la « ségrégation pathologique » mais d'optimiser les possibilités techniques actuelles. Il apparaît clairement que les maladies monogéniques sont, du moins en théorie plus « simples » à étudier que des pathologies multigéniques ou impliquant des facteurs environnementaux. Par exemple pour la DM1, une seule mutation est capable d'entraîner plusieurs altérations géniques responsables de son caractère multisystémique. Finalement, est-t-il prudent d'étudier une pathologie avec de nombreux facteurs originels ou une pathologie dont la variabilité inter-individu (mutations différentes, environnement...) rendra complexe le croisement et la reproductibilité des informations biologiques ? Par exemple, un modèle iPSC de la schizophrénie a été modélisé récemment (Brennan, Simone et al. 2011). Cette maladie neuropsychiatrique est caractérisée par un trouble de la personnalité dont les causes sont multiples (génétiques, environnementales, psychologiques, neurobiologiques ou encore sociales) et peu connus. Cependant, l'absence de base génétique clairement identifiée rend complexe l'interprétation des résultats et pose la problématique de la relation génotype/phénotype.

Il apparait clairement que le type cellulaire affecté doit être pris en compte. Comme je l'ai mentionné, il n'existe à l'heure actuelle aucun protocole robuste de différenciation des cellules souches pluripotentes humaines en cellules myogéniques. Pour *ZNF37A*, nous avons pu contourner ce problème grâce à l'existence de cultures primaires de myotubes issus de patients. Ceci amène à la question suivante : est-ce que les maladies multisystémiques sont plus facilement modélisables ?

-Est-ce que les contrôles nécessaires à l'étude sont faciles d'obtention?

La modélisation pathologique implique de comparer et de valider les résultats avec d'autres modèles existants qu'ils soient animaux ou humains. Finalement, une des difficultés de mon projet sur *ZNF37A* a été de ne pas pouvoir le valider dans les nombreux modèles animaux DM1 de part l'absence d'orthologues.

De plus, la nécessité d'avoir accès à ces modèles par l'insertion dans un consortium est à mon sens vital. La proximité avec des chercheurs du domaine de la pathologie est nécessaire puisqu'ils peuvent apporter leurs expertises et une alternative pour la discussion et la validation des résultats. Ceci permet d'une part de gagner un temps précieux et d'augmenter la pertinence des résultats mais surtout de faire avancer les connaissances générales de la communauté scientifique. Pour mes différents projets, de nombreuses collaborations ont été effectuées et ont été enrichissantes d'un point de vue scientifique, tant par l'obtention d'autres modèles et autres techniques, que par les réflexions et discussions des résultats.

En conclusion, l'ensemble de ce travail m'a permis d'aborder une thématique à mon sens très intéressante : l'utilisation des cellules souches embryonnaires humaines modèles pour découvrir de nouveaux mécanismes pathologiques. Ce projet m'a, en particulier, permis de voir les limitations et les avantages de ces nouveaux outils cellulaires et bien qu'ils aient certains inconvénients, l'accès à de telles sources d'informations permet de développer des connaissances dans de nombreuses sphères biologiques. En effet, les possibilités d'utilisation de ces cellules sont extrêmement variées puisqu'elles peuvent être utilisées autant pour de la recherche fondamentale que pour de la recherche appliquée : étude du développement embryonnaire, thérapie cellulaire, modélisation pathologique, pharmacologie...Le nombre croissant d'études sur ces cellules, ces

dernières années, permet une meilleure connaissance et compréhension de leurs mécanismes qui profite à chacun de ces domaines. L'utilisation de ce type de cellules comme outil biologique pour l'étude des maladies génétiques et la recherche de nouveaux médicaments offrira très certainement une nouvelle alternative pour apporter rapidement aux malades des solutions thérapeutiques.

Références

- Abe, K., H. Fujimura, et al. (1994). "Involvement of the central nervous system in myotonic dystrophy." J Neurol Sci **127**(2): 179-185.
- Akaneya, Y., K. Sohya, et al. (2010). "Ephrin-A5 and EphA5 interaction induces synaptogenesis during early hippocampal development." PLoS One **5**(8): e12486.
- Amack, J. D., S. R. Reagan, et al. (2002). "Mutant DMPK 3'-UTR transcripts disrupt C2C12 myogenic differentiation by compromising MyoD." J Cell Biol **159**(3): 419-429.
- Amit, M. and J. Itskovitz-Eldor (2002). "Derivation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells." J Anat **200**(Pt 3): 225-232.
- Antonini, G., C. Mainero, et al. (2004). "Cerebral atrophy in myotonic dystrophy: a voxel based morphometric study." J Neurol Neurosurg Psychiatry **75**(11): 1611-1613.
- Arambula, J. F., S. R. Ramisetty, et al. (2009). "A simple ligand that selectively targets CUG trinucleotide repeats and inhibits MBNL protein binding." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(38): 16068-16073.
- Armstrong, L., O. Hughes, et al. (2006). "The role of PI3K/AKT, MAPK/ERK and NFkappabeta signalling in the maintenance of human embryonic stem cell pluripotency and viability highlighted by transcriptional profiling and functional analysis." Hum Mol Genet **15**(11): 1894-1913.
- Artero, R., A. Prokop, et al. (1998). "The muscleblind gene participates in the organization of Z-bands and epidermal attachments of Drosophila muscles and is regulated by Dmef2." Dev Biol **195**(2): 131-143.
- Aruga, J. and K. Mikoshiba (2003). "Identification and characterization of Slitrk, a novel neuronal transmembrane protein family controlling neurite outgrowth." Mol Cell Neurosci **24**(1): 117-129.
- Aruga, J., N. Yokota, et al. (2003). "Human SLITRK family genes: genomic organization and expression profiling in normal brain and brain tumor tissue." Gene **315**: 87-94.
- Ashizawa, T., M. Anvret, et al. (1994). "Characteristics of intergenerational contractions of the CTG repeat in myotonic dystrophy." Am J Hum Genet **54**(3): 414-423.
- Aslanidis, C., G. Jansen, et al. (1992). "Cloning of the essential myotonic dystrophy region and mapping of the putative defect." Nature **355**(6360): 548-551.
- Avilion, A. A., S. K. Nicolis, et al. (2003). "Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function." Genes Dev **17**(1): 126-140.
- Axford, M. M., A. Lopez-Castel, et al. (2011). "Replacement of the myotonic dystrophy type 1 CTG repeat with 'non-CTG repeat' insertions in specific tissues." J Med Genet **48**(7): 438-443.
- Babaie, Y., R. Herwig, et al. (2007). "Analysis of Oct4-dependent transcriptional networks regulating self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells." Stem Cells **25**(2): 500-510.
- Bae, J. S., S. G. Kim, et al. (2011). "Peripheral nerve axon involvement in myotonic dystrophy type 1, measured using the automated nerve excitability test." J Clin Neurol **7**(2): 90-95.
- Baharvand, H., S. K. Ashtiani, et al. (2004). "Establishment and in vitro differentiation of a new embryonic stem cell line from human blastocyst." Differentiation **72**(5): 224-229.
- Barton-Davis, E. R., D. I. Shoturma, et al. (1998). "Viral mediated expression of insulin-like growth factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15603-15607.
- Batten, F. E. and H. P. Gibb (1909). "Two Cases of Myotonia Atrophica, showing a peculiar Distribution of Muscular Atrophy." Proc R Soc Med **2**(Neurol Sect): 32-33.
- Beaulieu, D., P. Thebault, et al. (2012). "Abnormal prostaglandin E2 production blocks myogenic differentiation in myotonic dystrophy." Neurobiol Dis **45**(1): 122-129.

- Beffy, P., R. Del Carratore, et al. (2010). "Altered signal transduction pathways and induction of autophagy in human myotonic dystrophy type 1 myoblasts." Int J Biochem Cell Biol **42**(12): 1973-1983.
- Begemann, G., N. Paricio, et al. (1997). "muscleblind, a gene required for photoreceptor differentiation in *Drosophila*, encodes novel nuclear Cys3His-type zinc-finger-containing proteins." Development **124**(21): 4321-4331.
- Benders, A. A., P. J. Groenen, et al. (1997). "Myotonic dystrophy protein kinase is involved in the modulation of the Ca²⁺ homeostasis in skeletal muscle cells." J Clin Invest **100**(6): 1440-1447.
- Bentzinger, C. F., Y. X. Wang, et al. (2012). "Building muscle: molecular regulation of myogenesis." Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(2).
- Berger, D. S. and A. N. Ladd (2012). "Repression of nuclear CELF activity can rescue CELF-regulated alternative splicing defects in skeletal muscle models of myotonic dystrophy." PLoS Curr **4**: RRN1305.
- Bernardo, A. S., T. Faial, et al. (2011). "BRACHYURY and CDX2 mediate BMP-induced differentiation of human and mouse pluripotent stem cells into embryonic and extraembryonic lineages." Cell Stem Cell **9**(2): 144-155.
- Bigot, A., A. F. Klein, et al. (2009). "Large CTG repeats trigger p16-dependent premature senescence in myotonic dystrophy type 1 muscle precursor cells." Am J Pathol **174**(4): 1435-1442.
- Botta, A., L. Vallo, et al. (2007). "Gene expression analysis in myotonic dystrophy: indications for a common molecular pathogenic pathway in DM1 and DM2." Gene Expr **13**(6): 339-351.
- Boucher, C. A., S. K. King, et al. (1995). "A novel homeodomain-encoding gene is associated with a large CpG island interrupted by the myotonic dystrophy unstable (CTG)n repeat." Hum Mol Genet **4**(10): 1919-1925.
- Boyer, L. A., T. I. Lee, et al. (2005). "Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells." Cell **122**(6): 947-956.
- Brennan, K. J., A. Simone, et al. (2011). "Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells." Nature **473**(7346): 221-225.
- Brook, J. D., M. E. McCurrach, et al. (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 **69**(2): 385.
- Brownlee, H., P. P. Gao, et al. (2000). "Multiple ephrins regulate hippocampal neurite outgrowth." J Comp Neurol **425**(2): 315-322.
- Brunner, H. G., H. T. Bruggenwirth, et al. (1993). "Influence of sex of the transmitting parent as well as of parental allele size on the CTG expansion in myotonic dystrophy (DM)." Am J Hum Genet **53**(5): 1016-1023.
- Buckingham, M. (2007). "Skeletal muscle progenitor cells and the role of Pax genes." C R Biol **330**(6-7): 530-533.
- Buj-Bello, A., D. Furling, et al. (2002). "Muscle-specific alternative splicing of myotubularin-related 1 gene is impaired in DM1 muscle cells." Hum Mol Genet **11**(19): 2297-2307.
- Buxton, J., P. Shelbourne, et al. (1992). "Detection of an unstable fragment of DNA specific to individuals with myotonic dystrophy." Nature **355**(6360): 547-548.
- Chambers, I., D. Colby, et al. (2003). "Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells." Cell **113**(5): 643-655.
- Chang, L., T. Anderson, et al. (1993). "Cerebral abnormalities in myotonic dystrophy. Cerebral blood flow, magnetic resonance imaging, and neuropsychological tests." Arch Neurol **50**(9): 917-923.

- Charlet, B. N., R. S. Savkur, et al. (2002). "Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing." *Mol Cell* **10**(1): 45-53.
- Chaudhary, J. and M. K. Skinner (1999). "Basic helix-loop-helix proteins can act at the E-box within the serum response element of the c-fos promoter to influence hormone-induced promoter activation in Sertoli cells." *Mol Endocrinol* **13**(5): 774-786.
- Chen, C. Z., K. Sobczak, et al. (2012). "Two high-throughput screening assays for aberrant RNA-protein interactions in myotonic dystrophy type 1." *Anal Bioanal Chem* **402**(5): 1889-1898.
- Cheng, H. J., M. Nakamoto, et al. (1995). "Complementary gradients in expression and binding of ELF-1 and Mek4 in development of the topographic retinotectal projection map." *Cell* **82**(3): 371-381.
- Cheyette, B. N., P. J. Green, et al. (1994). "The *Drosophila sine oculis* locus encodes a homeodomain-containing protein required for the development of the entire visual system." *Neuron* **12**(5): 977-996.
- Choi, D. K., T. Ito, et al. (1998). "Fluorescent differential display analysis of gene expression in apoptotic neuroblastoma cells." *Gene* **223**(1-2): 21-31.
- Cirak, S., V. Arechavala-Gomez, et al. (2011). "Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study." *Lancet* **378**(9791): 595-605.
- Claassen, D. A. and R. S. Lahue (2007). "Expansions of CAG.CTG repeats in immortalized human astrocytes." *Hum Mol Genet* **16**(24): 3088-3096.
- Cleary, J. D., K. Nichol, et al. (2002). "Evidence of cis-acting factors in replication-mediated trinucleotide repeat instability in primate cells." *Nat Genet* **31**(1): 37-46.
- Cleary, J. D., S. Tome, et al. (2010). "Tissue- and age-specific DNA replication patterns at the CTG/CAG-expanded human myotonic dystrophy type 1 locus." *Nat Struct Mol Biol* **17**(9): 1079-1087.
- Cobo, A. M., M. Baiget, et al. (1993). "Sex-related difference in intergenerational expansion of myotonic dystrophy gene." *Lancet* **341**(8853): 1159-1160.
- Cooke, J. E. and C. B. Moens (2002). "Boundary formation in the hindbrain: Eph only it were simple." *Trends Neurosci* **25**(5): 260-267.
- Dansithong, W., S. Paul, et al. (2005). "MBNL1 is the primary determinant of focus formation and aberrant insulin receptor splicing in DM1." *J Biol Chem* **280**(7): 5773-5780.
- Dansithong, W., C. M. Wolf, et al. (2008). "Cytoplasmic CUG RNA foci are insufficient to elicit key DM1 features." *PLoS One* **3**(12): e3968.
- Dasgupta, T. and A. N. Ladd (2012). "The importance of CELF control: molecular and biological roles of the CUG-BP, Elav-like family of RNA-binding proteins." *Wiley Interdiscip Rev RNA* **3**(1): 104-121.
- Davis, B. M., M. E. McCurrach, et al. (1997). "Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of myotonic dystrophy protein kinase transcripts results in nuclear retention of transcripts." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(14): 7388-7393.
- Davis, R. L., H. Weintraub, et al. (1987). "Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts." *Cell* **51**(6): 987-1000.
- Day, J. W. and L. P. Ranum (2005). "Genetics and molecular pathogenesis of the myotonic dystrophies." *Curr Neurol Neurosci Rep* **5**(1): 55-59.
- Day, J. W. and L. P. Ranum (2005). "RNA pathogenesis of the myotonic dystrophies." *Neuromuscul Disord* **15**(1): 5-16.

- Day, J. W., K. Ricker, et al. (2003). "Myotonic dystrophy type 2: molecular, diagnostic and clinical spectrum." Neurology **60**(4): 657-664.
- de Haro, M., I. Al-Ramahi, et al. (2006). "MBNL1 and CUGBP1 modify expanded CUG-induced toxicity in a Drosophila model of myotonic dystrophy type 1." Hum Mol Genet **15**(13): 2138-2145.
- de Leon, M. B. and B. Cisneros (2008). "Myotonic dystrophy 1 in the nervous system: from the clinic to molecular mechanisms." J Neurosci Res **86**(1): 18-26.
- Delorme, B., J. Ringe, et al. (2009). "Specific lineage-priming of bone marrow mesenchymal stem cells provides the molecular framework for their plasticity." Stem Cells **27**(5): 1142-1151.
- Denis, J. A., C. Rochon-Beaucourt, et al. (2011). "Global transcriptional profiling of neural and mesenchymal progenitors derived from human embryonic stem cells reveals alternative developmental signaling pathways." Stem Cells Dev **20**(8): 1395-1409.
- Dhaenens, C. M., S. Schraen-Maschke, et al. (2008). "Overexpression of MBNL1 fetal isoforms and modified splicing of Tau in the DM1 brain: two individual consequences of CUG trinucleotide repeats." Exp Neurol **210**(2): 467-478.
- Dhaenens, C. M., H. Tran, et al. (2011). "Mis-splicing of Tau exon 10 in myotonic dystrophy type 1 is reproduced by overexpression of CELF2 but not by MBNL1 silencing." Biochim Biophys Acta **1812**(7): 732-742.
- Di Costanzo, A., M. de Cristofaro, et al. (2009). "Paternaly inherited case of congenital DM1: brain MRI and review of literature." Brain Dev **31**(1): 79-82.
- Di Costanzo, A., F. Di Salle, et al. (2002). "Pattern and significance of white matter abnormalities in myotonic dystrophy type 1: an MRI study." J Neurol **249**(9): 1175-1182.
- Dravid, G., Z. Ye, et al. (2005). "Defining the role of Wnt/beta-catenin signaling in the survival, proliferation, and self-renewal of human embryonic stem cells." Stem Cells **23**(10): 1489-1501.
- Du, H., M. S. Cline, et al. (2010). "Aberrant alternative splicing and extracellular matrix gene expression in mouse models of myotonic dystrophy." Nat Struct Mol Biol **17**(2): 187-193.
- Dvorak, P. and A. Hampl (2005). "Basic fibroblast growth factor and its receptors in human embryonic stem cells." Folia Histochem Cytobiol **43**(4): 203-208.
- Ebralidze, A., Y. Wang, et al. (2004). "RNA leaching of transcription factors disrupts transcription in myotonic dystrophy." Science **303**(5656): 383-387.
- Eiges, R., A. Urbach, et al. (2007). "Developmental study of fragile X syndrome using human embryonic stem cells derived from preimplantation genetically diagnosed embryos." Cell Stem Cell **1**(5): 568-577.
- Eiselleova, L., K. Matulka, et al. (2009). "A complex role for FGF-2 in self-renewal, survival, and adhesion of human embryonic stem cells." Stem Cells **27**(8): 1847-1857.
- Eiselleova, L., I. Peterkova, et al. (2008). "Comparative study of mouse and human feeder cells for human embryonic stem cells." Int J Dev Biol **52**(4): 353-363.
- Faenza, I., W. Blalock, et al. (2012). "A role for PLCbeta1 in myotonic dystrophies type 1 and 2." FASEB J.
- Fardaei, M., K. Larkin, et al. (2001). "In vivo co-localisation of MBNL protein with DMPK expanded-repeat transcripts." Nucleic Acids Res **29**(13): 2766-2771.
- Fardaei, M., M. T. Rogers, et al. (2002). "Three proteins, MBNL, MBLL and MBXL, co-localize in vivo with nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells." Hum Mol Genet **11**(7): 805-814.
- Farrell, B. T. and R. S. Lahue (2006). "CAG*CTG repeat instability in cultured human astrocytes." Nucleic Acids Res **34**(16): 4495-4505.

- Faustino, N. A. and T. A. Cooper (2005). "Identification of putative new splicing targets for ETR-3 using sequences identified by systematic evolution of ligands by exponential enrichment." *Mol Cell Biol* **25**(3): 879-887.
- Feyeux, M., F. Bourgois-Rocha, et al. (2012). "Early transcriptional changes linked to naturally occurring Huntington's disease mutations in neural derivatives of human embryonic stem cells." *Hum Mol Genet*.
- Filippova, G. N., C. P. Thienes, et al. (2001). "CTCF-binding sites flank CTG/CAG repeats and form a methylation-sensitive insulator at the DM1 locus." *Nat Genet* **28**(4): 335-343.
- Flanagan, J. G. and P. Vanderhaeghen (1998). "The ephrins and Eph receptors in neural development." *Annu Rev Neurosci* **21**: 309-345.
- Foff, E. P. and M. S. Mahadevan (2011). "Therapeutics development in myotonic dystrophy type 1." *Muscle Nerve* **44**(2): 160-169.
- Foiry, L., L. Dong, et al. (2006). "Msh3 is a limiting factor in the formation of intergenerational CTG expansions in DM1 transgenic mice." *Hum Genet* **119**(5): 520-526.
- Franc, D. T., R. L. Muetzel, et al. (2012). "Cerebral and muscle MRI abnormalities in myotonic dystrophy." *Neuromuscul Disord* **22**(6): 483-491.
- Francois, V., A. F. Klein, et al. (2011). "Selective silencing of mutated mRNAs in DM1 by using modified hU7-snRNAs." *Nat Struct Mol Biol* **18**(1): 85-87.
- Fu, Y. H., D. L. Friedman, et al. (1993). "Decreased expression of myotonin-protein kinase messenger RNA and protein in adult form of myotonic dystrophy." *Science* **260**(5105): 235-238.
- Fu, Y. H., A. Pizzuti, et al. (1992). "An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy." *Science* **255**(5049): 1256-1258.
- Fugier, C., A. F. Klein, et al. (2011). "Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy." *Nat Med* **17**(6): 720-725.
- Fukuda, H., J. Horiguchi, et al. (2005). "Diffusion tensor imaging of cerebral white matter in patients with myotonic dystrophy." *Acta Radiol* **46**(1): 104-109.
- Furling, D., L. Coiffier, et al. (2001). "Defective satellite cells in congenital myotonic dystrophy." *Hum Mol Genet* **10**(19): 2079-2087.
- Furling, D., G. Doucet, et al. (2003). "Viral vector producing antisense RNA restores myotonic dystrophy myoblast functions." *Gene Ther* **10**(9): 795-802.
- Furling, D., T. Lam le, et al. (2003). "Changes in myotonic dystrophy protein kinase levels and muscle development in congenital myotonic dystrophy." *Am J Pathol* **162**(3): 1001-1009.
- Furling, D., D. Lemieux, et al. (2001). "Decreased levels of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) and delayed differentiation in human myotonic dystrophy myoblasts." *Neuromuscul Disord* **11**(8): 728-735.
- Furukawa, N., P. Ongusaha, et al. (2005). "Role of Rho-kinase in regulation of insulin action and glucose homeostasis." *Cell Metab* **2**(2): 119-129.
- Gale, N. W., S. J. Holland, et al. (1996). "Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis." *Neuron* **17**(1): 9-19.
- Gao, P. P., C. H. Sun, et al. (2000). "Ephrins stimulate or inhibit neurite outgrowth and survival as a function of neuronal cell type." *J Neurosci Res* **60**(4): 427-436.
- Gao, P. P., Y. Yue, et al. (1998). "Regulation of thalamic neurite outgrowth by the Eph ligand ephrin-A5: implications in the development of thalamocortical projections." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(9): 5329-5334.

- Gao, P. P., J. H. Zhang, et al. (1996). "Regulation of topographic projection in the brain: Elf-1 in the hippocamposeptal system." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(20): 11161-11166.
- Garcia-Lopez, A., B. Llamusi, et al. (2011). "In vivo discovery of a peptide that prevents CUG-RNA hairpin formation and reverses RNA toxicity in myotonic dystrophy models." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(29): 11866-11871.
- Gareiss, P. C., K. Sobczak, et al. (2008). "Dynamic combinatorial selection of molecules capable of inhibiting the (CUG) repeat RNA-MBNL1 interaction in vitro: discovery of lead compounds targeting myotonic dystrophy (DM1)." J Am Chem Soc **130**(48): 16254-16261.
- Gaul, C., T. Schmidt, et al. (2006). "Subtle cognitive dysfunction in adult onset myotonic dystrophy type 1 (DM1) and type 2 (DM2)." Neurology **67**(2): 350-352.
- Gauthier, M., Y. Maury, et al. (2011). "Human pluripotent stem cells for genetic disease modeling and drug screening." Regen Med **6**(5): 607-622.
- Gentile, A., G. Toietta, et al. (2011). "Human epicardium-derived cells fuse with high efficiency with skeletal myotubes and differentiate toward the skeletal muscle phenotype: a comparison study with stromal and endothelial cells." Mol Biol Cell **22**(5): 581-592.
- Giorgio, A., M. T. Dotti, et al. (2006). "Cortical damage in brains of patients with adult-form of myotonic dystrophy type 1 and no or minimal MRI abnormalities." J Neurol **253**(11): 1471-1477.
- Giraud-Triboult, K., C. Rochon-Beaucourt, et al. (2011). "Combined mRNA and microRNA profiling reveals that miR-148a and miR-20b control human mesenchymal stem cell phenotype via EPAS1." Physiol Genomics **43**(2): 77-86.
- Glisovic, T., J. L. Bachorik, et al. (2008). "RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation." FEBS Lett **582**(14): 1977-1986.
- Goers, E. S., J. Purcell, et al. (2010). "MBNL1 binds GC motifs embedded in pyrimidines to regulate alternative splicing." Nucleic Acids Res **38**(7): 2467-2484.
- Gomes-Pereira, M., T. A. Cooper, et al. (2011). "Myotonic dystrophy mouse models: towards rational therapy development." Trends Mol Med **17**(9): 506-517.
- Gomes-Pereira, M., L. Foiry, et al. (2007). "CTG trinucleotide repeat "big jumps": large expansions, small mice." PLoS Genet **3**(4): e52.
- Gomes-Pereira, M. and D. G. Monckton (2006). "Chemical modifiers of unstable expanded simple sequence repeats: what goes up, could come down." Mutat Res **598**(1-2): 15-34.
- Gonitel, R., H. Moffitt, et al. (2008). "DNA instability in postmitotic neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(9): 3467-3472.
- Good, P. J., Q. Chen, et al. (2000). "A family of human RNA-binding proteins related to the Drosophila Bruno translational regulator." J Biol Chem **275**(37): 28583-28592.
- Gorbunova, V., A. Seluanov, et al. (2004). "Genome-wide demethylation destabilizes CTG.CAG trinucleotide repeats in mammalian cells." Hum Mol Genet **13**(23): 2979-2989.
- Greber, B., H. Lehrach, et al. (2007). "Fibroblast growth factor 2 modulates transforming growth factor beta signaling in mouse embryonic fibroblasts and human ESCs (hESCs) to support hESC self-renewal." Stem Cells **25**(2): 455-464.
- Grifone, R., J. Demignon, et al. (2005). "Six1 and Six4 homeoproteins are required for Pax3 and Mrf expression during myogenesis in the mouse embryo." Development **132**(9): 2235-2249.
- Griggs, R. C., R. Jozefowicz, et al. (1990). "Mechanism of muscle wasting in myotonic dystrophy." Ann Neurol **27**(5): 505-512.

- Grimby, G., M. Hedberg, et al. (1988). "Muscle function and morphology in myotonic dystrophy." Acta Med Scand **224**(4): 349-356.
- Gromak, N., A. J. Matlin, et al. (2003). "Antagonistic regulation of alpha-actinin alternative splicing by CELF proteins and polypyrimidine tract binding protein." RNA **9**(4): 443-456.
- Hagerman, P. J. and R. J. Hagerman (2004). "Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS)." Ment Retard Dev Disabil Res Rev **10**(1): 25-30.
- Hao, M., K. Akrami, et al. (2008). "Muscleblind-like 2 (Mbnl2) -deficient mice as a model for myotonic dystrophy." Dev Dyn **237**(2): 403-410.
- Harley, H. G., J. D. Brook, et al. (1992). "Expansion of an unstable DNA region and phenotypic variation in myotonic dystrophy." Nature **355**(6360): 545-546.
- Harmon, E. B., M. L. Harmon, et al. (2008). "Myotonic dystrophy protein kinase is expressed in embryonic myocytes and is required for myotube formation." Dev Dyn **237**(9): 2353-2366.
- Hashimoto, T., M. Tayama, et al. (1995). "Proton magnetic resonance spectroscopy of brain in congenital myotonic dystrophy." Pediatr Neurol **12**(4): 335-340.
- Heatwole, C. R., K. J. Eichinger, et al. (2011). "Open-label trial of recombinant human insulin-like growth factor 1/recombinant human insulin-like growth factor binding protein 3 in myotonic dystrophy type 1." Arch Neurol **68**(1): 37-44.
- Heins, N., M. C. Englund, et al. (2004). "Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells." Stem Cells **22**(3): 367-376.
- Hernandez-Hernandez, O., M. Bermudez-de-Leon, et al. (2006). "Myotonic dystrophy expanded CUG repeats disturb the expression and phosphorylation of tau in PC12 cells." J Neurosci Res **84**(4): 841-851.
- Hilton-Jones, D., M. Bowler, et al. (2012). "Modafinil for excessive daytime sleepiness in myotonic dystrophy type 1 - The patients' perspective." Neuromuscul Disord.
- Himanen, J. P. and D. B. Nikolov (2003). "Eph receptors and ephrins." Int J Biochem Cell Biol **35**(2): 130-134.
- Himanen, J. P., K. R. Rajashankar, et al. (2001). "Crystal structure of an Eph receptor-ephrin complex." Nature **414**(6866): 933-938.
- Hinman, M. N. and H. Lou (2008). "Diverse molecular functions of Hu proteins." Cell Mol Life Sci **65**(20): 3168-3181.
- Ho, T. H., D. Bundman, et al. (2005). "Transgenic mice expressing CUG-BP1 reproduce splicing mis-regulation observed in myotonic dystrophy." Hum Mol Genet **14**(11): 1539-1547.
- Ho, T. H., B. N. Charlet, et al. (2004). "Muscleblind proteins regulate alternative splicing." EMBO J **23**(15): 3103-3112.
- Hoffman, L. M. and M. K. Carpenter (2005). "Characterization and culture of human embryonic stem cells." Nat Biotechnol **23**(6): 699-708.
- Holmberg, J., D. L. Clarke, et al. (2000). "Regulation of repulsion versus adhesion by different splice forms of an Eph receptor." Nature **408**(6809): 203-206.
- Holmes, S. E., E. O. Hearn, et al. (2001). "SCA12: an unusual mutation leads to an unusual spinocerebellar ataxia." Brain Res Bull **56**(3-4): 397-403.
- Holt, I., V. Jacquemin, et al. (2009). "Muscleblind-like proteins: similarities and differences in normal and myotonic dystrophy muscle." Am J Pathol **174**(1): 216-227.
- Horsley, V., K. M. Jansen, et al. (2003). "IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth." Cell **113**(4): 483-494.
- Huber, S. J., J. T. Kissel, et al. (1989). "Magnetic resonance imaging and clinical correlates of intellectual impairment in myotonic dystrophy." Arch Neurol **46**(5): 536-540.

- Hund, E., O. Jansen, et al. (1997). "Proximal myotonic myopathy with MRI white matter abnormalities of the brain." Neurology **48**(1): 33-37.
- Huot, J. (2004). "Ephrin signaling in axon guidance." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **28**(5): 813-818.
- Hwang, W. S., S. I. Roh, et al. (2005). "Patient-specific embryonic stem cells derived from human SCNT blastocysts." Science **308**(5729): 1777-1783.
- Hyslop, L., M. Stojkovic, et al. (2005). "Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages." Stem Cells **23**(8): 1035-1043.
- Iakova, P., G. L. Wang, et al. (2004). "Competition of CUGBP1 and calreticulin for the regulation of p21 translation determines cell fate." EMBO J **23**(2): 406-417.
- Itoh, K., M. Mitani, et al. (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 Histochem Cytochem **43**(6): 149-156.
- Jacquemin, V., G. S. Butler-Browne, et al. (2007). "IL-13 mediates the recruitment of reserve cells for fusion during IGF-1-induced hypertrophy of human myotubes." J Cell Sci **120**(Pt 4): 670-681.
- Jaeger, C., and Riviere, H. (1993) "Dystrophie myotonique de Steinert." Monographie Myoline.
- Jansen, G., D. Bachner, et al. (1995). "Structural organization and developmental expression pattern of the mouse WD-repeat gene DMR-N9 immediately upstream of the myotonic dystrophy locus." Hum Mol Genet **4**(5): 843-852.
- Jansen, G., P. J. Groenen, et al. (1996). "Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice." Nat Genet **13**(3): 316-324.
- Jiang, H., A. Mankodi, et al. (2004). "Myotonic dystrophy type 1 is associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of muscleblind proteins and deregulated alternative splicing in neurons." Hum Mol Genet **13**(24): 3079-3088.
- Johnson, J., N. Wood, et al. (2008). "Clinical and genetic analysis of spinocerebellar ataxia type 11." Cerebellum **7**(2): 159-164.
- Jones, K., B. Jin, et al. (2011). "RNA Foci, CUGBP1, and ZNF9 are the primary targets of the mutant CUG and CCUG repeats expanded in myotonic dystrophies type 1 and type 2." Am J Pathol **179**(5): 2475-2489.
- Kaliman, P., D. Catalucci, et al. (2005). "Myotonic dystrophy protein kinase phosphorylates phospholamban and regulates calcium uptake in cardiomyocyte sarcoplasmic reticulum." J Biol Chem **280**(9): 8016-8021.
- Kaliman, P. and E. Llagostera (2008). "Myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) and its role in the pathogenesis of myotonic dystrophy 1." Cell Signal **20**(11): 1935-1941.
- Kalo, M. S. and E. B. Pasquale (1999). "Signal transfer by Eph receptors." Cell Tissue Res **298**(1): 1-9.
- Kalsotra, A., K. Wang, et al. (2010). "MicroRNAs coordinate an alternative splicing network during mouse postnatal heart development." Genes Dev **24**(7): 653-658.
- Kalsotra, A., X. Xiao, et al. (2008). "A postnatal switch of CELF and MBNL proteins reprograms alternative splicing in the developing heart." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(51): 20333-20338.
- Kanadia, R. N., K. A. Johnstone, et al. (2003). "A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy." Science **302**(5652): 1978-1980.
- Kanadia, R. N., J. Shin, et al. (2006). "Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscleblind overexpression in a mouse poly(CUG) model for myotonic dystrophy." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(31): 11748-11753.

- Kassubek, J., F. D. Juengling, et al. (2003). "Quantification of brain atrophy in patients with myotonic dystrophy and proximal myotonic myopathy: a controlled 3-dimensional magnetic resonance imaging study." Neurosci Lett **348**(2): 73-76.
- Kim, H. S., S. K. Oh, et al. (2005). "Methods for derivation of human embryonic stem cells." Stem Cells **23**(9): 1228-1233.
- Kimura, T., M. Nakamori, et al. (2005). "Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in myotonic dystrophy type 1." Hum Mol Genet **14**(15): 2189-2200.
- Kino, Y., D. Mori, et al. (2004). "Muscleblind protein, MBNL1/EXP, binds specifically to CHHG repeats." Hum Mol Genet **13**(5): 495-507.
- Kino, Y., C. Washizu, et al. (2009). "MBNL and CELF proteins regulate alternative splicing of the skeletal muscle chloride channel CLCN1." Nucleic Acids Res **37**(19): 6477-6490.
- Klein, A. F., E. Gasnier, et al. (2011). "Gain of RNA function in pathological cases: Focus on myotonic dystrophy." Biochimie **93**(11): 2006-2012.
- Klesert, T. R., D. H. Cho, et al. (2000). "Mice deficient in Six5 develop cataracts: implications for myotonic dystrophy." Nat Genet **25**(1): 105-109.
- Koebis, M., N. Ohsawa, et al. (2011). "Alternative splicing of myomesin 1 gene is aberrantly regulated in myotonic dystrophy type 1." Genes Cells **16**(9): 961-972.
- Korade-Mirnic, Z., J. Tarleton, et al. (1999). "Myotonic dystrophy: tissue-specific effect of somatic CTG expansions on allele-specific DMAHP/SIX5 expression." Hum Mol Genet **8**(6): 1017-1023.
- Kornblum, C., J. Reul, et al. (2004). "Cranial magnetic resonance imaging in genetically proven myotonic dystrophy type 1 and 2." J Neurol **251**(6): 710-714.
- Koshelev, M., S. Sarma, et al. (2010). "Heart-specific overexpression of CUGBP1 reproduces functional and molecular abnormalities of myotonic dystrophy type 1." Hum Mol Genet **19**(6): 1066-1075.
- Krol, J., A. Fiszer, et al. (2007). "Ribonuclease dicer cleaves triplet repeat hairpins into shorter repeats that silence specific targets." Mol Cell **25**(4): 575-586.
- Kullander, K. and R. Klein (2002). "Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(7): 475-486.
- Kumari, D. and K. Usdin (2009). "Chromatin remodeling in the noncoding repeat expansion diseases." J Biol Chem **284**(12): 7413-7417.
- Kuyumcu-Martinez, N. M., G. S. Wang, et al. (2007). "Increased steady-state levels of CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation." Mol Cell **28**(1): 68-78.
- Lackmann, M., A. C. Oates, et al. (1998). "Distinct subdomains of the EphA3 receptor mediate ligand binding and receptor dimerization." J Biol Chem **273**(32): 20228-20237.
- Laclef, C., G. Hamard, et al. (2003). "Altered myogenesis in Six1-deficient mice." Development **130**(10): 2239-2252.
- Ladd, A. N., N. Charlet, et al. (2001). "The CELF family of RNA binding proteins is implicated in cell-specific and developmentally regulated alternative splicing." Mol Cell Biol **21**(4): 1285-1296.
- Ladd, A. N. and T. A. Cooper (2004). "Multiple domains control the subcellular localization and activity of ETR-3, a regulator of nuclear and cytoplasmic RNA processing events." J Cell Sci **117**(Pt 16): 3519-3529.
- Ladd, A. N., N. H. Nguyen, et al. (2004). "CELF6, a member of the CELF family of RNA-binding proteins, regulates muscle-specific splicing enhancer-dependent alternative splicing." J Biol Chem **279**(17): 17756-17764.

- Ladd, A. N., G. Taffet, et al. (2005). "Cardiac tissue-specific repression of CELF activity disrupts alternative splicing and causes cardiomyopathy." *Mol Cell Biol* **25**(14): 6267-6278.
- Lafreniere, J. F., P. Mills, et al. (2006). "Interleukin-4 improves the migration of human myogenic precursor cells in vitro and in vivo." *Exp Cell Res* **312**(7): 1127-1141.
- Langlois, M. A., C. Boniface, et al. (2005). "Cytoplasmic and nuclear retained DMPK mRNAs are targets for RNA interference in myotonic dystrophy cells." *J Biol Chem* **280**(17): 16949-16954.
- Langlois, M. A., N. S. Lee, et al. (2003). "Hammerhead ribozyme-mediated destruction of nuclear foci in myotonic dystrophy myoblasts." *Mol Ther* **7**(5 Pt 1): 670-680.
- Laustriat (2010). Les cellules souches pluripotentes en modélisation pathologique pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques : application à la Dystrophie Myotonique de type 1. *Thèse*. Université Evry Val d'Essone
- Lee, J. E., C. F. Bennett, et al. (2012). "RNase H-mediated degradation of toxic RNA in myotonic dystrophy type 1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(11): 4221-4226.
- Lee, J. E. and T. A. Cooper (2009). "Pathogenic mechanisms of myotonic dystrophy." *Biochem Soc Trans* **37**(Pt 6): 1281-1286.
- Lee, M. M., J. L. Childs-Disney, et al. (2009). "Controlling the specificity of modularly assembled small molecules for RNA via ligand module spacing: targeting the RNAs that cause myotonic muscular dystrophy." *J Am Chem Soc* **131**(47): 17464-17472.
- Lee, M. M., A. Pushechnikov, et al. (2009). "Rational and modular design of potent ligands targeting the RNA that causes myotonic dystrophy 2." *ACS Chem Biol* **4**(5): 345-355.
- Lee, W. Y., D. K. Jin, et al. (2003). "Frequency analysis and clinical characterization of spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, 6, and 7 in Korean patients." *Arch Neurol* **60**(6): 858-863.
- Leeflang, E. P. and N. Arnheim (1995). "A novel repeat structure at the myotonic dystrophy locus in a 37 repeat allele with unexpectedly high stability." *Hum Mol Genet* **4**(1): 135-136.
- Leroy, O., C. M. Dhaenens, et al. (2006). "ETR-3 represses Tau exons 2/3 inclusion, a splicing event abnormally enhanced in myotonic dystrophy type I." *J Neurosci Res* **84**(4): 852-859.
- Leroy, O., J. Wang, et al. (2006). "Brain-specific change in alternative splicing of Tau exon 6 in myotonic dystrophy type 1." *Biochim Biophys Acta* **1762**(4): 460-467.
- Li, X. J., Z. W. Du, et al. (2005). "Specification of motoneurons from human embryonic stem cells." *Nat Biotechnol* **23**(2): 215-221.
- Libby, R. T., D. G. Monckton, et al. (2003). "Genomic context drives SCA7 CAG repeat instability, while expressed SCA7 cDNAs are intergenerationally and somatically stable in transgenic mice." *Hum Mol Genet* **12**(1): 41-50.
- Lin, X., J. W. Miller, et al. (2006). "Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy." *Hum Mol Genet* **15**(13): 2087-2097.
- Liquori, C. L., K. Ricker, et al. (2001). "Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9." *Science* **293**(5531): 864-867.
- Llagostera, E., D. Catalucci, et al. (2007). "Role of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) in glucose homeostasis and muscle insulin action." *PLoS One* **2**(11): e1134.
- Logigian, E. L., W. B. Martens, et al. (2010). "Mexiletine is an effective antimyotonia treatment in myotonic dystrophy type 1." *Neurology* **74**(18): 1441-1448.
- Lopez Castel, A., J. D. Cleary, et al. (2010). "Repeat instability as the basis for human diseases and as a potential target for therapy." *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(3): 165-170.

- Lopez Castel, A., M. Nakamori, et al. (2011). "Expanded CTG repeat demarcates a boundary for abnormal CpG methylation in myotonic dystrophy patient tissues." Hum Mol Genet **20**(1): 1-15.
- Lopez de Munain, A., A. M. Cobo, et al. (1994). "CTG trinucleotide repeat variability in identical twins with myotonic dystrophy." Ann Neurol **35**(3): 374-375.
- Loria, P. M., A. Duke, et al. (2003). "Two neuronal, nuclear-localized RNA binding proteins involved in synaptic transmission." Curr Biol **13**(15): 1317-1323.
- Lu, Q. L., A. Rabinowitz, et al. (2005). "Systemic delivery of antisense oligoribonucleotide restores dystrophin expression in body-wide skeletal muscles." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(1): 198-203.
- Lueck, J. D., A. Mankodi, et al. (2007). "Muscle chloride channel dysfunction in two mouse models of myotonic dystrophy." J Gen Physiol **129**(1): 79-94.
- Lukong, K. E., K. W. Chang, et al. (2008). "RNA-binding proteins in human genetic disease." Trends Genet **24**(8): 416-425.
- Machuca-Tzili, L., D. Brook, et al. (2005). "Clinical and molecular aspects of the myotonic dystrophies: a review." Muscle Nerve **32**(1): 1-18.
- Maeda, M., C. S. Taft, et al. (1995). "Identification, tissue-specific expression, and subcellular localization of the 80- and 71-kDa forms of myotonic dystrophy kinase protein." J Biol Chem **270**(35): 20246-20249.
- Mahadevan, M., C. Tsilfidis, et al. (1992). "Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene." Science **255**(5049): 1253-1255.
- Mahadevan, M. S., R. S. Yadava, et al. (2006). "Reversible model of RNA toxicity and cardiac conduction defects in myotonic dystrophy." Nat Genet **38**(9): 1066-1070.
- Mallon, B. S., K. Y. Park, et al. (2006). "Toward xeno-free culture of human embryonic stem cells." Int J Biochem Cell Biol **38**(7): 1063-1075.
- Mamiya, P. C., Z. Hennesy, et al. (2008). "Changes in attack behavior and activity in EphA5 knockout mice." Brain Res **1205**: 91-99.
- Mankodi, A., E. Logigian, et al. (2000). "Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat." Science **289**(5485): 1769-1773.
- Mankodi, A., M. P. Takahashi, et al. (2002). "Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of CIC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy." Mol Cell **10**(1): 35-44.
- Mankodi, A., P. Teng-Umnuay, et al. (2003). "Ribonuclear inclusions in skeletal muscle in myotonic dystrophy types 1 and 2." Ann Neurol **54**(6): 760-768.
- Mankodi, A., C. R. Urbinati, et al. (2001). "Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2." Hum Mol Genet **10**(19): 2165-2170.
- Manley, K., T. L. Shirley, et al. (1999). "Msh2 deficiency prevents in vivo somatic instability of the CAG repeat in Huntington disease transgenic mice." Nat Genet **23**(4): 471-473.
- Maqbool, T. and K. Jagla (2007). "Genetic control of muscle development: learning from *Drosophila*." J Muscle Res Cell Motil **28**(7-8): 397-407.
- Marquis, J., L. Paillard, et al. (2006). "CUG-BP1/CELF1 requires UGU-rich sequences for high-affinity binding." Biochem J **400**(2): 291-301.
- Marteyn, A., Y. Maury, et al. (2011). "Mutant human embryonic stem cells reveal neurite and synapse formation defects in type 1 myotonic dystrophy." Cell Stem Cell **8**(4): 434-444.
- Martin, G. R. (1981). "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(12): 7634-7638.

- Martinez, A. and E. Soriano (2005). "Functions of ephrin/Eph interactions in the development of the nervous system: emphasis on the hippocampal system." Brain Res Brain Res Rev **49**(2): 211-226.
- Martorell, L., K. Johnson, et al. (1997). "Somatic instability of the myotonic dystrophy (CTG)_n repeat during human fetal development." Hum Mol Genet **6**(6): 877-880.
- Martorell, L., D. G. Monckton, et al. (1998). "Progression of somatic CTG repeat length heterogeneity in the blood cells of myotonic dystrophy patients." Hum Mol Genet **7**(2): 307-312.
- Massari, M. E. and C. Murre (2000). "Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms." Mol Cell Biol **20**(2): 429-440.
- Mastroiannopoulos, N. P., M. L. Feldman, et al. (2005). "Woodchuck post-transcriptional element induces nuclear export of myotonic dystrophy 3' untranslated region transcripts." EMBO Rep **6**(5): 458-463.
- Mateizel, I., N. De Temmerman, et al. (2006). "Derivation of human embryonic stem cell lines from embryos obtained after IVF and after PGD for monogenic disorders." Hum Reprod **21**(2): 503-511.
- Mathieu, J., M. De Braekeleer, et al. (1990). "Genealogical reconstruction of myotonic dystrophy in the Saguenay-Lac-Saint-Jean area (Quebec, Canada)." Neurology **40**(5): 839-842.
- Matynia, A., C. H. Ng, et al. (2010). "Muscleblind1, but not Dmpk or Six5, contributes to a complex phenotype of muscular and motivational deficits in mouse models of myotonic dystrophy." PLoS One **5**(3): e9857.
- Maurage, C. A., B. Udd, et al. (2005). "Similar brain tau pathology in DM2/PROMM and DM1/Steinert disease." Neurology **65**(10): 1636-1638.
- Meins, M., S. Schlickum, et al. (2002). "Identification and characterization of murine Brunol4, a new member of the elav/bruno family." Cytogenet Genome Res **97**(3-4): 254-260.
- Meola, G., V. Sansone, et al. (1999). "Reduced cerebral blood flow and impaired visual-spatial function in proximal myotonic myopathy." Neurology **53**(5): 1042-1050.
- Meola, G., V. Sansone, et al. (2003). "Executive dysfunction and avoidant personality trait in myotonic dystrophy type 1 (DM-1) and in proximal myotonic myopathy (PROMM/DM-2)." Neuromuscul Disord **13**(10): 813-821.
- Meola, G., V. Sansone, et al. (1996). "A family with an unusual myotonic and myopathic phenotype and no CTG expansion (proximal myotonic myopathy syndrome): a challenge for future molecular studies." Neuromuscul Disord **6**(3): 143-150.
- Miller, J. W., C. R. Urbinati, et al. (2000). "Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)_n expansions associated with myotonic dystrophy." EMBO J **19**(17): 4439-4448.
- Miloux, B., P. Laurent, et al. (1997). "Cloning of the human IL-13R alpha1 chain and reconstitution with the IL4R alpha of a functional IL-4/IL-13 receptor complex." FEBS Lett **401**(2-3): 163-166.
- Minnerop, M., B. Weber, et al. (2011). "The brain in myotonic dystrophy 1 and 2: evidence for a predominant white matter disease." Brain **134**(Pt 12): 3530-3546.
- Mirkin, S. M. (2007). "Expandable DNA repeats and human disease." Nature **447**(7147): 932-940.
- Mitalipova, M., J. Calhoun, et al. (2003). "Human embryonic stem cell lines derived from discarded embryos." Stem Cells **21**(5): 521-526.
- Mitsui, K., Y. Tokuzawa, et al. (2003). "The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells." Cell **113**(5): 631-642.

- Mizukami, K., M. Sasaki, et al. (1999). "An autopsy case of myotonic dystrophy with mental disorders and various neuropathologic features." Psychiatry Clin Neurosci **53**(1): 51-55.
- Modoni, A., G. Silvestri, et al. (2004). "Characterization of the pattern of cognitive impairment in myotonic dystrophy type 1." Arch Neurol **61**(12): 1943-1947.
- Molkentin, J. D. and E. N. Olson (1996). "Defining the regulatory networks for muscle development." Curr Opin Genet Dev **6**(4): 445-453.
- Monferrer, L. and R. Artero (2006). "An interspecific functional complementation test in *Drosophila* for introductory genetics laboratory courses." J Hered **97**(1): 67-73.
- Moraczewski, J., K. Archacka, et al. (2008). "From planarians to mammals - the many faces of regeneration." Int J Dev Biol **52**(2-3): 219-227.
- Moraes, K. C., C. J. Wilusz, et al. (2006). "CUG-BP binds to RNA substrates and recruits PARN deadenylase." RNA **12**(6): 1084-1091.
- Moulton, H. M. and J. D. Moulton (2010). "Morpholinos and their peptide conjugates: therapeutic promise and challenge for Duchenne muscular dystrophy." Biochim Biophys Acta **1798**(12): 2296-2303.
- Mulders, S. A., W. J. van den Broek, et al. (2009). "Triplet-repeat oligonucleotide-mediated reversal of RNA toxicity in myotonic dystrophy." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(33): 13915-13920.
- Musaro, A. and N. Rosenthal (1999). "Maturation of the myogenic program is induced by postmitotic expression of insulin-like growth factor I." Mol Cell Biol **19**(4): 3115-3124.
- Musova, Z., R. Mazanec, et al. (2009). "Highly unstable sequence interruptions of the CTG repeat in the myotonic dystrophy gene." Am J Med Genet A **149A**(7): 1365-1374.
- Mutsuddi, M., C. M. Marshall, et al. (2004). "The spinocerebellar ataxia 8 noncoding RNA causes neurodegeneration and associates with staufen in *Drosophila*." Curr Biol **14**(4): 302-308.
- Naka, H., Y. Imon, et al. (2002). "Magnetization transfer measurements of cerebral white matter in patients with myotonic dystrophy." J Neurol Sci **193**(2): 111-116.
- Nakamori, M., T. Kimura, et al. (2008). "Aberrantly spliced alpha-dystrobrevin alters alpha-syntrophin binding in myotonic dystrophy type 1." Neurology **70**(9): 677-685.
- Nakatani, K., S. Hagihara, et al. (2005). "Solution structure of a small-molecular ligand complexed with CAG trinucleotide repeat DNA." Nucleic Acids Symp Ser (Oxf) **49**: 49-50.
- Napierala, M. and W. J. Krzyzosiak (1997). "CUG repeats present in myotonin kinase RNA form metastable "slippery" hairpins." J Biol Chem **272**(49): 31079-31085.
- Nezu, Y., Y. Kino, et al. (2007). "Expression of MBNL and CELF mRNA transcripts in muscles with myotonic dystrophy." Neuromuscul Disord **17**(4): 306-312.
- Nichols, J., B. Zevnik, et al. (1998). "Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4." Cell **95**(3): 379-391.
- Nicol, X. and P. Gaspar (2008). "[Interaction between neuronal activity and ephrin signalling during the refinement of neuronal connections]." Med Sci (Paris) **24**(2): 144-146.
- Niro, C., J. Demignon, et al. (2010). "Six1 and Six4 gene expression is necessary to activate the fast-type muscle gene program in the mouse primary myotome." Dev Biol **338**(2): 168-182.
- O'Leary, D. A., L. Vargas, et al. (2010). "HTS-Compatible Patient-Derived Cell-Based Assay to Identify Small Molecule Modulators of Aberrant Splicing in Myotonic Dystrophy Type 1." Curr Chem Genomics **4**: 9-18.
- O'Leary, D. D. and D. G. Wilkinson (1999). "Eph receptors and ephrins in neural development." Curr Opin Neurobiol **9**(1): 65-73.

- Ogata, A., S. Terae, et al. (1998). "Anterior temporal white matter lesions in myotonic dystrophy with intellectual impairment: an MRI and neuropathological study." Neuroradiology **40**(7): 411-415.
- Oh, S. K., H. S. Kim, et al. (2005). "Methods for expansion of human embryonic stem cells." Stem Cells **23**(5): 605-609.
- Ohsawa, N., M. Koebis, et al. (2011). "Alternative splicing of PDLIM3/ALP, for alpha-actinin-associated LIM protein 3, is aberrant in persons with myotonic dystrophy." Biochem Biophys Res Commun **409**(1): 64-69.
- Ono, S., F. Kanda, et al. (1995). "Neuronal cell loss in the dorsal raphe nucleus and the superior central nucleus in myotonic dystrophy: a clinicopathological correlation." Acta Neuropathol **89**(2): 122-125.
- Ono, S., K. Takahashi, et al. (2001). "Decrease of neurons in the medullary arcuate nucleus in myotonic dystrophy." Acta Neuropathol **102**(1): 89-93.
- Orengo, J. P., P. Chambon, et al. (2008). "Expanded CTG repeats within the DMPK 3' UTR causes severe skeletal muscle wasting in an inducible mouse model for myotonic dystrophy." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(7): 2646-2651.
- Orlikowski, D., S. Chevret, et al. (2009). "Modafinil for the treatment of hypersomnia associated with myotonic muscular dystrophy in adults: a multicenter, prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled, 4-week trial." Clin Ther **31**(8): 1765-1773.
- Osborne, R. J., X. Lin, et al. (2009). "Transcriptional and post-transcriptional impact of toxic RNA in myotonic dystrophy." Hum Mol Genet **18**(8): 1471-1481.
- Ota, M., N. Sato, et al. (2006). "Relationship between diffusion tensor imaging and brain morphology in patients with myotonic dystrophy." Neurosci Lett **407**(3): 234-239.
- Owen, B. A., Z. Yang, et al. (2005). "(CAG)(n)-hairpin DNA binds to Msh2-Msh3 and changes properties of mismatch recognition." Nat Struct Mol Biol **12**(8): 663-670.
- Ozaki, H., Y. Watanabe, et al. (2001). "Six4, a putative myogenin gene regulator, is not essential for mouse embryonal development." Mol Cell Biol **21**(10): 3343-3350.
- Panaite, P. A., M. Kielar, et al. (2011). "Peripheral neuropathy is linked to a severe form of myotonic dystrophy in transgenic mice." J Neuropathol Exp Neurol **70**(8): 678-685.
- Parkesh, R., J. L. Childs-Disney, et al. (2012). "Design of a bioactive small molecule that targets the myotonic dystrophy type 1 RNA via an RNA motif-ligand database and chemical similarity searching." J Am Chem Soc **134**(10): 4731-4742.
- Pascual, M., M. Vicente, et al. (2006). "The Muscleblind family of proteins: an emerging class of regulators of developmentally programmed alternative splicing." Differentiation **74**(2-3): 65-80.
- Pasquale, E. B. (2008). "Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease." Cell **133**(1): 38-52.
- Paul, S., W. Dansithong, et al. (2006). "Interaction of muscleblind, CUG-BP1 and hnRNP H proteins in DM1-associated aberrant IR splicing." EMBO J **25**(18): 4271-4283.
- Pearson, C. E. (2011). "Repeat associated non-ATG translation initiation: one DNA, two transcripts, seven reading frames, potentially nine toxic entities!" PLoS Genet **7**(3): e1002018.
- Penisson-Besnier, I., M. Devillers, et al. (2008). "Dehydroepiandrosterone for myotonic dystrophy type 1." Neurology **71**(6): 407-412.
- Pera, M. F., B. Reubinoff, et al. (2000). "Human embryonic stem cells." J Cell Sci **113** (Pt 1): 5-10.
- Perrier, A. L., V. Tabar, et al. (2004). "Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(34): 12543-12548.

- Philips, A. V., L. T. Timchenko, et al. (1998). "Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy." Science **280**(5364): 737-741.
- Pignoni, F., B. Hu, et al. (1997). "Identification of genes required for Drosophila eye development using a phenotypic enhancer-trap." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(17): 9220-9225.
- Prokopchuk, O., Y. Liu, et al. (2007). "Skeletal muscle IL-4, IL-4Ralpha, IL-13 and IL-13Ralpha1 expression and response to strength training." Exerc Immunol Rev **13**: 67-75.
- Pushechnikov, A., M. M. Lee, et al. (2009). "Rational design of ligands targeting triplet repeating transcripts that cause RNA dominant disease: application to myotonic muscular dystrophy type 1 and spinocerebellar ataxia type 3." J Am Chem Soc **131**(28): 9767-9779.
- Quintero-Mora, M. L., F. Depardon, et al. (2002). "Expanded CTG repeats inhibit neuronal differentiation of the PC12 cell line." Biochem Biophys Res Commun **295**(2): 289-294.
- Ranum, L. P. and T. A. Cooper (2006). "RNA-mediated neuromuscular disorders." Annu Rev Neurosci **29**: 259-277.
- Ravel-Chapuis, A., G. Belanger, et al. (2012). "The RNA-binding protein Staufeni1 is increased in DM1 skeletal muscle and promotes alternative pre-mRNA splicing." J Cell Biol **196**(6): 699-712.
- Reddy, S., D. B. Smith, et al. (1996). "Mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase develop a late onset progressive myopathy." Nat Genet **13**(3): 325-335.
- Relaix, F., D. Rocancourt, et al. (2005). "A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells." Nature **435**(7044): 948-953.
- Ricker, K., M. C. Koch, et al. (1994). "Proximal myotonic myopathy: a new dominant disorder with myotonia, muscle weakness, and cataracts." Neurology **44**(8): 1448-1452.
- Ridley, A. J. (2001). "Rho proteins: linking signaling with membrane trafficking." Traffic **2**(5): 303-310.
- Rinaldi, F., C. Terracciano, et al. (2012). "Aberrant splicing and expression of the non muscle myosin heavy-chain gene MYH14 in DM1 muscle tissues." Neurobiol Dis **45**(1): 264-271.
- Roberts, R., N. A. Timchenko, et al. (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." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(24): 13221-13226.
- Robertson, E. J., M. J. Evans, et al. (1983). "X-chromosome instability in pluripotential stem cell lines derived from parthenogenetic embryos." J Embryol Exp Morphol **74**: 297-309.
- Romeo, V., E. Pegoraro, et al. (2010). "Brain involvement in myotonic dystrophies: neuroimaging and neuropsychological comparative study in DM1 and DM2." J Neurol **257**(8): 1246-1255.
- Rudnicki, M. A., T. Braun, et al. (1992). "Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development." Cell **71**(3): 383-390.
- Rudnicki, M. A. and R. Jaenisch (1995). "The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis." Bioessays **17**(3): 203-209.
- Sahgal, V., S. Bernes, et al. (1983). "Skeletal muscle in preterm infants with congenital myotonic dystrophy. Morphologic and histochemical study." J Neurol Sci **59**(1): 47-55.

- Salisbury, E., K. Sakai, et al. (2008). "Ectopic expression of cyclin D3 corrects differentiation of DM1 myoblasts through activation of RNA CUG-binding protein, CUGBP1." Exp Cell Res **314**(11-12): 2266-2278.
- Salvatori, S., M. Fanin, et al. (2005). "Decreased expression of DMPK: correlation with CTG repeat expansion and fibre type composition in myotonic dystrophy type 1." Neurol Sci **26**(4): 235-242.
- Santoro, M., A. Modoni, et al. (2010). "Analysis of MTMR1 expression and correlation with muscle pathological features in juvenile/adult onset myotonic dystrophy type 1 (DM1) and in myotonic dystrophy type 2 (DM2)." Exp Mol Pathol **89**(2): 158-168.
- Sarkar, P. S., B. Appukuttan, et al. (2000). "Heterozygous loss of Six5 in mice is sufficient to cause ocular cataracts." Nat Genet **25**(1): 110-114.
- Sarkar, P. S., J. Han, et al. (2004). "In situ hybridization analysis of Dmpk mRNA in adult mouse tissues." Neuromuscul Disord **14**(8-9): 497-506.
- Sato, K., I. Yabe, et al. (2009). "[Reliability of the Japanese version of the Scale for the Assessment and Rating of Ataxia (SARA)]." Brain Nerve **61**(5): 591-595.
- Sato, N., L. Meijer, et al. (2004). "Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor." Nat Med **10**(1): 55-63.
- Savkur, R. S., A. V. Philips, et al. (2001). "Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy." Nat Genet **29**(1): 40-47.
- Savouret, C., E. Brisson, et al. (2003). "CTG repeat instability and size variation timing in DNA repair-deficient mice." EMBO J **22**(9): 2264-2273.
- Savouret, C., C. Garcia-Cordier, et al. (2004). "MSH2-dependent germinal CTG repeat expansions are produced continuously in spermatogonia from DM1 transgenic mice." Mol Cell Biol **24**(2): 629-637.
- Schneider-Gold, C. and L. T. Timchenko (2010). "CCUG repeats reduce the rate of global protein synthesis in myotonic dystrophy type 2." Rev Neurosci **21**(1): 19-28.
- Semsarian, C., P. Sutrave, et al. (1999). "Insulin-like growth factor (IGF-I) induces myotube hypertrophy associated with an increase in anaerobic glycolysis in a clonal skeletal-muscle cell model." Biochem J **339** (Pt 2): 443-451.
- Sergeant, N., B. Sablonniere, et al. (2001). "Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1." Hum Mol Genet **10**(19): 2143-2155.
- Seznec, H., O. Agbulut, et al. (2001). "Mice transgenic for the human myotonic dystrophy region with expanded CTG repeats display muscular and brain abnormalities." Hum Mol Genet **10**(23): 2717-2726.
- Shamblott, M. J., J. Axelman, et al. (1998). "Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(23): 13726-13731.
- Shaw, D. J., M. McCurrach, et al. (1993). "Genomic organization and transcriptional units at the myotonic dystrophy locus." Genomics **18**(3): 673-679.
- Singh, A. M., D. Reynolds, et al. (2012). "Signaling network crosstalk in human pluripotent cells: a Smad2/3-regulated switch that controls the balance between self-renewal and differentiation." Cell Stem Cell **10**(3): 312-326.
- Singh, G., B. N. Charlet, et al. (2004). "ETR-3 and CELF4 protein domains required for RNA binding and splicing activity in vivo." Nucleic Acids Res **32**(3): 1232-1241.
- Spalding, K. L., R. D. Bhardwaj, et al. (2005). "Retrospective birth dating of cells in humans." Cell **122**(1): 133-143.

- Spits, C., S. Seneca, et al. (2010). "Methylation of the CpG sites in the myotonic dystrophy locus does not correlate with CTG expansion size or with the congenital form of the disease." J Med Genet **47**(10): 700-703.
- Squillace, R. M., D. M. Chenault, et al. (2002). "Inhibition of muscle differentiation by the novel muscleblind-related protein CHCR." Dev Biol **250**(1): 218-230.
- Stapleton, D., I. Balan, et al. (1999). "The crystal structure of an Eph receptor SAM domain reveals a mechanism for modular dimerization." Nat Struct Biol **6**(1): 44-49.
- Steinbach, P., D. Glaser, et al. (1998). "The DMPK gene of severely affected myotonic dystrophy patients is hypermethylated proximal to the largely expanded CTG repeat." Am J Hum Genet **62**(2): 278-285.
- Steinberg, H. and A. Wagner (2008). "[Hans Steinert: 100 years of myotonic dystrophy]." Nervenarzt **79**(8): 961-962, 965-970.
- Stevanin, G., H. Fujigasaki, et al. (2003). "Huntington's disease-like phenotype due to trinucleotide repeat expansions in the TBP and JPH3 genes." Brain **126**(Pt 7): 1599-1603.
- Stranock, S. D. and J. N. Davis (1978). "Ultrastructure of the muscle spindle in dystrophia myotonica. I. The intrafusal muscle fibres." Neuropathol Appl Neurobiol **4**(5): 393-406.
- Stranock, S. D. and J. N. Davis (1978). "Ultrastructure of the muscle spindle in dystrophia myotonica. II. The sensory and motor nerve terminals." Neuropathol Appl Neurobiol **4**(5): 407-418.
- Suenaga, K., K. Y. Lee, et al. (2012). "Muscleblind-like 1 knockout mice reveal novel splicing defects in the myotonic dystrophy brain." PLoS One **7**(3): e33218.
- Sumi, T., N. Tsuneyoshi, et al. (2008). "Defining early lineage specification of human embryonic stem cells by the orchestrated balance of canonical Wnt/beta-catenin, Activin/Nodal and BMP signaling." Development **135**(17): 2969-2979.
- Sumner, C. J. (2007). "Molecular mechanisms of spinal muscular atrophy." J Child Neurol **22**(8): 979-989.
- Suwinska, A. and M. A. Ciemerych (2011). "Factors regulating pluripotency and differentiation in early mammalian embryos and embryo-derived stem cells." Vitam Horm **87**: 1-37.
- Taneja, K. L., M. McCurrach, et al. (1995). "Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues." J Cell Biol **128**(6): 995-1002.
- Tang, Z. Z., V. Yarotskyy, et al. (2012). "Muscle weakness in myotonic dystrophy associated with misregulated splicing and altered gating of Ca(V)1.1 calcium channel." Hum Mol Genet **21**(6): 1312-1324.
- Tarnopolsky, M., D. Mahoney, et al. (2004). "Creatine monohydrate supplementation does not increase muscle strength, lean body mass, or muscle phosphocreatine in patients with myotonic dystrophy type 1." Muscle Nerve **29**(1): 51-58.
- Ten Broek, R. W., S. Grefte, et al. (2010). "Regulatory factors and cell populations involved in skeletal muscle regeneration." J Cell Physiol **224**(1): 7-16.
- Thanos, C. D., S. Faham, et al. (1999). "Monomeric structure of the human EphB2 sterile alpha motif domain." J Biol Chem **274**(52): 37301-37306.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, et al. (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." Science **282**(5391): 1145-1147.
- Thomson, J. A., J. Kalishman, et al. (1995). "Isolation of a primate embryonic stem cell line." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(17): 7844-7848.
- Thornell, L. E., M. Lindstom, et al. (2009). "Satellite cell dysfunction contributes to the progressive muscle atrophy in myotonic dystrophy type 1." Neuropathol Appl Neurobiol **35**(6): 603-613.

- Thornton, C. A., J. P. Wymer, et al. (1997). "Expansion of the myotonic dystrophy CTG repeat reduces expression of the flanking DMAHP gene." Nat Genet **16**(4): 407-409.
- Timchenko, L. T., J. W. Miller, et al. (1996). "Identification of a (CUG)_n triplet repeat RNA-binding protein and its expression in myotonic dystrophy." Nucleic Acids Res **24**(22): 4407-4414.
- Timchenko, N. A., Z. J. Cai, et al. (2001). "RNA CUG repeats sequester CUGBP1 and alter protein levels and activity of CUGBP1." J Biol Chem **276**(11): 7820-7826.
- Timchenko, N. A., P. Iakova, et al. (2001). "Molecular basis for impaired muscle differentiation in myotonic dystrophy." Mol Cell Biol **21**(20): 6927-6938.
- Timchenko, N. A., R. Patel, et al. (2004). "Overexpression of CUG triplet repeat-binding protein, CUGBP1, in mice inhibits myogenesis." J Biol Chem **279**(13): 13129-13139.
- Timchenko, N. A., A. L. Welm, et al. (1999). "CUG repeat binding protein (CUGBP1) interacts with the 5' region of C/EBPbeta mRNA and regulates translation of C/EBPbeta isoforms." Nucleic Acids Res **27**(22): 4517-4525.
- Tome, S., I. Holt, et al. (2009). "MSH2 ATPase domain mutation affects CTG*CAG repeat instability in transgenic mice." PLoS Genet **5**(5): e1000482.
- Tran, H., N. Gourrier, et al. (2011). "Analysis of exonic regions involved in nuclear localization, splicing activity, and dimerization of Muscleblind-like-1 isoforms." J Biol Chem **286**(18): 16435-16446.
- Trip, J., G. Drost, et al. (2006). "Drug treatment for myotonia." Cochrane Database Syst Rev(1): CD004762.
- Turner, C. and D. Hilton-Jones (2010). "The myotonic dystrophies: diagnosis and management." J Neurol Neurosurg Psychiatry **81**(4): 358-367.
- Udd, B., R. Krahe, et al. (1997). "Proximal myotonic dystrophy--a family with autosomal dominant muscular dystrophy, cataracts, hearing loss and hypogonadism: heterogeneity of proximal myotonic syndromes?" Neuromuscul Disord **7**(4): 217-228.
- Vallier, L., T. Touboul, et al. (2009). "Signaling pathways controlling pluripotency and early cell fate decisions of human induced pluripotent stem cells." Stem Cells **27**(11): 2655-2666.
- van den Broek, W. J., M. R. Nelen, et al. (2002). "Somatic expansion behaviour of the (CTG)_n repeat in myotonic dystrophy knock-in mice is differentially affected by Msh3 and Msh6 mismatch-repair proteins." Hum Mol Genet **11**(2): 191-198.
- van der Ven, P. F., G. Jansen, et al. (1993). "Myotonic dystrophy kinase is a component of neuromuscular junctions." Hum Mol Genet **2**(11): 1889-1894.
- Van Spaendonck, K. P., J. P. Ter Bruggen, et al. (1995). "Cognitive function in early adult and adult onset myotonic dystrophy." Acta Neurol Scand **91**(6): 456-461.
- Vandenburgh, H. H., P. Karlisch, et al. (1991). "Insulin and IGF-I induce pronounced hypertrophy of skeletal myofibers in tissue culture." Am J Physiol **260**(3 Pt 1): C475-484.
- Vattemi, G., G. Tomelleri, et al. (2005). "Expression of late myogenic differentiation markers in sarcoplasmic masses of patients with myotonic dystrophy." Neuropathol Appl Neurobiol **31**(1): 45-52.
- Velazquez-Bernardino, P., F. Garcia-Sierra, et al. (2012). "Myotonic dystrophy type 1-associated CTG repeats disturb the expression and subcellular distribution of microtubule-associated proteins MAP1A, MAP2, and MAP6/STOP in PC12 cells." Mol Biol Rep **39**(1): 415-424.
- Vignaud, A., A. Ferry, et al. (2010). "Progressive skeletal muscle weakness in transgenic mice expressing CTG expansions is associated with the activation of the ubiquitin-proteasome pathway." Neuromuscul Disord **20**(5): 319-325.

- Vihola, A., L. L. Bachinski, et al. (2010). "Differences in aberrant expression and splicing of sarcomeric proteins in the myotonic dystrophies DM1 and DM2." Acta Neuropathol **119**(4): 465-479.
- Vihola, A., G. Bassez, et al. (2003). "Histopathological differences of myotonic dystrophy type 1 (DM1) and PROMM/DM2." Neurology **60**(11): 1854-1857.
- Vincent, J. B., M. L. Neves-Pereira, et al. (2000). "An unstable trinucleotide-repeat region on chromosome 13 implicated in spinocerebellar ataxia: a common expansion locus." Am J Hum Genet **66**(3): 819-829.
- Vlachopapadopoulou, E., J. J. Zachwieja, et al. (1995). "Metabolic and clinical response to recombinant human insulin-like growth factor I in myotonic dystrophy--a clinical research center study." J Clin Endocrinol Metab **80**(12): 3715-3723.
- Vlasova, I. A. and P. R. Bohjanen (2008). "Posttranscriptional regulation of gene networks by GU-rich elements and CELF proteins." RNA Biol **5**(4): 201-207.
- Wagner, K. R., J. L. Fleckenstein, et al. (2008). "A phase I/II trial of MYO-029 in adult subjects with muscular dystrophy." Ann Neurol **63**(5): 561-571.
- Wakimoto, H., C. T. Maguire, et al. (2002). "Characterization of cardiac conduction system abnormalities in mice with targeted disruption of Six5 gene." J Interv Card Electrophysiol **7**(2): 127-135.
- Wallace, G. Q. and E. M. McNally (2009). "Mechanisms of muscle degeneration, regeneration, and repair in the muscular dystrophies." Annu Rev Physiol **71**: 37-57.
- Wang, G. and K. M. Vasquez (2006). "Non-B DNA structure-induced genetic instability." Mutat Res **598**(1-2): 103-119.
- Wang, G. and K. M. Vasquez (2009). "Models for chromosomal replication-independent non-B DNA structure-induced genetic instability." Mol Carcinog **48**(4): 286-298.
- Wang, G. S., D. L. Kearney, et al. (2007). "Elevation of RNA-binding protein CUGBP1 is an early event in an inducible heart-specific mouse model of myotonic dystrophy." J Clin Invest **117**(10): 2802-2811.
- Wang, G. S., M. N. Kuyumcu-Martinez, et al. (2009). "PKC inhibition ameliorates the cardiac phenotype in a mouse model of myotonic dystrophy type 1." J Clin Invest **119**(12): 3797-3806.
- Wang, K., Y. Chen, et al. (2009). "Dynamic epigenetic regulation of the Oct4 and Nanog regulatory regions during neural differentiation in rhesus nuclear transfer embryonic stem cells." Cloning Stem Cells **11**(4): 483-496.
- Wang, Y., J. Wang, et al. (2011). "An SRp75/hnRNPG complex interacting with hnRNPE2 regulates the 5' splice site of tau exon 10, whose misregulation causes frontotemporal dementia." Gene **485**(2): 130-138.
- Wansink, D. G. and B. Wieringa (2003). "Transgenic mouse models for myotonic dystrophy type 1 (DM1)." Cytogenet Genome Res **100**(1-4): 230-242.
- Ward, A. J., M. Rimer, et al. (2010). "CUGBP1 overexpression in mouse skeletal muscle reproduces features of myotonic dystrophy type 1." Hum Mol Genet **19**(18): 3614-3622.
- Warf, M. B., M. Nakamori, et al. (2009). "Pentamidine reverses the splicing defects associated with myotonic dystrophy." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(44): 18551-18556.
- Weber, Y. G., R. Roebeling, et al. (2010). "Comparative analysis of brain structure, metabolism, and cognition in myotonic dystrophy 1 and 2." Neurology **74**(14): 1108-1117.
- Weintraub, H., V. J. Dwarki, et al. (1991). "Muscle-specific transcriptional activation by MyoD." Genes Dev **5**(8): 1377-1386.

- Westerlaken, J. H., C. E. Van der Zee, et al. (2003). "The DMWD protein from the myotonic dystrophy (DM1) gene region is developmentally regulated and is present most prominently in synapse-dense brain areas." *Brain Res* **971**(1): 116-127.
- Wheeler, T. M., M. C. Krym, et al. (2007). "Ribonuclear foci at the neuromuscular junction in myotonic dystrophy type 1." *Neuromuscul Disord* **17**(3): 242-247.
- Wheeler, T. M., J. D. Lueck, et al. (2007). "Correction of ClC-1 splicing eliminates chloride channelopathy and myotonia in mouse models of myotonic dystrophy." *J Clin Invest* **117**(12): 3952-3957.
- Wheeler, T. M., K. Sobczak, et al. (2009). "Reversal of RNA dominance by displacement of protein sequestered on triplet repeat RNA." *Science* **325**(5938): 336-339.
- Wilkinson, D. G. (2001). "Multiple roles of EPH receptors and ephrins in neural development." *Nat Rev Neurosci* **2**(3): 155-164.
- Winchester, C. L., R. K. Ferrier, et al. (1999). "Characterization of the expression of DMPK and SIX5 in the human eye and implications for pathogenesis in myotonic dystrophy." *Hum Mol Genet* **8**(3): 481-492.
- Wohrle, D., I. Kennerknecht, et al. (1995). "Heterogeneity of DM kinase repeat expansion in different fetal tissues and further expansion during cell proliferation in vitro: evidence for a casual involvement of methyl-directed DNA mismatch repair in triplet repeat stability." *Hum Mol Genet* **4**(7): 1147-1153.
- Wozniak, J. R., B. A. Mueller, et al. (2011). "White matter abnormalities and neurocognitive correlates in children and adolescents with myotonic dystrophy type 1: a diffusion tensor imaging study." *Neuromuscul Disord* **21**(2): 89-96.
- Xu, R. H., T. L. Sampsel-Barron, et al. (2008). "NANOG is a direct target of TGFbeta/activin-mediated SMAD signaling in human ESCs." *Cell Stem Cell* **3**(2): 196-206.
- Yadava, R. S., C. D. Frenzel-McCardell, et al. (2008). "RNA toxicity in myotonic muscular dystrophy induces NKX2-5 expression." *Nat Genet* **40**(1): 61-68.
- Yajima, H., N. Motohashi, et al. (2010). "Six family genes control the proliferation and differentiation of muscle satellite cells." *Exp Cell Res* **316**(17): 2932-2944.
- Yang, Y., C. L. Mahaffey, et al. (2007). "Complex seizure disorder caused by Brunol4 deficiency in mice." *PLoS Genet* **3**(7): e124.
- Yang, Z., R. Lau, et al. (2003). "Replication inhibitors modulate instability of an expanded trinucleotide repeat at the myotonic dystrophy type 1 disease locus in human cells." *Am J Hum Genet* **73**(5): 1092-1105.
- Yokota, T., Q. L. Lu, et al. (2009). "Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in Duchenne dystrophy dogs." *Ann Neurol* **65**(6): 667-676.
- Yue, Y., Z. Y. Chen, et al. (2002). "Mistargeting hippocampal axons by expression of a truncated Eph receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(16): 10777-10782.
- Zeesman, S., N. Carson, et al. (2002). "Paternal transmission of the congenital form of myotonic dystrophy type 1: a new case and review of the literature." *Am J Med Genet* **107**(3): 222-226.
- Zhang, L., J. E. Lee, et al. (2008). "The RNA-binding protein CUGBP1 regulates stability of tumor necrosis factor mRNA in muscle cells: implications for myotonic dystrophy." *J Biol Chem* **283**(33): 22457-22463.
- Zhang, P., C. Wong, et al. (1999). "p21(CIP1) and p57(KIP2) control muscle differentiation at the myogenin step." *Genes Dev* **13**(2): 213-224.
- Zhang, W., R. R. Behringer, et al. (1995). "Inactivation of the myogenic bHLH gene MRF4 results in up-regulation of myogenin and rib anomalies." *Genes Dev* **9**(11): 1388-1399.

Zu, T., B. Gibbens, et al. (2011). "Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(1): 260-265.

Résumé

Les cellules souches embryonnaires humaines (hESC) représentent un nouvel outil biologique au potentiel prometteur pour l'amélioration de la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le développement de maladies monogéniques. Cette application est dans un premier temps devenue possible grâce à l'utilisation de lignées de cellules souches embryonnaires humaines porteuses de mutation causale de pathologie, obtenues au cours d'un diagnostic pré-implantatoire.

Mon travail de thèse s'est inscrit dans la validation de ce nouveau concept en utilisant des lignées de cellules souches embryonnaires humaines porteuses de la mutation causale de la Dystrophie Myotonique de type 1 (DM1). Ces cellules, ainsi que leurs progénies neurales et mésenchymateuses représentent un modèle pertinent pour l'étude des conséquences physiopathologiques de la mutation DM1 dans la mesure où elles reproduisent certaines caractéristiques moléculaires connues de la pathologie. Mon projet a eu pour objectif de caractériser d'un point de vue moléculaire et physiopathologique deux nouvelles altérations géniques identifiées par transcriptome différentiel entre les cellules contrôles et DM1. Ainsi, ce travail nous a permis d'identifier un nouveau marqueur, le facteur de transcription ZNF37A, dont l'expression est diminuée en association avec la mutation DM1 et qui serait impliqué dans les défauts myogéniques caractérisant cette pathologie. Parallèlement nous avons identifié un nouveau défaut d'épissage alternatif d'un gène impliqué dans la guidance axonale, l'*EphA5* qui pourrait être impliqué dans les défauts cognitifs des patients DM1.

En conclusion, l'ensemble de ce travail vise à étendre la sphère d'utilisation des cellules souches pluripotentes humaines, en particulier d'origine embryonnaire, à des fins thérapeutiques en définissant leur capacité à modéliser une maladie génétique de façon suffisamment précise pour permettre l'élaboration de biothérapies spécifiquement lié aux mécanismes moléculaires en jeu.

Mots clés : Cellules souches embryonnaires humaines, dystrophie myotonique de type 1, ZNF37A, EphA5, fusion musculaire, neurones.