



HAL
open science

Utilisation des cellules souches pluripotentes humaines pour le traitement pharmacologique de maladies neuromusculaires rares

Sandrine Baghdoyan

► **To cite this version:**

Sandrine Baghdoyan. Utilisation des cellules souches pluripotentes humaines pour le traitement pharmacologique de maladies neuromusculaires rares. Sciences du Vivant [q-bio]. Université d'evry val D'essonne, 2021. tel-04585885

HAL Id: tel-04585885

<https://hal.science/tel-04585885>

Submitted on 23 May 2024

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

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

Université d'Evry Val d'Essonne



Mémoire en vue de l'obtention du diplôme d'Habilitation à Diriger les Recherches

**Utilisation des cellules souches pluripotentes humaines
pour le traitement pharmacologique
de maladies neuromusculaires rares**

présenté par le Dr. Sandrine Baghdoyan

Soutenance prévue le 30 Juin 2021 à 14h00 à Evry devant le jury composé de :

Pr. Christine Baldeschi	Président du Jury
Dr. Stéphanie Duguez	Rapporteur
Dr. Mario Gomes-Pereira	Rapporteur
Dr. Geneviève Gourdon	Examineur
Pr. Luc Paillard	Examineur

A Djouar et Pasqua,

« Le plaisir le plus noble est la joie de comprendre »

Leonard de Vinci

Remerciements

Je tiens à remercier Marc Peschanski pour m'avoir donné la chance de participer à la grande aventure d'I-Stem et de m'avoir tant appris. Merci d'avoir créé ce laboratoire où nous avons eu l'opportunité de travailler dans des conditions exceptionnelles sur ces fameuses cellules souches pluripotentes dont le potentiel ne cesse de nous surprendre.

Je remercie Cécile Martinat, pour m'avoir accueillie dans son équipe. Merci pour ton dynamisme, ton soutien, ton ouverture d'esprit et ton exigence qui pousse à progresser constamment. Ce manuscrit n'existerait pas sans ton input.

Mes remerciements vont également à tous les membres de mes équipes passée et actuelle. Je remercie Jackie, unique, avec qui j'ai passé tant d'heures de discussion et de bonne humeur marseillaise qui ont changé notre relation en amitié. Je compte sur toi petit pimousse. Je remercie Delphine, avec qui nous avons vécu tant de première fois. Je suis si contente que tu aies préservé tes convictions. Je remercie également Laetitia, la tornade de l'équipe ! Je remercie Florine pour sa gentillesse, sa bonne humeur et sa patience ! Et merci à notre nouvelle recrue, Azania avec qui j'espère pouvoir travailler longtemps. Je remercie également tous les membres de l'équipe Camille, Vincent, Antoine, Julie, Juliette et Adeline pour leur bonne humeur et leur professionnalisme. J'ai une pensée particulière pour Julie et Antoine mes compagnons de congrès 2.0. à qui je souhaite une belle carrière.

Merci également à tous mes collègues d'I-Stem et particulièrement ceux de la première heure, Alexandra, Walter, Michel, Pascal et Lina avec qui nous avons partagés des souvenirs mémorables. Alexandra, ma coéquipière d'Amondans et de bureau pendant de si longues années, merci pour ton humour, ne change rien ! Merci à Véronique et Nathalie, pour leur soutien et leur compagnie dont j'espère bénéficier encore longtemps. Merci Nathalie de m'avoir permis de faire un petit tour du côté de la Fac d'Evry de temps en temps !

Merci à tous les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Un grand merci à Christine Baldeschi d'avoir accepté de présider ce jury. Je remercie particulièrement Stéphanie Duguez et Mario Gomes-Pereira d'avoir accepté de prendre le temps d'être rapporteur de ce travail. Mes remerciements vont également à Géneviève Gourdon et Luc Paillard pour avoir accepté de participer à ce jury en tant qu'examineur.

Enfin je remercie Pascal, Hugo et Raphaël. Merci pour votre soutien et votre patience pendant ce mois de rédaction. Merci Pascal d'avoir pris sur ta fatigue pour assurer le relai et pour toutes tes attentions. Merci à Hugo et Raphaël pour votre intérêt et tous les cafés proposés. Je souhaite de tout mon cœur que vous trouviez le métier qui vous passionnera.

Table des matières

Chapitre 1 : Présentation du Candidat	5
Etat Civil.....	5
Diplômes.....	5
Activités de Recherche	5
Demandes de Financement et autres fonctions administratives	6
Encadrements et activités d’enseignement	6
Publications	7
Brevets / Essais cliniques.....	7
Collaborations	8
Résumé de carrière	8
Chapitre 2. Exposé des principaux travaux de recherche	12
Introduction : Les lignées de cellules souches Pluripotentes.....	12
Les cellules souches embryonnaires	12
Les cellules souches pluripotentes reprogrammées ou IPS (<i>induced Pluripotent Stem cells</i>).....	15
Caractérisation des cellules souches pluripotentes humaines.....	18
Application des cellules souches pluripotentes humaines.....	19
Contrôle qualité des PSCs.....	28
Synthèse des travaux de recherche	29
Identification de régulateurs des défauts d’épissage associés à la Dystrophie Myotonique de type 1	29
Repositionnement de molécules pour le traitement de maladies rares.....	54
Importance de l’intégrité de l’empreinte parentale pour l’utilisation des cellules souches pluripotentes humaines.....	66
Chapitre3. Exposé des futurs projets de recherche	75
Références.....	81

Chapitre 1 : Présentation du Candidat

Etat Civil

Sandrine Baghdoyan-Rameil

Née le 29 Juin 1972 à Gennevilliers (Hauts de Seine)

Mariée, deux enfants

Domicile :

Téléphone :

Professionnel : INSERM/UEVE UMR 861, I-STEM, 28, rue Henri Desbruères, 91100 Corbeil-Essonnes

Téléphone : 01.69.90.85.41

Courriel : sbaghdoyan@istem.fr

Diplômes

2000 Doctorat de Biologie des Cellules Sanguines - Université Paris 7 – Denis Diderot

« Etude des gènes de réponse au GM-CSF par la stratégie du *gene trap* »

INSERM U119-Unité de recherche en cancérologie et thérapeutique expérimentales, Institut Paoli-Calmette, Marseille

1996 D.E.A de Biologie des Cellules Sanguines - Université Paris 7 – Denis Diderot

INSERM U119-Unité de recherche en cancérologie et thérapeutique expérimentales, Institut Paoli-Calmette, Marseille

Activités de Recherche

2007 - présent : Ingénieur de Recherche, INSERM / UEVE UMR 861, I-Stem, Corbeil-Essonnes.

Identifications de composés thérapeutiques pour la Dystrophie Myotonique de type 1

Equipe Maladies du Motoneurons dirigée par le Dr Cécile Martinat

Directeur du laboratoire : Dr. Cécile Martinat / Dr. Marc Peschanski

2005 - 2007 : Stage post-Doctoral, INSERM / UEVE UMR 861, I-Stem, Evry.

Mise au point d'un crible de génomique fonctionnel par ARN interférence dédié à la Dystrophie Myotonique de type 1.

Directeur du laboratoire : Dr. Marc Peschanski

2002 - 2004 : Stage post-doctoral, Service de Génomique fonctionnelle, CEA, Evry.

Mise au point d'une puce à cellule pour l'exploration fonctionnelle du génome.

Directeur du laboratoire : Dr. X. Gidrol

1997-2000 : DEA et Thèse, INSERM U119 Cancérologie et thérapeutiques expérimentales, Marseille.

Identification de gènes de réponse au GM-CSF par une stratégie de gene-trap.

Equipe Patrice Dubreuil, Directeur de thèse : Sophie Gomez

Directeur du laboratoire : Dr. C. Mawas

Demandes de Financement et autres fonctions administratives

- 2005** Appel à projet Stem pole pour l'acquisition d'une banque pan genomique humaine de siRNA
2006 Demande de Financement ASTRE pour l'acquisition d'un arraysan, Celomics
2010 Participation au jury de recrutement CEA Ingénieur/ Chercheur
2015 Demande de Financement ASTRE Acquisition d'un Quantstudio, LifeTechnologies
2016 Appel à projet France Génomique-Grand séquençage
2018 Reviewer pour la revue Frontiers
Depuis **2007** Correspondante Agence de la Biomedecine
Depuis **2008** Expert Journées des Familles
Depuis **2017** Membre de la FSSCR
Depuis 2020 Membre de l'ISSCR.

Encadrements et activités d'enseignement

Doctorant:	
2009	Delphine Laustriat Doctorat Biologie Cellulaire et Moléculaire, Université d'Evry
Masters / Ecole d'Ingénieurs :	
2008	Delphine Laustriat, Master 2
2011	Sylvain Dugat, 4ième année d'Ecole d'Ingénieur Sup Biotech
2013	Emilie Pellier , Master Pro
2014	Florian Sizaïre, Master 1
2015	Maud Valensi, Master 2
2016	Maïssa Alfaoui, Master1
2018	Florine Roussange, Master 2
2021	Azania Abatan, Master 2
BTS / L3 Pro:	
2007	Benjamin Brinon, Licence Pro
2012	Axel Gorlier, BTS 1ième année
2013	Axel Gorlier, BTS 2ième année
2017	Marie-Sarah Piazza, BTS 1ième année
2017	Charlotte Saint-Omer, L2 Biologie Santé
Comité de Thèse:	
2018	Manel Tari

- Activités d'enseignement universitaire

2020 Animation de Travaux Pratiques en L3, Université d'Evry Val d'Essonne

2021 Animation de Travaux Pratiques en L3, Université d'Evry Val d'Essonne

Publications

- **Pluripotent Stem Cell-Based Drug Screening Reveals Cardiac Glycosides as Modulators of Myotonic Dystrophy Type 1.** Maury Y, Poydenot P, Brinon B, Lesueur L, Gide J, Roquevière S, Côme J, Polvèche H, Auboeuf D, Alexandre Denis J, Pietu G, Furling D, Lechuga M, [Baghdoyan S](#), Peschanski M, Martinat C. *iScience*. 2019 Jan 25;11:258-271.
- **Expression of miRNAs from the Imprinted DLK1/DIO3 Locus Signals the Osteogenic Potential of Human Pluripotent Stem Cells.** Barrault L, Gide J, Qing T, Lesueur L, Tost J, Denis JA, Cailleret M, Aubry L, Peschanski M, Martinat C, [Baghdoyan S](#). *Cells*. 2019 Nov 26;8(12):1523.
- **Pharmacological research and pluripotent stem cells: from the innovative experimental paradigm to the successful clinical trial.** [Baghdoyan S](#), Bassez G, Audureau E, Peschanski M. *Med Sci (Paris)*. 2019 Jan;35(1):26-29.
- **Improved mobility with metformin in patients with myotonic dystrophy type 1: a randomized controlled trial.** Bassez G, Audureau E, Hogrel JY, Arrouasse R, [Baghdoyan S](#), Bhugaloo H, Gourlay-Chu ML, Le Corvoisier P, Peschanski M. *Brain*. 2018 Oct 1;141(10):2855-2865.
- **In Vitro and In Vivo Modulation of Alternative Splicing by the Biguanide Metformin.** Laustriat D, Gide J, Barrault L, Chautard E, Benoit C, Auboeuf D, Boland A, Battail C, Artiguenave F, Deleuze JF, Bénit P, Rustin P, Franc S, Charpentier G, Furling D, Bassez G, Nissan X, Martinat C, Peschanski M, [Baghdoyan S](#). *Mol Ther Nucleic Acids*. 2015 Nov 3;4:e262.
- **Cell microarrays and functional genomics.** Roupioz Y, Castel D, Pitaval A, [Baghdoyan S](#), Gidrol X. *Med Sci (Paris)*. 2005 May;21(5):535-8. Review. French.
- **Id2 reverses cell cycle arrest induced by g-irradiation in human HaCaT keratinocytes.** [Baghdoyan S](#), Lamartine J, Castel D, Pitaval A, Roupioz Y, Franco N, Duarte M, Martin MT, Gidrol X. *J Biol Chem*. 2005 Apr 22;280(16):15836-41.
- **Quantitative analysis of highly parallel transfection in cell microarrays.** [Baghdoyan S](#), Roupioz Y, Pitaval A, Castel D, Khomyakova E, Papine A, Soussaline F, Gidrol X. *Nucleic Acids Res*. 2004 May 21;32(9):e77
- **Capture of cytokine-responsive genes (NACA and RBM3) using a gene trap approach.** [Baghdoyan S](#), Dubreuil P, Eberlé F, Gomez S. *Blood*. 2000 Jun 15;95(12):3750-7.

Brevets / Essais cliniques

2010 - Methods and compositions comprising ampk activator (metformin/troglitazone) for the treatment of myotonic dystrophy type 1 (dm1). EP 2552435 A1

2012 - Methods for modulating rna alternative splicing in a subject in need thereof. EP13305478.3

2012 - [Essai clinique Metforgene](#), NCT 01349387

2014 - [Essai clinique Myomet](#), EudraCt number: 2013-001732-21

Collaborations

Collaborateurs	Laboratoire / Localisation
Didier Auboeuf	Laboratoire de Biologie et Modélisation de la Cellule, ENS, Lyon
Jean-François Deleuze	Centre National de Recherche en Génomique Humaine, Evry
Anne Boland	Centre National de Recherche en Génomique Humaine, Evry
Jorg Tost	Institut de biologie François Jacob, Evry
Pierre Rustin	UMR_S1141 - Université Paris Diderot, Paris
Charbel Massaad	UMRS 1124, Paris
Edor Kabashi	Institut du Cerveau et de la Moelle, Paris
Guillaume Bassez	Institut de Myologie, CHU Pitié-Salpêtrière Paris
Denis Furling	Institut de Myologie, Paris
Nicolas Charlet	IGBMC, Strasbourg
Geneviève Gourdon	Institut Imagine, Paris
Guillaume Charpentier	CERITD, Evry

Résumé de carrière

Mon activité de recherche a débuté en 1997, au cours de mes stages de DEA et de doctorat dans le domaine de la Biologie des cellules sanguines à Marseille dans l'unité INSERM U119 au sein de l'équipe du Dr Patrice Dubreuil sous la direction du Dr Sophie Gomez. La thématique de cette recherche a porté sur l'identification des gènes de réponse au GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor), une cytokine jouant un rôle crucial au cours de l'hématopoïèse, par une stratégie de génétique inverse appelée « gene-trap ». L'hématopoïèse est un processus développemental de production des différents types de cellules sanguines à partir de cellules souches de la moelle osseuse. Ce programme de différenciation est finement régulé par une gamme de facteurs de croissances appelées cytokines qui contrôlent l'homéostasie du compartiment sanguin en assurant i) le renouvellement des cellules sanguines et ii) leur différenciation vers différents lignages hématopoïétiques (lymphocytes, érythrocytes, mégacaryocytes, granulocyte macrophages, polynucléaires neutrophiles, ...). Parmi ces différentes cytokines, le GM-CSF assure l'amplification de plusieurs cellules progénitrices ainsi que leur engagement irréversible vers l'un de ces différents types cellulaires. Un enjeu important était d'identifier les mécanismes moléculaires mis en jeu par le GM-CSF via l'identification des gènes de réponse à cette cytokine pour connaître son mécanisme d'action sur la différenciation cellulaire mais aussi le développement de cancer dans le cas de mutations activatrices de son récepteur. A une époque où les études transcriptomique n'avaient pas encore vu le jour, nous avons utilisé une

approche originale d'identification de gènes par piégeage de gène ou *gene-trap*, précédemment utilisée chez la souris ou la drosophile pour identifier des gènes transcriptionnellement actifs en réponse à un stimulus. Grâce à cette approche de génétique inverse, nous avons pu identifier NACA comme un gène de réponse à cette cytokine (Baghdoyan, Dubreuil, Eberle, & Gomez, 2000). Les travaux poursuivis dans l'équipe sur ce gène ont révélé sa fonction cruciale dans l'engagement des progéniteurs hématopoïétiques vers le lignage érythroïde (Lopez et al., 2005). Ces travaux m'ont sensibilisé à la puissance des approches de génomique fonctionnelle pour l'annotation fonctionnelle du génome.

Pour la suite de mon parcours, je me suis donc tournée pour mon stage post-doctoral vers le laboratoire d'exploration fonctionnelle des génomes du Commissariat à l'énergie atomique d'Evry sous la direction du Dr Xavier Gidrol. Ce laboratoire a été l'un des premiers à produire et distribuer aux différents laboratoires académiques français des puces d'analyse transcriptomique avant que celles-ci soient distribuées par des sociétés telles qu'Affymetrix. L'objectif du projet de recherche proposé par ce laboratoire était double : i) Analyser et exploiter une liste transcriptomique de gènes exprimés par des kératinocytes en réponse aux radiations ionisantes et ii) développer un nouvel outil de génomique fonctionnelle par criblage d'ARN interférents dans un format de puce à cellules. L'analyse des gènes de réponses aux radiations ionisantes par les kératinocytes humains permet d'identifier des mécanismes moléculaires qui peuvent conduire à la tumorigénèse des tissus exposés aux radiations ou bien à l'inverse à des mécanismes de contrôle de l'intégrité cellulaire, de réparation et d'adaptation. Parmi la liste de gènes modulés nous nous sommes particulièrement intéressés au gène *ID2*. Par des expériences d'ARN interférence ou de surexpression, nous avons mis en évidence le rôle d'*ID2* dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Les travaux que nous avons réalisés montrent que ce gène, induit après exposition des kératinocytes à des doses modérées de radiation ionisantes était impliqué dans le retour à la prolifération des cellules (Baghdoyan et al., 2005). Le second projet développé au cours de mon stage post-doctoral a été consacré au développement d'une puce à cellules de criblage de petits ARN interférents. Similairement aux puces à ADN, le concept de puce à cellule publiée cette année-là par une équipe du MIT montrait qu'il était possible d'imprimer sur lame de verre des collections de cDNA complexés à un lipofectant et de procéder à une transfection inverse de ces collections dans des cellulesensemencées sur ces lames de verre. Par cette approche, il devenait possible de cribler des collections de cDNA et de rechercher par immuno-fluorescent des variations de marquages dans les îlots de cellules transfectées par un cDNA particulier. Mon projet a consisté à décliner cette version de puce à cellules au criblage de petits ARN interférant associé au développement d'un logiciel de détection automatisée d'îlot de cellules transfectées exprimant un phénotype d'intérêt (Baghdoyan et al., 2004). Cet outil a par la suite été utilisé pour le développement de procédés lab-on-a chip par d'autres équipes. Au sein du laboratoire, cet outil a contribué à l'identification de facteurs de transcription impliqués dans le contrôle transcriptionnel du gène. A la fin de mon stage post-doctoral, c'est donc très naturellement que j'ai rejoint à sa création le laboratoire I-Stem qui souhaitait développer des criblages de génomique fonctionnels dédiés aux maladies rares.

Depuis janvier 2005, j'effectue mes travaux de recherche à I-Stem (Institut des cellules Souches pour le Traitement et l'Etude des maladies Monogéniques) qui est devenu, au 1^{er} janvier 2007, l'unité mixte de recherche INSERM/UEVE 861. La particularité de l'approche développée par ce laboratoire est d'étudier les maladies rares via l'exploitation du potentiel des cellules souches pluripotentes humaines pour des approches de thérapie cellulaire régénératrice, de modélisation pathologique et de criblage de petits ARN interférant ou de composés chimiques. Au sein de ce laboratoire, j'ai effectué un second

stage post-doctoral à l'issue duquel j'ai été recrutée en tant qu'ingénieur de recherche INSERM et intégré l'équipe Maladies du Motoneurone dirigée par le Dr Cécile Martinat. Dans cette équipe, je suis responsable de programmes de recherche et assure l'encadrement d'un ingénieur d'étude, de stagiaires (BTS, Master 1 ou Master 2) et d'une doctorante. Mon activité de recherche est dédiée à l'identification de nouveaux traitements pour les maladies neuromusculaires rares et notamment la Dystrophie Myotonique de type 1 (DM1).

Au sein d'I-Stem, ma mission a consisté en la réalisation d'un crible de génomique fonctionnelle pour identifier des gènes modulateurs des atteintes cellulaires de la maladie dans des progéniteurs du mésoderm (MPCs) dérivés à partir de lignées de cellules souches embryonnaires humaines porteuses de la mutation causale de la DM1 (hES). Dans ce but, j'ai développé deux essais de criblage dédiés à la DM1 : i) la détection d'agrégats intranucleaires toxiques contenant le transcrit mutant par RNA fish au format de plaque à 96 puits et ii) l'analyse par PCR quantitative du défaut d'épissage du récepteur à l'insuline (*INSR*), dérégulé dans cette maladie. Avoir obtenu des financements nécessaires à l'acquisition d'un microscope automatique d'analyse d'image à haut débit et un appareil de PCR quantitative au format de plaques à 384 puits, nécessaires à la détection des deux essais développés, nous avons réalisé un crible pilote de protéines de fixation à l'ARN. Nous avons ainsi identifié le gène *ELAVL1* pour sa capacité à moduler différents épissages dérégulés dans la DM1. L'activité de ce gène étant régulée par un anti-diabétique, nous avons caractérisé l'effet de ce médicament, la metformine sur différents modèles cellulaires de la DM1 et avons montré son intérêt pour corriger des défauts d'épissages associés à la maladie. Par des approches de biologie cellulaire et de biochimie, nous avons montré que le mécanisme d'action de cet effet implique l'activation de l'AMPK et la régulation du facteur d'épissage RBM3 mais aussi d'autres mécanismes non identifiés à ce jour (Laustriat et al., 2015). Afin de progresser vers une potentielle utilisation en clinique de ce composé pour des patients atteints de DM1, nous avons développé une collaboration avec le Dr Guillaume Charpentier (Hôpital Sud Francilien, Corbeil-Essonnes, CERITD, Evry) car la metformine est anti-diabétique utilisé en première ligne pour le traitement de la résistance à l'insuline chez des patients atteints de diabète de type 2 dont l'indication pourrait être repositionnée pour la DM1. Grâce à l'essai clinique Metforgene (NCT 01349387) mis en place, nous avons pu quantifier l'effet de ce composé sur l'épissage alternatif du récepteur à l'insuline, altéré dans la DM1, dans des prélèvements sanguins de patients diabétiques et avons conclu à son efficacité sur l'épissage à des doses correspondant à sa posologie. Ces travaux ont contribué à identifier les activateurs de l'AMPK comme cible thérapeutique pour la DM1 (Demande d'invention PCT/EP2011/055099.), postulat qui a depuis été validé in vivo dans un modèle animal de la maladie par une équipe suisse travaillant sur la maladie (Brockhoff et al., 2017).

Le potentiel repositionnement de la metformine pour la DM1 a été exploré dans l'essai clinique Myomet de phase I/II (EudraCT number: 2013-001732-21) visant à évaluer le potentiel thérapeutique de cette molécule chez des patients atteints de DM1 au Centre d'investigation clinique de l'Hôpital Henri Mondor de Créteil sous la direction du Pr Guillaume Bassez. Cet essai a été réalisé en double aveugle contre placebo chez 40 patients DM1. Dans cette étude, notre participation a consisté à réaliser le suivi de l'effet de la metformine sur l'expression de biomarqueurs dans des prélèvements sanguins des patients participant à l'essai. Les résultats obtenus au cours de cet essai ont été publiés dans le journal *BRAIN* (Bassez et al., 2018).

La possibilité d'amener notre étude pharmacologique sur la DM1 à la clinique nous a encouragés à élargir notre approche de repositionnement de molécules possédant une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) à d'autres maladies rares. Dans ce but, nous avons eu recours à une approche génome entier par séquençage à haut débit, d'étude des modulations d'expression et d'épissage de transcrits dans des cellules précurseurs du mésenchyme dérivées de cellules souches embryonnaires humaines en réponse à un panel de molécules disposant d'une AMM. Pour la réalisation de ce projet, sélectionné lors de l'appel à projet grand séquençage France Génomique, nous avons développé une collaboration avec les équipes du Dr Jean-François Deleuze (Centre National de Genotypage, Evry) et du Dr Didier Auboeuf (INSERM, ENS Lyon) pour la partie séquençage à haut débit et les analyses bioinformatiques. Grâce à cette approche, nous avons identifié le potentiel de repositionnement de molécules pour deux Leucodystrophies, la Maladie de Pelizaeus-Merzbacher (PMD) et la Leucodystrophie autosomique dominante de l'adulte (ADLD) ainsi qu'une Neuropathie, la sclérose latérale amyotrophique (SLA). Pour la suite du projet je me suis concentrée sur la régulation du gène SQSTM1 dont la mutation conduit à la SLA. Nous avons montré que le mécidament candidat au repositionnement, le Prazosin, était capable de stimuler le flux autophagique défectueux dans des fibroblastes de patients mais aussi dans des motoneurons dérivés d'IPS SQSTM1+/- que nous avons générés par la technologie CRISPR/Cas9. En collaboration avec le Dr Edor Kabashi, nous avons pu démontrer que l'administration de Prazosin à des zebrafish SQSTM1 +/- améliore leur qualité de nage indiquant que ce composé pourrait être intéressant pour le traitement de la SLA associée aux mutations de SQSTM1.

Parallèlement à ces études dédiées aux maladies rares, je me suis intéressée à l'importance de l'intégrité de l'imprinting du génome des cellules pluripotentes pour leur utilisation en modélisation pathologique ou en thérapie cellulaire. En effet, lors de l'étude de microRNAs différentiellement exprimés dans les MPCs DM1 versus MPCs saines, j'ai identifié un cluster de microRNAs anormalement réprimé dans les MPCs issus de lignées de hES contrôles. De façon intéressante, ces microRNAs appartenaient à un même locus soumis à l'imprinting parental. En étudiant le profil de méthylation des séquences régulatrices de ce locus, nous avons pu mettre en évidence un défaut d'imprinting dans un certain nombre de lignées de hES et d'IPS du laboratoire. Afin de caractériser l'impact d'une telle anomalie épigénétique, nous avons analysé par bioinformatique les cibles de ces microRNAs et avons mis en évidence les récepteurs de la famille du TGF β . Parmi ceux-ci le récepteur AVCR2B était ciblé par une dizaine des microRNAs du cluster. Ce récepteur étant impliqué dans la différenciation ostéogénique, nous avons caractérisé le potentiel de différenciation vers ce lignage de plusieurs lignées de cellules souches pluripotentes et avons montré une corrélation entre leur capacité à se différencier en oséoblastes et le statut d'imprinting du locus contenant les microRNAs. Par des expériences de Western blot et de surexpression de gènes, nous avons démontré l'implication d'ACVR2 dans ce processus. Ces résultats publiés dans le journal *Cells* (Barrault et al., 2019) montrent l'importance d'intégrer l'analyse du statut d'imprinting parental dans le contrôle de la qualité des lignées de cellules souches pluripotentes.

Chapitre 2. Exposé des principaux travaux de recherche

Par les thématiques communes abordées pendant ma formation post-doctorale et mes travaux de recherche effectués à I-Stem, à savoir la modélisation pathologique à l'aide des cellules souches pluripotentes, j'ai volontairement choisi de ne focaliser que sur les résultats obtenus pendant ces deux périodes. Ce choix a également été motivé par le souci de rendre un exposé clair tendant à démontrer à la fois l'acquisition d'une stratégie de recherche autonome ainsi que la capacité à former et encadrer des étudiants.

Depuis le début de ma thèse, j'ai eu l'opportunité de m'intéresser à des sujets très différents allant de la recherche fondamentale à des approches plus appliquées. Ces différentes expériences m'ont aidé à cerner les domaines scientifiques dans lesquels je souhaitais poursuivre mon parcours professionnel. Par un souci de cohérence, j'ai choisi de ne décrire dans ce mémoire que les travaux réalisés depuis mon arrivée à I-Stem, essentiellement fondés sur l'utilisation des cellules souches pluripotentes pour le traitement de maladies rares.

Introduction : Les lignées de cellules souches Pluripotentes

Les cellules souches embryonnaires

Historique

En 1981, les équipes de Martin et Evans décrivaient pour la première fois les techniques d'isolement et de culture de cellules souches pluripotentes chez la souris (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981). Ces travaux pionniers ont établis les techniques de référence pour la dérivation et la culture de cellules souches embryonnaires employées avec succès chez le primate non humain en 1995 puis chez l'Homme en 1998 par Thomson et al. (Thomson et al., 1998; Thomson et al., 1995) Ces travaux ont été suivis par ceux de Reubinoff et al. en 2000 qui publient également la dérivation de lignées de CSEh et montrent pour la première fois leur capacité à se différencier *in vitro* en cellules somatiques grâce à l'obtention de neurones (Reubinoff, Pera, Fong, Trounson, & Bongso, 2000). Si l'on considère les conditions de culture des CSEh décrites dans ces deux articles, on peut observer qu'il n'y a pas d'écarts importants avec celui des CSE murines et l'on peut se demander quel élément clé a permis la réussite de l'expérience par Thomson. Le succès de cette équipe a été attribué à leur expérience en matière de culture de cellules souches embryonnaires de singe. En effet, les cellules souches pluripotentes de primates présentent des particularités de morphologie et de conditions de culture telle que leur résistance à la dissociation individuelle. Un autre le facteur pouvant expliquer ce succès est l'amélioration concomitante de la procédure de culture d'embryons qui a contribué à un taux élevé de production de blastocystes de bonne qualité (Gardner & Lane, 1998).

Obtention

En pratique, les cellules souches embryonnaires proviennent d'embryons surnuméraires obtenus par fécondation *in vitro* en prévision d'un projet parental finalement abandonné. Les cellules sont prélevées entre le 5^e et le 7^e jour suivant une fécondation *in vitro* (stade blastocyste du développement embryonnaire). Les embryons sont d'abord traités avec une solution de Tyrode pour éliminer la zone pellucide. Le trophoctoderme est ensuite éliminé par immuno-chirurgie pour isoler les cellules de la masse cellulaire interne. Le protocole d'immunochirurgie comprend une pré-incubation

avec un antisérum, un rinçage avec un milieu de dérivation hES pour éliminer les anticorps, une exposition au complément, puis l'élimination du trophoctoderme lysé à l'aide d'une pipette. Cette technique est utilisée pour isoler la masse cellulaire interne du blastocyste qui est ensuite en culture sur une couche de cellules nourricières de fibroblastes embryonnaires murins rendus quiescents par traitement chimique à la Mitomycine ou par irradiation. Après une brève période d'adhérence et d'expansion, la masse cellulaire résultante est dissociée et réensemencée sur un tapis de cellules nourricières (Thomson et al., 1998). Du point de vue morphologique, les cellules souches embryonnaires humaines sont des cellules de petite taille. La majeure partie de leur volume est occupé par le noyau dans lequel les nucléoli sont distinctement visibles. Ces cellules croissent en colonie cellulaires dont les contours sont nettement délimités (Figure 1).

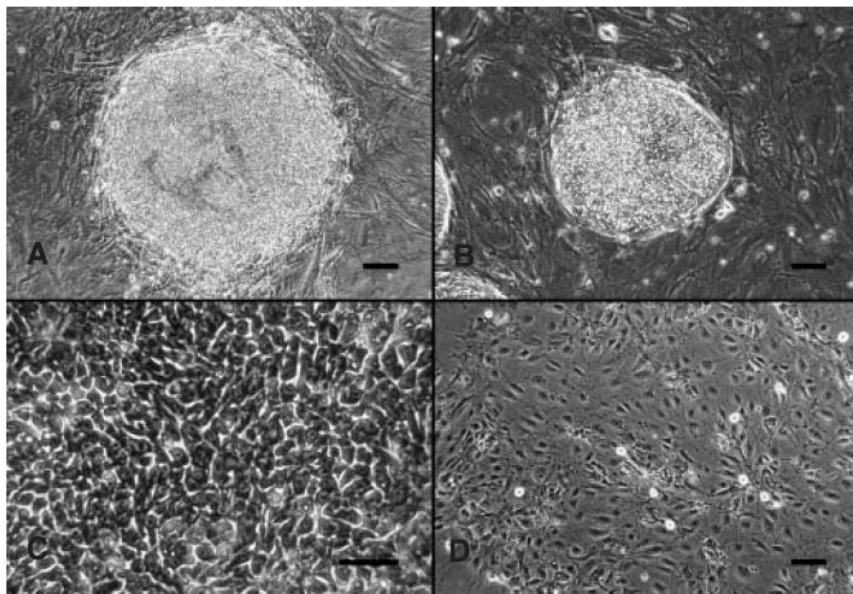


Figure 1. Dérivation de la lignée de cellules souches embryonnaires humaines H9. (A) Cellules de la masse interne cultivée sur une couche de cellules nourricières de fibroblastes embryonnaires fœtaux murins. (B) Colonie de cellules hES H9 (C) cellules souches embryonnaires observées à fort grossissement. (D) Cellules souches embryonnaire en différenciation. (Thomson et al., 1998).

Les CSEh ont longtemps été amplifiées par ensemencement sur cellules nourricières et découpage à l'aiguille. Ces méthodes de culture, longues et onéreuses, ont par la suite été simplifiées. La culture sur cellules nourricières a été remplacée par des coating à la fibronectine, la laminine, le matrigel ou la vitronectine (Amit, Shariki, Margulets, & Itskovitz-Eldor, 2004; Draper, Moore, Ruban, Gokhale, & Andrews, 2004; Xu et al., 2001). En parallèle, le FGF2 (*Fibroblast Growth Factor 2*), l'Activine A, et le TGFβ ont été identifiés pour leur capacité à contrôler le maintien de l'état pluripotent et l'amplification des CSEh (Dvorak et al., 2005; Vallier, Alexander, & Pedersen, 2005) et incorporés aux milieux de culture. Enfin, Watanabe et al sont parvenus à bloquer l'induction de l'apoptose des CSEh lors de leur dissociation en utilisant le Y-27632, un inhibiteur sélectif de la Rho kinase. Cette découverte a contribué à l'augmentation de l'efficacité du clonage in vitro (de 1% à 27%) et du sous-clonage après le transfert de gène (Watanabe et al., 2007).

Actuellement, près de 485 de lignées de hES saines ou porteuses de mutations causales de maladies sont référencées par le NIH pour le financement de projets de recherche.

Cadre Légal

La dérivation de lignées de hES nécessite la destruction d'embryons surnuméraires obtenus lors de la fécondation in vitro et dépourvus de projet parental. En conséquence leur production est soumise à un cadre légal qui a évolué au cours du temps et des avancées technologiques réalisées dans le domaine.

Si la loi interdit toute recherche sur l'embryon ou les cellules souches embryonnaires qui en dérivent (CSEh) en 1994, elle introduit des possibilités de dérogation en 2004, puis en 2011. En 2013 (loi n° 2013-715 du 6 août 2013), l'interdiction de principe est levée, et c'est un régime d'autorisation encadrée qui s'applique. Les recherches sur l'embryon et sur les CSEh ont toujours été regroupées sous un même régime juridique. Depuis 2004, la loi délègue à l'Agence de la biomédecine la responsabilité de délivrer les dérogations, et, depuis 2013, les autorisations, après examen, des protocoles de recherche et des demandes d'importation et de conservation des lignées CSEh, qui lui sont soumis.

En vertu du II de l'article L. 2151-5 du code de la santé publique, une recherche ne peut être menée qu'à partir d'embryons conçus in vitro dans le cadre d'une assistance médicale à la procréation et qui ne font plus l'objet d'un projet parental. La recherche ne peut être effectuée qu'avec le consentement écrit préalable du couple dont les embryons sont issus, ou du membre survivant de ce couple, par ailleurs dûment informé des possibilités d'accueil des embryons par un autre couple ou d'arrêt de leur conservation. Ce consentement doit être confirmé à l'issue d'un délai de réflexion de trois mois et peut être révoqué sans motif tant que les recherches n'ont pas débuté.

En ce qui concerne l'utilisation des lignées de CSEh, tout nouveau projet de recherche sur les lignées de CSEh requiert une demande initiale d'autorisation de protocoles de recherche, d'importation ou de conservation. L'autorisation peut alors être délivrée pour une durée de 5 ans, période au cours de laquelle les chercheurs doivent rédiger un rapport annuel faisant état de l'utilisation des lignées. A l'issue des 5 ans, une demande de renouvellement doit être adressée à l'Agence de la Biomédecine. Les chercheurs ont le choix d'utiliser des lignées dérivées en France (Liste disponible sur le site de l'ABM) ou bien des lignées dérivées à l'étranger pour lesquelles il doivent faire une demande d'importation auprès de l'ABM. La traçabilité des lignées et cellules différenciées à partir de cellules souches embryonnaires humaines entre équipes de recherche doit être assurée par les équipes de recherche et déclarées auprès de l'Agence de la biomédecine. La liste des équipes autorisées à mener des recherches sur des CSEh est disponible sur le site de l'ABM (https://www.agence-biomedecine.fr/IMG/pdf/internet_tableauprotocolesrech3.pdf).

Depuis plusieurs années, le nombre de demande d'autorisation de protocoles utilisant des lignées de CSEh s'est stabilisé après une forte chute à partir de l'année 2007. Au total, 98 protocoles ont été lancés et 58 sont encore en cours (Figure 2).

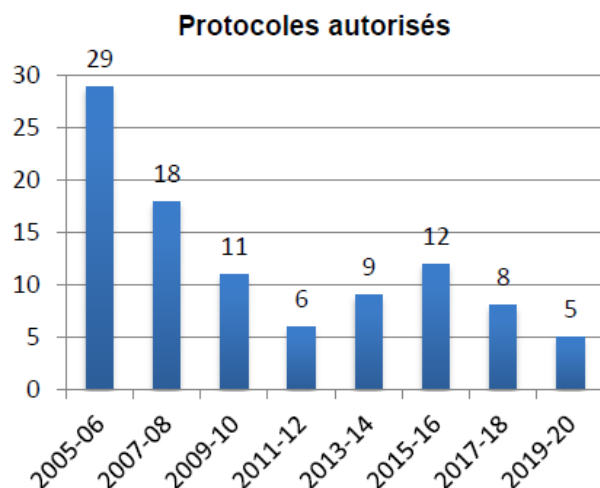


Figure 2. Nombre de demandes d'autorisations déposées par année auprès de l'Agence de la Biomédecine (Bilan sur 15 ans de la recherche sur les CSEh par l'Agence de la Biomédecine)

Cette diminution entre 2007 et 2012 a sans doute plusieurs origines. On peut citer l'importance des moyens financiers à mettre en œuvre pour ce type de recherche, la lourdeur administrative mais aussi la possibilité, depuis 2007, de travailler avec des cellules souches pluripotentes reprogrammées ou IPS (*induced Pluripotent Stem cells*). Ne posant pas les mêmes questions éthiques que les cellules souches embryonnaires, elles ne requièrent pas d'autorisation spécifique.

Les cellules souches pluripotentes reprogrammées ou IPS (*induced Pluripotent Stem cells*)

Historique

Le franchissement séquentiel de différents verrous technologiques et scientifiques a été nécessaire à la génération des lignées d'IPS. Dans les années 1950, les travaux de Briggs and King (Briggs & King, 1952; King & Briggs, 1955) ont établi la technique de SCNT, ou «clonage», qui consiste à transplanter dans des ovocytes énucléés des noyaux isolés à partir d'embryons de têtards de stade avancé afin de révéler leur potentiel de développement. A l'aide de cette technique, Gurdon et al ont réussi à générer des têtards en transplantant des noyaux provenant de cellules cutanées kératinisées de pattes de *Xenopus* adulte dans des œufs énucléés de la même espèce (Gurdon, Laskey, & Reeves, 1975). Par cette expérience, les auteurs montrent que la différenciation cellulaire n'impose pas de perte ou de modification épigénétique irréversibles du génome. Ces travaux ont par la suite été étayés par ceux d'autre équipes telles que celle de Campbell avec la génération de la brebis Dolly à partir d'expériences de transfert nucléaire utilisant des noyaux de cellules différenciées (Wilmut, Schnieke, McWhir, Kind, & Campbell, 1997) mais aussi celle de Wakayama qui publie la dérivation d'une vingtaine de lignées de souris générées par transfert nucléaire à partir de cellules somatiques saines ou porteuses de mutations (Wakayama et al., 2001). Parallèlement à ces premiers travaux de reprogrammation, plusieurs équipes démontraient que certains facteurs de transcription pouvaient suffire, lors de leur surexpression, à changer le destin cellulaire de cellules somatiques adultes tandis que d'autres identifiaient des facteurs de transcription spécifiques de l'état pluripotent tels que *Oct3/4* (Davis, Weintraub, & Lassar, 1987; Nichols et al., 1998; Niwa, Miyazaki, & Smith, 2000), *Sox2* (Ailion et al., 2003), et *Nanog* (Chambers et al., 2003; K. Mitsui et al., 2003). Ces différentes découvertes, associée

à la simplification des méthodes de culture des cellules souches embryonnaire humaines, ont abouti en 2006 à l'identification par Takahashi et al d'une méthode de reprogrammation des cellules somatiques adultes en cellules souches pluripotentes grâce à la surexpression d'un cocktail de 24 facteurs de transcription chez la souris (K. Takahashi & Yamanaka, 2006). Après des tests de combinatoire visant à réduire le nombre de facteurs, quatre d'entre eux apparaissent comme suffisants pour la reprogrammation des cellules somatiques en cellules souches pluripotentes : *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, et *c-Myc*. L'année d'après, cette méthode a été appliquée à la reprogrammation de fibroblastes humains par la surexpression de ces même 4 facteurs de transcription (K. Takahashi et al., 2007) nommée OKSM (pour : OCT3/4, SOX2, KLF4 et c-MYC) (Figure 3).

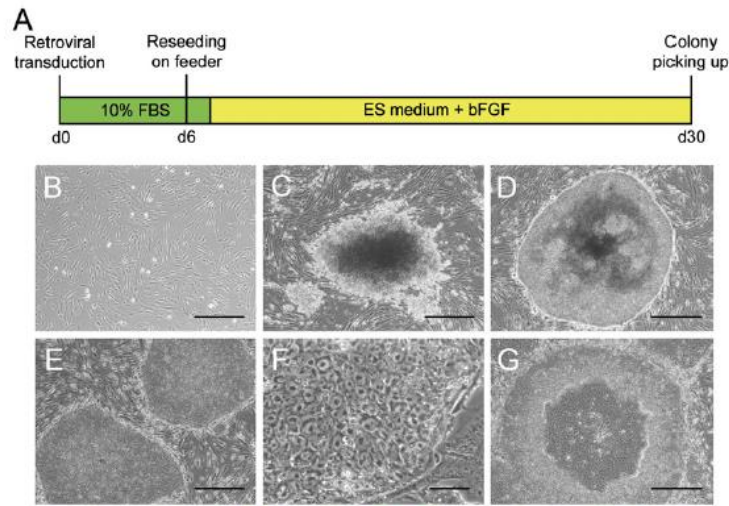


Figure 3. Génération de cellules induites à la pluripotence à partir de fibroblastes adultes du derme humain. A) Echelle de temps B) Morphologie des fibroblastes, C) Image d'une colonie non reprogrammée, D) Image d'une colonie reprogrammée, E) Lignée établie au passage 4 F) Image de cellules IPS à fort grossissement, G) Différenciation spontanée de cellules au centre d'une colonie d'IPS (K. Takahashi et al., 2007).

Les auteurs de cette étude montrent que les lignées d'iPS humaines présentent les même caractéristiques morphologiques, prolifératives et phénotypiques que les iPS murines. Lors de la reprogrammation, les promoteurs de différents gènes *OCT-3/4*, *REX1*, *NANOG* sont déméthylés et deviennent actifs, assurant la transition vers la pluripotence. Sur le plan fonctionnel, ces hiPSCs réexpriment la télomérase et sont capables de se différencier vers les trois feuilletts embryonnaires après agrégation en corps embryoides. Leur potentiel de différenciation est plus particulièrement qualifié par une différenciation directe guidée en neurones et cardiomyocytes à partir des protocole disponibles à cette date (Kawasaki et al., 2000; Laflamme et al., 2007) Enfin leur injection dans des souris SCID conduit à la formation de tératomes contenant des dérivés de l'ectoderme, endoderme et mésoderme. En 2009, Sridharan et al caractérisent les trois principales étapes de la reprogrammation : la phase initiale, une phase intermédiaire associée à des lignées partiellement reprogrammées et la phase finale d'iPS reprogrammées. En comparant les facteurs de transcription exprimés et actifs à chacune de ces étapes, ils dissèquent la contribution respective des facteurs OKSM. A la différence de *OCT-3/4*, *KLF4* et *SOX2*, *c-MYC* ne contribue pas à l'activation des régulateurs de la pluripotence. Son action intervient avant les régulateurs de la pluripotence en réprimant l'expression des gènes de l'identité cellulaire et reste nécessaire pour garantir un pourcentage élevé de reprogrammation (Sridharan et al., 2009).

Obtention

Dans leurs expériences, Takahashi et al transduisent les 4 facteurs OKSM dans des fibroblastes humains au moyen de lentivirus. Six jours après, les fibroblastes sontensemencés sur des cellules nourricières et le milieu de culture est remplacé le lendemain par du milieu de culture de cellules souches embryonnaires supplémenté en bFGF. Par cette méthode, ils obtiennent des colonies d'iPS 25 jours plus tard. Depuis ces travaux pionniers, de nombreuses études ont porté sur l'identification de méthodes de reprogrammation alternative afin d'en accroître l'efficacité. Celles-ci se sont rapidement orientées vers des méthodes non intégratives de reprogrammation dans lesquelles les facteurs OKSM sont par exemple apportés à la cellule somatique via la transfection répétées d'ARN synthétiques codant les facteurs OKSM (Warren et al., 2010). Actuellement les méthodes les plus utilisées font appel à des plasmides épisomaux (Yu et al., 2009) ou au virus de Sendaï (Fusaki, Ban, Nishiyama, Saeki, & Hasegawa, 2009). Dans ce dernier cas, les 4 facteurs de reprogrammation sont introduits dans la cellule sous la forme d'ARN simple brin ne pouvant s'intégrer à l'ADN génomique de l'hôte. En plus des fibroblastes, les kératinocytes et cellules sanguines ont rapidement émergé comme source alternatives de cellules somatiques pour la reprogrammation (Wahlster & Daley, 2016). Toutefois, l'utilisation de divers autres types cellulaires reste possible en fonction des contraintes relatives au matériel biologique disponible. Dans certains cas, une mémoire épigénétique de la cellule somatique d'origine est conservée même si cette mémoire tend à s'effacer lors de la culture à long terme des iPSCs (Kim et al., 2010). Cette mémoire réside dans la conservation de signatures de méthylation de l'ADN caractéristiques des cellules somatiques d'origine et qui favorisent leur différenciation vers le lignage des cellules utilisées lors de la reprogrammation.

Cadre légal d'utilisation et question éthique

La recherche sur les cellules souches pluripotentes de type IPS, (comme celle sur les cellules adultes humaines en général) est soumise aux conditions régissant la cession et l'utilisation des éléments et produits du corps humain. En d'autre terme, le patient donneur doit être consentant et informé de l'utilisation des échantillons prélevés. Pour expliquer le cadre légal de l'utilisation des IPS, j'ai choisi de citer une partie du texte : -Contribution du Comité consultatif national d'éthique à la révision de la loi de bioéthique 2018-2019 - : « La qualité du processus d'un choix libre et éclairé – prérequis du consentement - est l'un des fondements de l'éthique de la recherche, recherche fondamentale comme recherches biomédicales ». Au sein des cellules adultes, les IPS occupent une place particulière du fait qu'elles sont reprogrammées en cellules pluripotentes. « Compte tenu de la diversité des protocoles développant une recherche sur l'embryon ou sur les CSEh, et des questions éthiques nouvelles liées à l'émergence d'applications sensibles des cellules souches pluripotentes adultes (iPS), il paraît actuellement nécessaire d'approfondir la réflexion sur les procédures d'information et de consentement dans ces nouvelles situations. »

En effet, certaines applications à venir de ces lignées ne sont pas encore connues qui peuvent par exemple être modifiées génétiquement, ou bien soumises à un séquençage à haut débit et être exportés vers des pays possédant un autre un cadre légal. Ainsi, la question se pose de limiter le consentement du donneur dans le temps ou de lui donner une possibilité de rétractation. Alternativement, d'autres questions émergent : Faut-il limiter l'utilisation des cellules ou informer le donneur si une maladie est découverte dans le cadre de l'utilisation de ses cellules ?

Caractérisation des cellules souches pluripotentes humaines

Les cellules souches pluripotentes humaines sont identifiables par un ensemble de caractéristiques moléculaires, phénotypiques et fonctionnelles indissociables qui sont rapidement perdues lors de leur entrée en différenciation. Comme les cellules souches embryonnaires murines, les CSPh expriment le facteur de transcription OCT-4 (ou POU5F1) (Reubinoff et al., 2000). Chez la souris, il a été montré que l'expression zygotique de ce gène est nécessaire à l'établissement des cellules souches pluripotentes de la masse cellulaire interne (Nichols et al., 1998). On peut également caractériser ces cellules par l'analyse de l'expression de marqueurs membranaires spécifiques du stade pluripotent dont la fonction n'est pas exactement connue. Parmi ceux-ci, on trouve les antigènes embryonnaires SSEA-3 et SSEA-4 (Stage-Specific Embryony Antigen 3 and 4), portés par des glycolipides et reconnus par des anticorps monoclonaux initialement produits pour distinguer les premiers stades du développement de la souris. Un autre groupe d'antigènes associés à un protéoglycan de la matrice péricellulaire est détecté par les anticorps monoclonaux TRA-1-60 et TRA-1-80. Enfin, il est possible d'utiliser le substrat de la phosphatase alcaline, exprimée par ces cellules, pour marquer les colonies de CSPh.

Sur le plan fonctionnel, les CSPh sont dotées d'une activité télomérase. Cette activité, non retrouvée dans les cellules somatiques, prévient l'érosion des télomères à l'extrémité des chromosomes et la perte d'information génétique qui déclenchent l'entrée en sénescence de la cellule. Lors de la dérivation de leurs premières lignées de hES, Thomson et al. ont démontré que les lignées de hES présentaient une activité télomérase qui surpasse de 3 à 5 fois celle de la lignée cellulaire immortalisée MDA (Thomson et al., 1998).

Une autre caractéristique fonctionnelle spécifique des CSPh réside dans leur capacité à se différencier vers les trois feuilletts embryonnaires. Ce potentiel a d'abord été caractérisé *in vivo* par leur capacité à former des tératomes après injection dans des souris immuno-déficientes SCID (severe combined immunodeficiency)/Beige. Des clumps de 200 cellules injectés dans le testicule ou sous la capsule rénale de jeunes souris forment six à sept semaine après des masses cellulaires tridimensionnelles dans lesquelles des tissus différenciés tels que du cartilage, de l'épithélium squameux, du neuro-ectoderme, du muscle ou de l'os sont observés (Reubinoff et al., 2000) (Figure 4). En 2000, Itskovitz-Eldor et al., ont trouvé une alternative permettant de tester *in vitro* le potentiel de différenciation de lignées de hES. Ces cellules, cultivées en suspension, s'agrègent en corps embryoïdes, des structures tridimensionnelles cystiques. L'analyse par hybridation *in situ* ou PCR montre que ces corps embryoïdes expriment des gènes associés aux trois feuilletts embryonnaires : alpha-fetoprotéine, β -globine, α -cardiac actin ou neurofilament 68 Kd. Dans la même étude, les auteurs décrivent qu'après dissociation, il est possible d'ensemencer les cellules différenciées et de révéler par immunomarquage des cellules neuronales exprimant le marqueur neurofilament de 68kd (Itskovitz-Eldor et al., 2000).

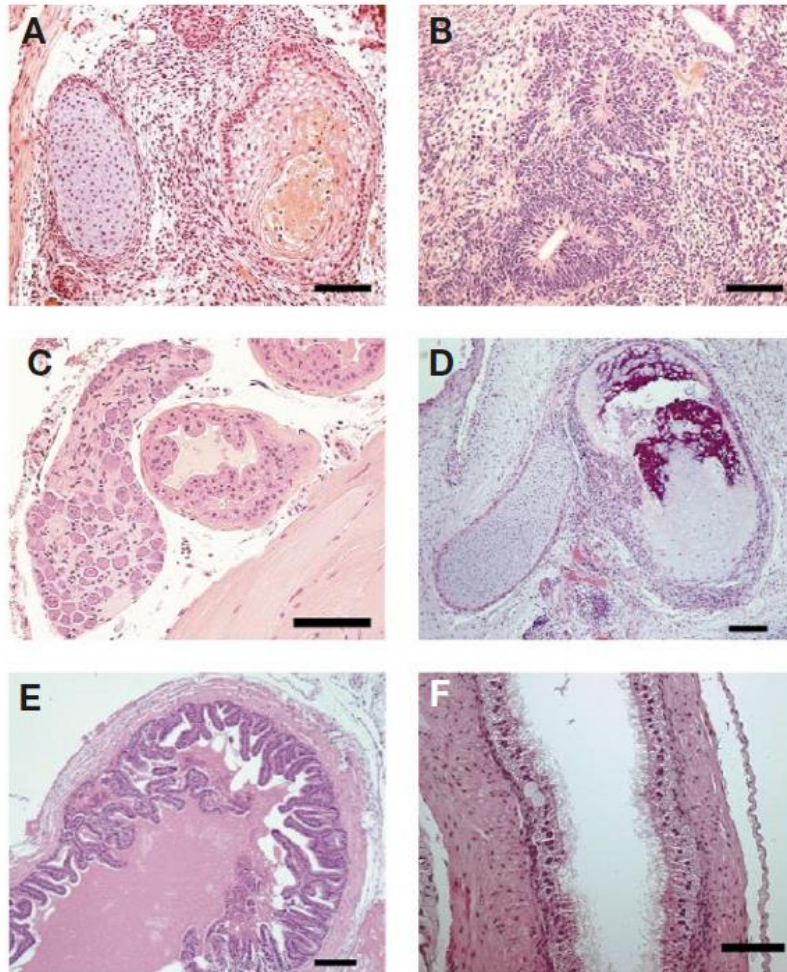


Figure 4. Analyse histologique des tératomes formés dans les testicules de souris SCID après inoculation de cellules de la lignée HES-1 montrant la présence de cartilage et d'épithélium squameux. (A), de rosettes neurales (B), de structures glandulaires et de muscle strié(C), d'os et de cartilage (D), d'épithélium glandulaire (E), d'épithélium cilié (F), Barres d'échelle : (A-E) : 100 mm; (F) 50 mm (Reubinoff et al., 2000).

Application des cellules souches pluripotentes humaines

Dès la démonstration de leur existence, Thomson et Reubinoff soulignaient l'étendue du potentiel d'application des cellules souches pluripotentes humaines. Ce champs d'application s'est encore étendu grâce à la génération des iPSCs permettant l'obtention de lignées à partir d'échantillons de patients. Les différentes thématiques d'études réalisées sur les CSPh peuvent se regrouper en 5 principales thématiques : l'étude du développement et de l'organogénèse, la thérapie cellulaire, la modélisation pathologique associée au criblage thérapeutique et la toxicologie prédictive. Chacune de ces thématiques étant en pleine expansion, je me focaliserai sur les études du contrôle de la différenciation pour la production de progénies d'intérêt, de la modélisation pathologique et du criblage thérapeute, thématiques sur lesquelles j'ai principalement travaillé.

Etude du développement

- **maintien de la pluripotence, était naïf versus pré-activé** : Plusieurs équipes de recherches se sont investies dans une meilleure compréhension des mécanismes qui assurent le maintien de la pluripotence afin d'identifier les réseaux de gènes et marques épigénétiques qui sous-tendent cet état cellulaire. Chez la souris, Nichols et Smith identifient en 2009 un état fondamental de pluripotence défini comme naïf versus un état « pré-activé » (primed selon les auteurs) qui peut être caractérisé par un ensemble de propriétés telles que l'expression soutenue de facteurs de transcription annexes tels que *sox2*, *klf2* et *klf4*, une réponse proliférative au LIF et l'absence d'inactivation du chromosome X (Table1).

Property	Ground State	Primed State
Embryonic tissue	early epiblast	egg cylinder or embryonic disc
Culture stem cell	rodent ESCs	rodent EpiSCs; primate "ESCs"
Blastocyst chimaeras	yes	no ^a
Teratomas	yes	yes
Differentiation bias	none	variable
Pluripotency factors	Oct4, Nanog, Sox2, Klf2, Klf4	Oct4, Sox2, Nanog
Naive markers ^b	Rex1, NrOb1, Fgf4	absent
Specification markers	absent	Fgf5, T
Response to Lif/Stat3	self-renewal	none
Response to Fgf/Erk	differentiation	self-renewal
Clonogenicity	high	low
XX status	XaXa	XaXi
Response to 2i	self-renewal	differentiation/death

^a Not applied to primate cells.
^b Representative examples.

Table 1. Comparaison des caractéristiques des états pluripotents et naïfs (Nichols & Smith, 2009).

Sur le plan fonctionnel, l'état naïf se distingue par la capacité des cellules ES de souris à s'incorporer dans l'épiblaste et à participer ainsi à la formation de tous les tissus constituant l'organisme adulte, y compris la lignée germinale une fois réintroduite dans un blastocyste hôte. Bien que les CSPh partagent de nombreuses caractéristiques avec les CSE murines naïves, elles partagent également des marques épigénétiques associées aux CSE murines « pré-activées » de l'épiblaste (Hanna et al., 2010). La comparaison de leur transcriptome à celui de l'épiblaste de singe macaque cynomolgus (ou macaque crabier), réalisée entre le 6e (blastocyste) et le 17e jour de développement (gastrula), montre que les cellules « ES » humaines ont un profil d'expression génique plus proche de celui de l'épiblaste tardif de la gastrula que de l'épiblaste précoce du blastocyste (Nakamura et al., 2016). Cependant, les CSPh peuvent également être converties vers un état de pluripotence naïve par manipulation chimique et génétique combinée. Différentes études ont rapporté que la double inhibition des kinases MEK et GSK3 (méthode 2i), le LIF (*Leukemia Inhibiting Factor*) et la surexpression des facteurs de transcription associés à la pluripotence naïve peuvent induire des caractéristiques de pluripotence associées à l'état

fondamental (Carbognin, Betto, Soriano, Smith, & Martello, 2016; Hanna et al., 2010). Par la suite, des conditions de cultures définies ont permis la dérivation de lignées d'IPS et de hES naïves à partir de cellules somatiques ou de blastocyste. L'injection de ces cellules injection dans des morula de souris montre leur capacité à coloniser des embryons chimériques et de participer à l'organogénèse (Gafni et al., 2013). L'obtention de telle lignées de CSPh naïves est motivé par la nécessité de comprendre les mécanismes qui permettent l'entrée en différenciation au cours des transitions développementales précoces afin d'optimiser les protocoles de différenciation mais aussi de disposer de CSPh à l'intégrité génétique conservée pour la thérapie cellulaire. En effet, les hCSPs « pré-activées » sont beaucoup, plus promptes à se différencier et sont génétiquement plus instables que les cellules naïves dont la fonction première dans l'embryon est uniquement l'amplification rapide du stock de cellules pluripotentes avant l'implantation.

-Compréhension des mécanismes de différenciation : La capacité des CSPh a rapidement pu être mise en évidence à travers la formation de corps embryoïdes qui une fois dissociés et mis en culture révélait la présence de plusieurs types cellulaires. Certaines approches expérimentales visent la compréhension des mécanismes développementaux mis en jeu pour la genèse de lignages cellulaires en identifiant les voies de signalisation cellulaires qui gouvernent la spécification cellulaire. Ainsi, Chal et al ont d'abord identifié que la production in vitro des progéniteurs du mésoderme PA7+ avec des CSP murines nécessitait l'activation des voies WNT et BMP associées à l'inhibition de la voie FGF (Chal et al., 2018). Par la suite, ces conditions ont pu être adaptées chez l'homme pour la production in vitro de cellules humaines foetale satellite à partir d'IPS capables de se renouveler in vitro et in vivo et de produire des myofibres (Al Tanoury et al., 2020). Certaines de ces études ont optimisé ce type d'approche en procédant à des combinatoires de morphogènes afin d'identifier les doses optimales à utiliser tout en produisant des populations homogènes de cellules pour la modélisation pathologique et le criblage (Maury et al., 2015). Les auteurs sont ainsi parvenus à produire en 30 jours des populations constituées à 75% de motoneurons à partir de lignes de hES et d'IPS. A ce jour, la mise en place de protocoles de différenciation a été réalisée pour un grand nombre de type cellulaires à partir de hES ou d'IPSC (pour revue (Karagiannis et al., 2019) (Table2).

Organ or Tissue	Cell Type
Adipose tissue	Brown adipocytes, white adipocytes
Adrenal gland	Steroidogenic cells
Blood and immune cells	B cells*, dendritic cells*, eosinophils*, hematopoietic stem/progenitor cells, Langerhans cells*, mast cells*, monocytes*, macrophages*, natural killer cells*, neutrophils*, platelets*, red blood cells*, T cells*
Gastrointestinal tract	Colon, enterocytes, small intestine, stomach
Gonad	Oocytes, primordial germ cells, spermatozoan
Heart	Atrial and ventricular cardiomyocytes*, cardiac progenitor cells, pacemaker (nodal) cells
Kidney	Nephron progenitor cells, nephron structure, podocytes, ureteric bud progenitor cells, renal tubular cells
Liver	Cholangiocytes, hepatocyte-like cells*, liver progenitor cells
Lung	Type 1 and 2 alveolar cells*, basal cells, ciliated cells, club cells, goblet cells, neuroendocrine cells
Mesenchyme, bone, and cartilage	Bone tissue, chondroblasts, chondrocytes*, mesenchymal stem cells*, osteoblasts*, osteoclasts*, osteocytes*
Neuronal and sensory organ	Adenohypophysis tissue, astrocytes*, cerebral cortex organoids, cornea cells*, dopaminergic neurons*, glutamateric neurons*, hippocampal neurons*, hypothalamus tissue, inner ear hair cell, motor neurons*, neural stem/progenitor cells*, neural crest cells*, ocular cells*, oligodendrocytes*, Purkinje cells*, retinal cells*, Schwann cells*, serotonergic neurons*
Pancreas	Acinar cells, ductal cells, insulin-producing cell, β cells*, pancreatic progenitor cells
Skeletal muscle	Satellite cells, skeletal muscle cells*, skeletal muscle progenitor cells
Skin	Keratinocytes, melanocytes
Thyroid	Thyroid follicular cells, thyroid progenitor cells
Vasculature	Endothelial cells*, vascular smooth muscle cells

Table 2. Résumé des types cellulaires pouvant être différenciés à partir de cellules souche spluripotentes humaines (Karagiannis et al., 2019). * Cellules pouvant être utilisées pour des applications telles que la thérapie cellulaire, la modélisation pathologique, le criblage et et la toxicologie prédictive.

Il est à noter qu’une phase de différenciation en corps embryoïdes est encore souvent requise dans la plupart de ces protocoles, indiquant l’importance de cette étape dans laquelle ont lieu des interactions cellulaires qui assurent l’engagement de mécanismes clés pour la différenciation. Ces dernières années, les approches en 3D se sont largement développées afin de modéliser les mécanismes qui contrôlent l’organogénèse. Une étude récente a utilisé un modèle de corps embryoïdes pour mettre en évidence la balance chronologique d’exposition à différentes morphogènes nécessaires à la spécification des motoneurones le long de l’axe antero-postérieur et conduisant à la genèse séquentielle des motoneurones crâniens et spinaux (Mouilleau et al., 2021). Parallèlement, des protocoles de différenciation en 3D ont évolué vers des modèles d’organoïdes pour modéliser le développement de l’intestin (Sato et al., 2009), de la rétine (Eiraku et al., 2011) ou le cerveau (Lancaster et al., 2013). Cette approche s’est rapidement étendue à de nombreux autres organes et dans lesquels il a été possible d’étudier des processus biologiques difficiles à étudier en 2D. Ainsi Marton et al ont généré des organoïdes cérébraux contenant des neurones, des astrocytes et oligodendrocytes, dans lesquels il est possible d’observer la formation d’une myéline compacte (Marton et al., 2019).

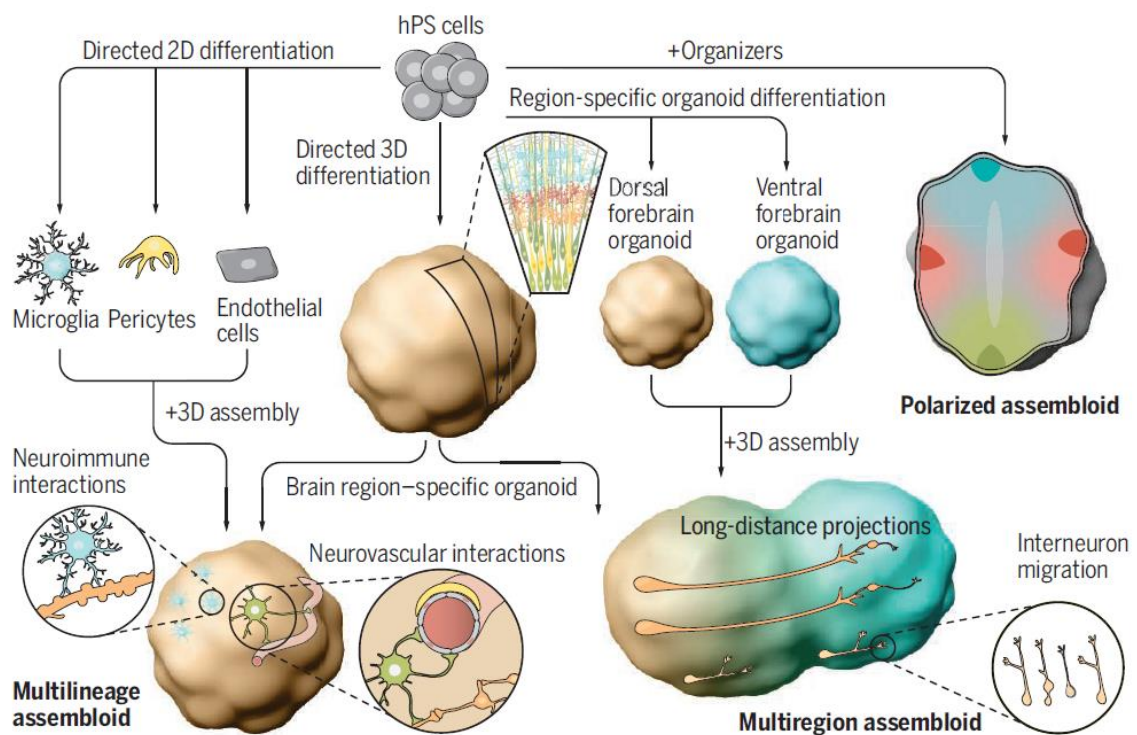


Figure 5. Les organoïdes spécifiques de la région du cerveau sont générés à partir de cellules souches pluripotentes humaines et peuvent être assemblés avec d’autres types de cellules (assembloïdes multilignées), avec d’autres organoïdes (assembloïdes multirégionaux), ou en présence de morphogènes (assembloïdes polarisés). Les organoïdes et les assembloïdes cérébraux peuvent être utilisés pour modéliser des interactions cellule-cellule complexes et la formation de circuits neuronaux dans le système nerveux humain (S. P. Pasca, 2019).

Pour étudier des interactions fonctionnelles entre des types cellulaires dérivés de zones développementale différentes, Birey et al ont complexifié le système en associant des organoïdes de différentes régions du cerveau et ont ainsi montré que les deux sphéroïdes interagissent pour assembler des microcircuits humains fonctionnels en trois dimensions (Birey et al., 2017) (Figure5). Grâce à ces « assemloïdes », la même équipe modélise en 2020 les interactions entre le système nerveux central, la moelle épinière et le muscle squelettique. Dans cette étude, les auteurs montrent que des circuits neuronaux peuvent être facilement manipulés pour étudier contrôle cortical de la contraction musculaire in vitro (Andersen et al., 2020).

Ainsi, les protocoles de différenciation en 2D et 3D donnent accès à une large gamme de types cellulaires qui expliquent l'utilisation des CSPh pour l'étude de l'organogénèse mais aussi le développement d'approches de thérapie cellulaire, de toxicologie prédictive, de modélisation pathologique et de criblage de composés thérapeutiques. Parmi ces différentes applications, je me focaliserai sur l'introduction des problématiques liées à la modélisation pathologique et au criblage pharmacologique, deux thématiques abordées dans mes travaux de recherche.

Modélisation Pathologique

La première étude de modélisation pathologique réalisée à partir de CSPh a été publiée par Urbach et al en 2004 et portait sur la maladie de Lesch-Nyhan (Urbach, Schuldiner, & Benvenisty, 2004). Dans cette étude, les auteurs avaient induit la perte d'expression du gène *HPRT1* en introduisant une cassette de résistance à l'Hygromycine dans la séquence codante du gène par recombinaison homologue dans une lignée de hES. Grâce à cet outil, les auteurs démontraient pour la première fois que l'accumulation d'acide urique observée chez les patients atteints de cette maladie était retrouvée dans les cellules hES mutées en culture (Urbach et al., 2004). Dès lors, différents centres de fécondation in vitro associés à des laboratoires de diagnostic pré-implantatoire ont publié la dérivation de lignées de CSEh porteuses de mutations causales pour plusieurs maladies monogéniques telles que la Dystrophie Myotonique de type 1, la maladie de Huntington, la fibrose kystique (cystic Fibrosis) ou la maladie de l'X fragile (Eiges et al., 2007; Mateizel et al., 2006). A ces lignées de hES se sont ajoutées les lignées d'iPS dérivées à partir de cellules somatiques de patients porteurs de maladies monogéniques (Ebert et al., 2009; G. Lee et al., 2009). La liste des lignées de hES mutées étant restreinte aux maladies pour lesquelles un diagnostic pré-implantatoire est autorisé, l'arrivée des IPS a changé la donne dans le domaine de la modélisation pathologique. Pour réaliser de telles études, il est désormais possible de se procurer des fibroblastes de patients atteints de mutation disponibles dans des banques de cellules telles que l'ATCC ou CORRIEL. Alternativement, les chercheurs peuvent entrer en contact avec des cliniciens pour avoir accès à des cellules congelées ou envisager un prélèvement chez le patient. Il est à noter que des cellules non mutées contrôles idéalement issues de la famille du patient prélevé doivent être incluses et que des consentements écrits sont indispensables. Il est donc intéressant de s'adresser plutôt à des banques institutionnelles regroupant des modèles publiés qui assurent une diffusion des lignées et garantissent la réalisation des contrôles qualités requis (Avior, Sagi, & Benvenisty, 2016) (Table 3).

Initiative	CIRM	StemBANCC	HiPSCi
Location	USA	EU	UK
Type of diseases	Mostly polygenic	Monogenic and polygenic	Mostly monogenic
Number of patients	3,000	500	500
Lines per patient	3	1-3	1
Cell type	<ul style="list-style-type: none"> • Fibroblasts • Blood 	<ul style="list-style-type: none"> • Fibroblasts • Hair samples 	Fibroblasts
Derivation technique	Episomal plasmids	Sendai virus	Sendai virus
Pluripotency assay	Pluripotency markers	<ul style="list-style-type: none"> • PluriTest • Embryoid bodies 	<ul style="list-style-type: none"> • PluriTest • Directed differentiation
Further analyses	<ul style="list-style-type: none"> • SNP array • Episomal integration 	<ul style="list-style-type: none"> • DNA-seq • SNP array • Proteome 	<ul style="list-style-type: none"> • DNA-seq • RNA-seq • ChIP-seq • Methylome
Cell banking	Coriell	ECACC	ECACC

ChIP-seq, chromatin immunoprecipitation followed by sequencing; CIRM, California Institute for Regenerative Medicine; DNA-seq, DNA sequencing; ECACC, European Collection of Cell Cultures; HiPSCi, Human induced Pluripotent Stem Cells initiative; iPSCs, induced pluripotent stem cells; RNA-seq, RNA sequencing; SNP, single-nucleotide polymorphism; StemBANCC, Stem Cells for Biological Assays of Novel Drugs and Predictive Toxicology.

Table 3. Initiatives à grande échelle pour la dérivation de lignées d'iPS à partir de cellules de patients (Avior, 2006).

Grace aux IPS, des projets de modélisation pathologique incluant une cohorte de patients atteints d'un même syndrome mais avec des mutations différentes ont pu être menés par exemple pour disséquer les mécanismes pathogéniques responsables du spectre autistique et développer des thérapies ciblées (DeRosa et al., 2012). Enfin, lorsque l'accès aux échantillons de patients est compromis, il est maintenant possible d'avoir recours à la technologie CRISPR/Cas9 pour modifier le génome de lignées d'IPS sur plusieurs nucléotides ou bien de « phénocopier » certaines mutations décrites chez des patients par base-editing. Ce type d'approche permet de s'affranchir de l'obtention des prélèvements de patients porteurs de mutations ultra-rares ou atteints de maladies neurologiques chez lesquels le prélèvement d'échantillons est parfois difficile à envisager. Dans un contexte de modélisation pathologique, la technologie CRISPR/Cas9 offre de plus l'opportunité de générer des lignées isogéniques dans lesquelles la mutation a pu être corrigée permettant la comparaison de cellules mutées et contrôles présentant le même fond génétique.

L'expansion du nombre de lignées de CSpH disponibles pour la modélisation pathologique s'est accompagnée de celui des protocoles de différenciation guidée. De études de modélisation thérapeutiques existent maintenant pour un bon nombre de lignage cellulaires (pour revues (Avior et al., 2016; Bellin, Marchetto, Gage, & Mummery, 2012). Ces études ont contribué à mieux comprendre l'impact d'une mutation sur le type cellulaires d'intérêt et d'y trouver une stratégie thérapeutique adaptés. Par exemple, Marchetto et al ont démontré que des neurones dérivés d'IPS de patients atteints du syndrome de Rett présentait une diminution du nombre de synapses glutamatergiques (Marchetto et al., 2010). Quelques années plus tard, ce phénotype a pu être « corrigé » par un traitement à l'IGF1, utilisé dans les essais cliniques sur troubles neurodéveloppementaux (Vahdatpour, Dyer, & Tropea, 2016). Alternativement, ces protocoles ont également permis de révéler des atteintes dans des types cellulaires non suspectés jusqu'alors. C'est le cas de l'étude de Marteyn et al qui démontre pour la première une altération des motoneurones dans la Dystrophie myotonique de type 1 (Marteyn et al., 2011). Afin d'aller au-delà de mécanisme intrinsèques à un lignage cellulaire, Gribaudo et al ont complexifié le modèle d'étude en effectuant des co-cultures. A l'aide de dispositifs microfluidiques, les auteurs ont créé des réseaux neuronaux corticocorticaux dérivés d'IPS saines dans lesquelles ils ont pu démontrer la diffusion de l' α -Syn à la manière d'un prion mise en cause dans les

maladies de maladie d'Alzheimer et de la maladie de Parkinson (Gribaudo et al., 2019). Enfin, l'utilisation des organoïdes ont permis de modéliser des maladies neuro-développementales telles que les Lissencephalies Congenitales grâce à l'étude de la corticogénèse en trois dimensions. Dans le syndrome de Miller-Dieker, causé par la délétion des gènes LIS1 and YWHAE sur le Chr 17, le cortex des patients est lisse du fait d'un défaut de neuro-prolifération et de migration radiale. En utilisant des organoïdes cérébraux de 5 semaines, Lefremova et al observent que les boucles neuro-épithéliales qui se développent à la surface des organoïdes dérivés d'IPS de patients sont considérablement réduites en comparaisons à celle provenant de donneurs sains (Iefremova et al., 2017). De plus, les organoïdes issus d'IPS mutées sont plus petits que les témoins, ce qui suggère un défaut prolifératif sous-jacent qui peut être corrigé par la ré-expression des gènes LIS1 ou YWHAE (Figure 6).

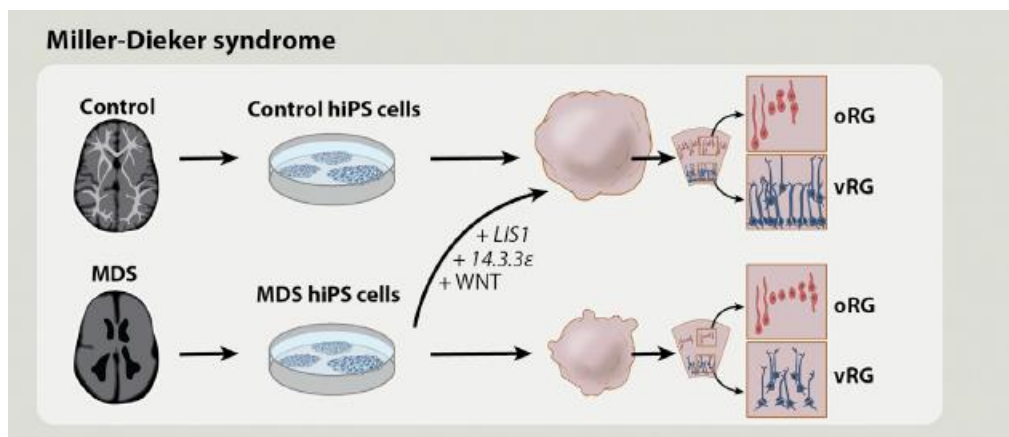


Figure 6. Figure 3. Phénotypes cellulaires et moléculaires révélés à l'aide des organoïdes cérébraux humains modélisant le syndrome de Miller-Dieker (SMD). Les organoïdes générés à partir de cellules IPS de patients SMD ont des taux de croissance réduits. Dans ces structures les vRG font moins de divisions symétriques et les oRG ont une mitose prolongée. Ces phénotypes sont en partie corrigés par la surexpression des gènes LIS1 ou YWHAE ou l'activation de la signalisation Wnt (vRG : ventricular zone-like layer with radial glia, oRG : outer radial glia) (Amin & Pasca, 2018).

De nombreuses études de modélisation pathologiques utilisant des CSPh ont été réalisées à ce jour et plusieurs limitations inhérentes aux cellules sont apparues. La première concerne l'immatunité des progénies dérivées à partir des CSPh. Bien que de nombreuses fonctions cellulaires peuvent être étudiées grâce aux CSPh, une absence de marqueurs tardifs associés à la maturation des cellules a été observée dans certains type cellulaire. Cette immaturité peut être attribuée aux protocoles de différenciation en 2D qui ne récapitulent pas l'ensemble des conditions nécessaire à la maturation des cellules. Pour parer à ce type de défaut, différentes stratégies ont été employées en attendant l'amélioration des protocoles. Jiwlawat et al ont par exemple eu recours à des supports de cultures contraignant l'organisation des myoblastes dérivés d'IPS et favorisant leur différenciation. Dans cette étude, les auteurs montrent que ce dispositif favorise la détection de l'accumulation des lysosomes dans les myoblastes de patients atteint de la maladie de Pompe (Jiwlawat et al., 2019). L'application de forces de tension a également montré son efficacité sur la maturation des cardiomyocytes (Dvir et al., 2011). D'autres équipes ont quant à elles induit une expression ectopique de la progerine dans des neurones pour modéliser des maladies neurodégénératives (J. D. Miller et al., 2013). Une autre limite correspond à l'amplification de répétitions associées à certaines maladies monogéniques au cours de l'amplification des lignées de PSCs. Dans des hES porteuses de la mutation causale de la Dystrophie

Myotonique de type 1 par exemple, l'analyse de la taille des expansions CGT dans le gène codant la DMPK dans des révèle des variations de taille au cours de la culture des cellules (De Temmerman et al., 2008; Seriola et al., 2011). Il n'a pas été déterminé si ces amplifications peuvent être attribuées aux cellules souches pluripotentes ou bien à la culture sur un long terme des cellules. Enfin, compte tenu des mutations pouvant être accumulées dans les lignées au cours de leur culture, il est important de comparer plusieurs lignées de CSpH porteuses de mutations à plusieurs lignées contrôles ce qui représente un impact en terme de temps et de coût des expériences.

Criblage thérapeutique

La détection de biomarqueurs d'une maladie dans un modèle de CSpH mutées peut être suivie d'un criblage de composés chimiques afin d'identifier des composés thérapeutiques. Pour ce faire, il faut toutefois disposer de protocoles de différenciation guidées générant de larges quantités de cellules différenciées dans le lignage d'intérêt. Le criblage peut cibler un biomarqueur moléculaire, phénotypique ou fonctionnel. L'une des difficultés est d'identifier une cible de criblage qui soit à la fois pertinente pour la maladie, miniaturisable et peu onéreuse. Différents cribles à bas/moyen et haut débit ont été réalisés sur des dérivés de hES et d'IPS (pour revue (Shi, Inoue, Wu, & Yamanaka, 2017)). En exemple, Burkhardt et al ont criblé une chimiothèque de 1757 molécules pour leur capacité à réduire l'expression d'agrégats intranucléaire de TDP-43 dans des motoneurones dérivés d'IPS de patients présentant une forme sporadique d'ALS (Figure 7). Par cette approche, ils ont identifié 3 molécules possédant une autorisation de mise sur le marché, capables de réduire le nombre d'agrégats intranucléaires dans des motoneurones (Burkhardt et al., 2013).

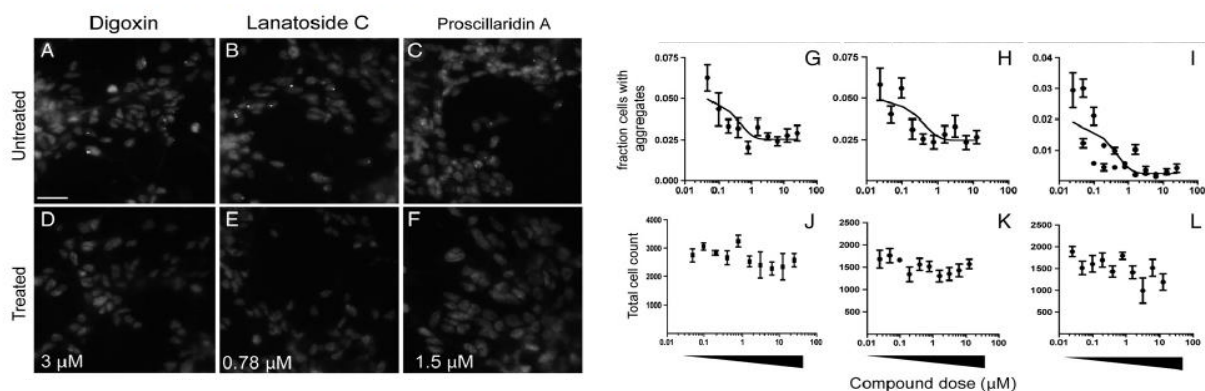


Figure 7. Neurones corticaux de patients atteints de formes sporadique de SLA (Sclérose Latérale Amyotrophique) traités avec des glycosides cardiaques. (A - C) Analyse de l'expression de TDP-43 dans les neurones corticaux sALS non traités (A-C), ou traités avec de la digoxine, du Lanatoside C et de la Proscillaridin pendant 48 (D - F). Les courbes de dose-réponse pour les trois composés montrent une réduction du pourcentage de cellules contenant des agrégats de TDP-43 dépendante de la dose des composés (E - F), le nombre de cellules ne diminue pas avec l'augmentation de la dose de traitement indiquant que les composés ne sont pas toxiques (G - I) (Burkhardt et al., 2013).

En plus des hits identifiés, ce type d'étude apporte une preuve de concept concernant l'utilisation des modèles CSpH pour le criblage via l'existence de ressources cellulaires associées à des « read-out » compatibles avec le haut débit. La publication de tels modèles tend à développer des collaborations avec des compagnies pharmaceutiques qui souhaitent réduire le temps de développement d'un criblage. De telles collaborations sont intéressantes si l'on tient compte du taux de succès des criblages estimé entre 0.12 et 5% et de la taille des banques de composés criblés par les laboratoires académiques (Table 4). Alternativement, les laboratoires se tournent de plus en plus vers des chimiothèques thématiques ou des chimiothèques de composés repositionnables avec lesquels ils pourront plus facilement entreprendre un essai clinique.

Disease	Cell type derived from iPSCs	Readout	Number of compounds screened	Hit rate (%)
Familial dysautonomia	Patient neural crest cells	<i>IKBKAP</i> expression	6,912	0.6
Alzheimer disease	Cortical neurons	Cell death	~350	~5.4
Motor neuron disease	Neural precursor cells for the hit validation	Neurite length	11,819	0.3
Amyotrophic lateral sclerosis	Patient motor neurons	TDP43 aggregates	1,757	2.2
Fragile X syndrome	Patient neural progenitor cells	<i>FMR1</i> expression	50,000	4.2
	Patient neural stem cells	<i>FMR1</i> expression	~5,000	0.12
	Neural progenitor cells	<i>FMR1</i> expression	1,134	0.17

Table 4. Criblage de molécules à large échelle ayant utilisé des dérivés de cellules IPS (Shi et al., 2017).

Essais cliniques thérapeutiques

Plusieurs approches de modélisation thérapeutique à partir de CSpH ont abouti à l'identification de composés dont le potentiel thérapeutique a été testé dans un essai clinique. C'est le cas par exemple du RG7800 identifié par la société Roche par criblage à haut débit visant à identifier des modificateurs de l'épissage de *SMN2* pour le traitement de l'Amyotrophie Spinale ou *SMA* (*Spinal Muscular Atrophy*) (Naryshkin et al., 2014). Alternativement, des études de modélisation pathologique ont mis en évidence des défauts fonctionnels pour lesquels une solution pharmacologique existait. Ainsi, Wainger et al ainsi que Kiskinis et al ont montré une altération du fonctionnement des canaux potassiques dans des motoneurones dérivés d'IPS de patient ALS porteurs d'une mutation dans le gène *SOD1*. En utilisant l'ézogabine, un antiépileptique agoniste des canaux potassiques Kv7.2/3, les auteurs ont réussi à réduire l'excitabilité et la survie des motoneurones mutés (Kiskinis et al., 2014; Wainger et al., 2021). Ces travaux ont abouti à l'évaluation du potentiel thérapeutique de cette molécule dans un essai clinique pour les patients ALS par la société GlaxoSmithKline (NCT# 02450552). Dans cet essai clinique randomisé portant sur 65 participants atteints de SLA, le traitement par l'ézogabine a réduit l'excitabilité des motoneurones corticaux et spinaux de manière dose-dépendante.

Contrôle qualité des PSCs

Comme nous avons pu le voir, le potentiel offert par les CSpH est vaste. Toutefois, il est très important de veiller au contrôle de la qualité de ces cellules afin de ne pas émettre des conclusions erronées. Plusieurs types d'anomalie ont été reportées pour les hES, les iPSC ou les deux types de CSPs.

D'un point de vue phénotypique, l'expression d'un ensemble de marqueurs de pluripotence doit être régulièrement contrôlé par FACS ou toute autre méthode permettant d'évaluer le degré de pureté de la population cellulaire. En routine, les marqueurs TRA-60, TRA-1-80, SSEA4 sont mesurés et doivent être exprimés à plus de 90%. Sur le plan fonctionnel, le potentiel de différenciation des lignées d'une lignée doit également être évalué. Il existe actuellement différents kits commerciaux permettant la différenciation guidée des PSCs vers les trois feuilletts embryonnaires et l'analyse de marqueurs tissulaires associés. Ces tests in vitro sont normalement complétés par un test de formation de tératome après la greffe des CSpH dans des souris immuno-déficientes. Enfin, un point majeur pour le contrôle de la qualité des lignées de CSpH concerne leur intégrité génomique. En effet, différentes anomalies karyotypiques tels que des variation du nombre de copies de gène (Laurent et al., 2011), des mutations ponctuelles ou des unidisomie parentales et des amplifications de regions chromosomiques ont été reportées dans des lignées d'hES et d'iPS (Bershteyn et al., 2014; Draper, Smith, et al., 2004). Ainsi, des expériences de G-banding ou de Comparative genomic hybridization (CGH)-array sont régulièrement réalisées pour détecter les Amplification du chromosome 20q11.21 , ainsi que les trisomie des chromosomes 17 and 12 qui apparaissent comme les anomalies chromosomiques récurrentes des CSPs (Bershteyn et al., 2014; Draper, Smith, et al., 2004; Lefort et al., 2008; Spits et al., 2008). Une étude réalisée en 2011 sur 1700 lignées de hES et d'iPS évalué à 12% le nombre de lignées porteuses d'anomalies génétiques (Taapken et al., 2011) (Table 5).

Results of G-banded chromosome analysis of human ESC and iPSC cultures by standard cytogenetic methods				
Cell line type	No. of cell lines karyotyped	No. of cultures karyotyped	No. of abnormal karyotypes	Percent abnormal karyotypes
ESC	40	1,163	150	12.90
iPSC	219	552	69	12.50

Analysis includes examination of chromosomes in a minimum of 20 cells per culture. In order to be included in this data set and throughout this report, abnormalities met the ISCN 2009 (ref. 18) definition of clonality.

Table 5. Anomalies caryotypiques recensées dans les cellules souches pluripotentes et les cellules souches embryonnaires humaines (Taapken et al., 2011).

Enfin, un paramètre important à contrôler mais peu fréquemment réalisé consiste à vérifier le statut de méthylation des locus génétiques soumis à l'imprinting parental. En effet, même s'il a été montré que les IPS conservent une mémoire épigénétiques lors de la reprogrammation des fibroblastes, la méthylation de certaines régions soumises à l'imprinting parental n'est pas correctement conservée lors de la culture à long terme de hES ou lors de la reprogrammation des cellules somatiques en IPS. Stadtfeld et al proposent d'analyser le statu d'expression des gènes du locus *DLK1-DIO3*, soumis à l'imprinting parental, pour évaluer la qualité des clones d'iPS générés après reprogrammation. Chez la souris, ils ont montrent que le défaut d'imprinting affectant ce locus était corrélé à des lignées d'iPS formant des tératomes mais qui contribuaient à des chimères de bas grade lors de leur injection dans des blastocystes tétraploïdes (L. Liu et al., 2010; Stadtfeld et al., 2010).

Synthèse des travaux de recherche

Identification de régulateurs des défauts d'épissage associés à la Dystrophie Myotonique de type 1

Contexte

Mon activité de recherche sur les CSpH a débuté à I-Stem, l'institut des cellules souches pour le traitement et l'étude des maladies monogéniques lors de sa création en Janvier 2005. I-Stem est un centre de recherche et développement, dédié à l'élaboration de traitements fondés sur les potentiels offerts par les cellules souches pluripotentes et applicables aux maladies rares d'origine génétique. Ce laboratoire, créé par Marc Peschanski, est composé de deux entités administratives distinctes de taille à peu près égale, l'une associée aux établissements publics (Inserm/UEVE 861, dont la directrice scientifique est Cécile Martinat) et l'autre liée directement à l'AFM-Téléthon (CECS, le Centre d'Etude des Cellules Souches, dont le directeur scientifique est Marc Peschanski). Le laboratoire s'appuie sur le potentiel des cellules souches pluripotentes pour répondre à deux missions : d'une part, l'étude des mécanismes pathogéniques associés à différentes maladies monogéniques rares pour lesquelles il n'existe pas de traitement; d'autre part, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour ces maladies via le criblage de composés chimiques ou la thérapie cellulaire. Initialement, seules deux maladies monogéniques étaient étudiées, une maladie neuro-musculaire, la Dystrophie Myotonique de type 1 et une maladie neuro-dégénérative, la maladie de Huntington. Depuis, le nombre de maladies étudiées s'est rapidement accru et concerne aujourd'hui une dizaine de maladies dont la maladie de Lesch-Nyhan, la myopathie de Duchenne, la Neurofibromatose, le syndrome de Wolfram ou l'Amyotrophie Spinale.

A l'issue de mon stage post-doctoral dans le Service de Génomique Fonctionnelle du Commissariat à l'énergie atomique d'Evry, j'ai rejoint I-Stem pour y développer un projet de génomique fonctionnelle dédiée à la dystrophie Myotonique de type 1 sous la direction de Marc Peschanski. Ce projet devait se développer en parallèle d'un projet de modélisation pathologique par l'équipe du Dr Gèneviève Piétu en utilisant des lignées de cellules souches embryonnaires humaines porteuses de la mutation causale de la DM1 (Mateizel et al., 2006). Ces projets démarraient juste après la révision de la loi de la bioéthique et à l'époque I-Stem était le seul laboratoire en France à travailler sur les cellules souches embryonnaires. Les défis proposés par ce stage post-doctoral étaient multiples : maîtriser cet outil cellulaire novateur, travailler sur une maladie dépourvue de traitement curatif et identifier des mécanismes thérapeutiques par une approche de génomique fonctionnelle, une thématique qui m'avait passionnée lors de mon précédent stage post-doctoral. Avant de décrire les travaux auxquels j'ai participé à cette période, je vais présenter l'état des connaissances sur la Dystrophie Myotonique de type 1 afin de mieux comprendre l'intérêt des outils et projets que nous avons développés.

La Dystrophie Myotonique de type 1

Présentation de la maladie

La dystrophie myotonique de type 1 (DM1), également connue sous le nom de maladie de Steinert, est la maladie neuromusculaire la plus courante chez l'adulte (environ 1/8 000). Les symptômes de cette maladie multisystémique comprennent une faiblesse musculaire, une myotonie, de multiples troubles endocriniens, une insuffisance respiratoire, des problèmes cardiaques (conduction,

arrythmie...), des problèmes oculaires, du tractus gastro-intestinal et du cerveau. Des dysfonctionnements cognitifs associés à d'autres symptômes psychomoteurs rendent la vie familiale et professionnelle difficile. Le diagnostic est généralement effectué par des neurologues et consiste en la réalisation d'un électromyogramme complété en cas de suspicion par un test sanguin pour mesurer les répétitions de CTG. Il existe quatre formes de DM1, classées en fonction de la gravité, du début d'apparition et de l'évolution des symptômes ("Les Amis du Portail d'Information Steinert" - "APIMS", <https://www.maladiedesteinert.info/d%C3%A9finition-de-la-dm1/>) :

- **La forme asymptomatique.** Les personnes ne s'aperçoivent pas des symptômes qui sont extrêmement légers et tardifs (par exemple calvitie ou cataracte), signes qui ne sont pas ressentis comme liés à une pathologie. Ces formes ne sont donc généralement diagnostiquées que lors de la recherche des origines génétiques d'un parent plus gravement atteint.

- **La forme adulte commune.** Les symptômes apparaissent de façon légère vers 20-25 ans, mais le diagnostic est généralement posé vers 40 ans quand les symptômes s'aggravent (notamment la gêne dans la marche) ; ils évoluent plus ou moins rapidement suivant les individus ; chez les femmes, la grossesse peut être un facteur aggravant, voire déclenchant de l'apparition des premiers symptômes.

- **La forme juvénile.** Ces formes touchent particulièrement les patients âgés de 10 à 20 ans et qui présentent une myotonie et une faiblesse des muscles de la face. Les premiers symptômes sont souvent neurologiques. Ils se traduisent par des interactions sociales réduites et des troubles psychologiques. Ce tableau clinique correspond à des formes entre 500 et 1000 répétitions avec une transmission paternelle favorisée.

- **La forme infantile.** Dans cette forme, on note certaines atteintes du système nerveux central, entraînant retard du langage (essentiellement en écriture et lecture) et de nombreuses difficultés scolaires par syndrome dysexécutif. Les enfants présentent des signes de fatigue, de lenteur, d'hypersomnie. Des signes autistiques apparaissent dans 1/3 des cas. En général, la myotonie et les problèmes musculaires arrivent plus tard. Des difficultés d'insertion professionnelle peuvent survenir.

- **La forme néonatale (dite aussi congénitale).** Transmise quasi-exclusivement par la mère, cette forme est très grave, avec une hypotonie (bébé « mou »), une détresse respiratoire à la naissance entraînant une mortalité néonatale élevée (plus de 15%) et une difficulté à téter. Cette forme s'accompagne d'atteintes du système nerveux central (SNC), avec par la suite des signes plus ou moins importants de déficience mentale, un retard sévère d'acquisition du langage et des problèmes psychologiques. Des signes peuvent être détectés pendant la grossesse, comme un excès de liquide amniotique (hydramnios) ou des diminutions des mouvements du fœtus. Les risques d'accouchement prématuré ou difficile (présentation par le siège) sont particulièrement élevés. Les cas de survenue sont d'environ 10% en cas de première naissance, mais, pour des raisons non élucidées à ce jour, passent à 40% si une première naissance d'enfant atteint a déjà eu lieu. D'une génération à l'autre, il a été observé chez les patients DM1 un phénomène d'anticipation, c'est-à-dire la survenue d'une augmentation de la sévérité de la maladie d'une génération à l'autre associée à une diminution de l'âge de manifestation des symptômes.

	CONGENITAL	INFANTILE	JUVENILE	ADULT	LATE-ONSET
Age at onset (y=year)	<1 month	1 month-10 y	>10-20 y	>20-40 y	>40 y
CTG repeat size* (From >1000 to >50 CTG)					
Frequency of DM1 features (%)					
Lower education level	100	67	57.7	59.5	53.4
Facial Dysmorphisms	82.1	61.6	46.1	35.2	25.9
Respiratory insufficiency	66.1	50.3	36.3	32	31.9
Muscle weakness	49.3	42.1	39.1	45	33.8
Frequency of DM1 features (%)					
Diabetes	1.2	7.2	7.7	10.8	12.1
Obesity	35.1	41.7	40.8	46.2	51.5
Cardiac conduction defects	32.8	45.7	40.6	50.1	55.8
Cataracts	48.3	56.7	57	72.4	78.5
Frequency of DM1 features (%)					
Severa myotonia	36.6	37.9	44.3**	30.7	19.8
Dysphagia	60.8	56.9	49.2	51.7	51.6
GI symptoms	34.2	47.5	44.2	45.1	41.3
Somnolence	15.2	26.2	25.9	22.1	24.3

Figure 8. Caractéristiques cliniques des cohortes de patients français atteints de dystrophie myotonique de type 1 (DM1) (Tome & Gourdon, 2020).

Mutation et mécanismes moléculaires impliqués dans la pathogénèse de la DM1

La mutation causale de la DM1 a été identifiée en 1992. Elle consiste en l'expansion d'une répétition de trinuécléotides CTG dans la région 3' non codante du gène *DMPK* situé sur le chromosome 19 (Brook et al., 1992; Mahadevan et al., 2006). Dans la population non atteinte, ces répétitions varient de 5 à 30 et commencent à devenir pathogènes au delà de 50 répétitions (Brook et al., 1992). Ces répétitions de CTG sont instables : elles évoluent dans les tissus somatiques et favorisent la gravité et la progression de la maladie. Des études réalisées dans les myoblastes et cellules sanguine d'un même patient ont révélé que ces répétitions de CTG peuvent être moins importantes dans le sang en comparaison avec le muscle et la peau (Ashizawa, Dubel, & Harati, 1993; Ballester-Lopez et al., 2020). L'étude des répétitions CTG sur plusieurs générations d'une même famille a également montré une augmentation de leur taille, donnant une explication au phénomène d'anticipation observé pour dans cette maladie (Howeler, Busch, Geraedts, Niermeijer, & Staal, 1989). Un paramètre à prendre en compte dans ce phénomène d'anticipation est le sexe du parent qui transmet la mutation. Sans qu'on en comprenne la raison, les variations intergénérationnelles sont plus importantes lorsque la transmission est maternelle (Myring et al., 1992; Tsilfidis, MacKenzie, Mettler, Barcelo, & Korneluk, 1992). Il est à noter toutefois que des transmissions de grandes tailles d'expansions d'origine paternelle ont aussi été rapportées (Zeesman, Carson, & Whelan, 2002).

L'instabilité des expansions de CTG a pu être modélisé in vitro dans des lignées de hES DM1 après de longues périodes d'amplification (De Temmerman et al., 2008). Cette instabilité est limitée dans les progénies des hES DM1 non affectée par la DM1 où le niveau d'expression des protéines MSH est réduite (Seriola et al., 2011), établissant un lien entre le contrôle de l'instabilité des CTG et les composants du *Mismatch Repair Pathway* (MMR), MSH2 et MSH3. Le knock-down des gènes *Msh2* et *Msh3* dans des modèles de souris transgéniques DM1 résulte en l'arrêt de l'instabilité des répétitions somatiques et ainsi réduit leur expansion transgénérationnelle (Foiry et al., 2006; Savouret et al., 2003). Chez l'Homme, la répression de MSH2 par ARN interférence dans des IPS DM1 humaines empêche l'expansion des répétitions de CTG (Du, Campau, Soragni, Jespersen, & Gottesfeld, 2013), confirmant l'implication de cette famille de protéines dans le contrôle de la taille des expansions de répétitions CTG.

La présence de ces répétitions CTG modifie l'environnement génomique du locus *DMWD-DMPK-SIX5* en 19q13.3 et affecte en conséquence l'expression du gène *DMPK* mais aussi celle des deux gènes adjacents : *DMWD* et *SIX5*. Brook et al ont démontré l'expression des allèles sains et mutés de la *DMPK* dans les cellules DM1. Cependant, l'analyse de l'expression de ce gène dans des myoblastes de patients révèle une diminution d'expression des transcrits et de la protéine *DMPK* (Fu et al., 1993). Une analyse poussée montre que le transcrit porteur de l'expansion de CTG est retenu dans le noyau sous la forme d'agrégat, expliquant l'haploinsuffisance en *DMPK* (Taneja, McCurrach, Schalling, Housman, & Singer, 1995) Le gène *DMPK* code une protéine sérine threonine kinase dont le rôle est encore mal connu. Pour explorer les conséquences de sa répression, des expériences d'inactivation génique ont été réalisées chez la souris. Les souris *Dmpk +/-* développent un défaut de conduction cardiaque étonnamment similaire à celui observé chez les patients DM1 (Berul et al., 1999). Dans le ventricule des souris *Dmpk -/-*, une altération de l'absorption de calcium dans le réticulum sarcoplasmique conduit à des troubles de la conduction cardiaque (Kaliman et al., 2005) tandis qu'une myopathie progressive apparaît tardivement dans les muscles squelettiques réduisant la force musculaire (Reddy et al., 1996). Il est à noter que les défauts cardiaques et musculaires associés à l'inactivation génique de la *Dmpk* n'ont pas été retrouvés par d'autres équipes (Carrell et al., 2016). Ces résultats suggèrent à la fois une implication de l'haplo-insuffisance du gène *DMPK* dans les symptômes cardiaques et musculaires de la DM1 mais aussi l'existence d'autres mécanismes pathogéniques à l'origine des symptômes de la maladie, non détectés dans ces modèles murins de perte de fonction.

Des expériences visant à explorer l'effet de la mutation DM1 sur les gènes *DMWD* et *SIX5* ont également révélé une réduction de leur expression. Il a été démontré que la présence des répétitions de CTG induit une hyper-méthylation des séquences proximales du gène *Six5* (Lopez Castel et al., 2011; Steinbach, Glaser, Vogel, Wolf, & Schwemmler, 1998). En complément, Tapscott et al. rapportent la perte d'un site hypersensible à la DNase I immédiatement en amont du gène *Six5* en présence de l'expansion de CTG (Otten & Tapscott, 1995). Ces observations suggèrent que l'expansion de CTG entraîne la formation locale d'hétérochromatine et la baisse de la transcription de *Six5* sur l'allèle porteur de l'expansion de répétition. À l'appui de cette hypothèse, il a été démontré que les taux d'ARN et de protéines *SIX5* diminuent de deux à quatre fois dans le muscle chez les patients DM1 (Klesert, Otten, Bird, & Tapscott, 1997; Thornton, Wymer, Simmons, McClain, & Moxley, 1997). La protéine *SIX5* appartient à une famille de protéines homéobox impliquées dans la régulation de la différenciation des cellules musculaires et de l'homéostasie de l'ion sodium, toutes deux perturbées dans la DM1. La formation de cataractes chez des souris avec une ou deux copies défectueuses du gène *SIX5* suggère

que les cataractes présentes dans la DM1 humaine pourraient résulter d'une diminution de l'expression de ce gène (Klesert et al., 1997) (Figure 9).

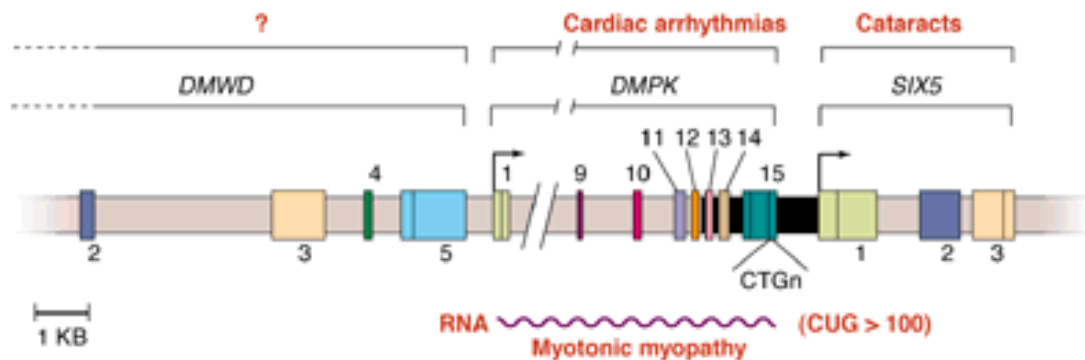


Figure 9. Représentation schématique de l'impact de la présence de triplet de nucléotides CTG dans la région 3' non traduite de l'exon terminal du gène *DMPK* chez les patients DM1. L'expression d'autres gènes du locus DM1 tels que *DMWD* et *SIX5*, est affectée par la présence des répétitions de CTG et contribue aux diverses caractéristiques pathologiques de la DM1.

Une réduction de l'expression du gène *DMWD* a également été rapportée en présence de la mutation DM1. Cependant, l'analyse précise des transcrits indique que le niveau d'expression nucléaire n'est pas impacté par la mutation et exclut une hypothèse transcriptionnelle. Celle-ci pourrait plutôt être expliquée par une transcription du gène *DMWD* qui se poursuivrait au-delà d'une séquence polyA faible et se propagerait jusqu'aux répétitions de CTG, emprisonnant le transcrit dans les agrégats intranucléaires (Alwazzan, Newman, Hamshere, & Brook, 1999). Les fonctions cellulaires du gène *DMWD* sont mal connues. Une étude récente montre que les souris *dmwd +/-* présentent des myofibres qui apparaissent considérablement réduites en coupe transversale suggérant que ce gène pourrait également participer aux atteintes musculaires de la DM1 (Yin et al., 2020).

Parallèle à l'hypothèse mécanistique focalisée sur une altération de l'expression des gènes du locus *DMDW-DMPK-SIX5*, plusieurs équipes se sont penchées sur l'impact de l'expression du transcrit mutant dans la cellule. Par des expériences de bandshift, Timchenko et al. ont identifié des protéines capables d'interagir in vitro avec ces répétitions (L. T. Timchenko, Timchenko, Caskey, & Roberts, 1996). Ces protéines, baptisées CUG-BP1 et 2 (pour *CUG-Binding Proteins 1 and 2*), sont surexprimées dans des cellules et biopsies de patients DM1 ainsi que dans des modèles de souris transgéniques exprimant des répétitions de CTG (Kuyumcu-Martinez, Wang, & Cooper, 2007 ; Savkur, Philips, & Cooper, 2001 ; N. A. Timchenko et al., 2001 ; G. S. Wang, Kearney, De Biasi, Taffet, & Cooper, 2007). La modélisation de la surexpression de CUG-BP1 dans le muscle squelettique chez la souris se traduit par une létalité embryonnaire et une myopathie ressemblant à la forme congénitale la plus sévère de DM1 (Ho, Bundman, Armstrong, & Cooper, 2005 ; N. A. Timchenko et al., 2004). L'expression anormale de ces protéines est expliquée par une modification de leur phosphorylation en présence de la mutation DM1, qui conduit à leur stabilisation et à la modification de leur activité (N. A. Timchenko et al., 2001). En conséquence, CUGBP1 impacte la biogénèse des transcrits dans des cellules DM1 à plusieurs niveaux (Wei, Jones, Timchenko, & Timchenko, 2013). Dans le noyau, la stabilisation de CUG-BP1 modifie l'épissage de l'exon 5 de la cTNT, associée à une isoforme embryonnaire du transcrit, retrouvée dans des cellules cardiaques et musculaires de patients DM1. Le fait que cet exon soit nouvellement

détecté lors de l'expression ectopique des répétitions de CTG dans des cellules saines a finalement permis de faire le lien entre la présence de la mutation et un défaut de l'épissage des transcrits dans la DM1 (Philips, Timchenko, & Cooper, 1998). Le rôle de CUG-BP1 sur l'épissage est aussi illustré par l'inclusion anormale de l'exon 11 du récepteur à l'insuline (*INSR*), variant associé à une isoforme embryonnaire (Savkur et al., 2001). Ce variant transcriptionnel, exprimée par les cellules du muscle squelettique de patients DM1, est associé à une résistance à l'insuline observée dans la DM1 (Savkur et al., 2001). L'accumulation de l'isoforme phosphorylée de CUG-BP1 se traduit également par la stabilisation de transcrits codant des protéines telles que p21 et MEF2A qui inhibent la myogénèse de souris transgéniques *CUGBP1* (N. A. Timchenko et al., 2004). Cette phosphorylation inadéquate de CUG-BP1 est attribuée à la Protéine Kinase C (Kuyumcu-Martinez et al., 2007) dont l'inhibition par des agents chimiques corrige la survie de souris transgéniques exprimant 960 répétition de CTG de façon inducible pour modéliser la DM1 (G. S. Wang et al., 2009). Parallèlement à ce mécanisme, une surexpression de la GSK3 β a été observée dans des modèles murins de la DM1 ainsi que chez des patients (Jones et al., 2012). L'activité accrue de la GSK3 β induit la dégradation de la CDK4 qui assure normalement la phosphorylation de CUG-BP1 en SER³⁰² (Huichalaf et al., 2010; Jones et al., 2012) (Figure 10).

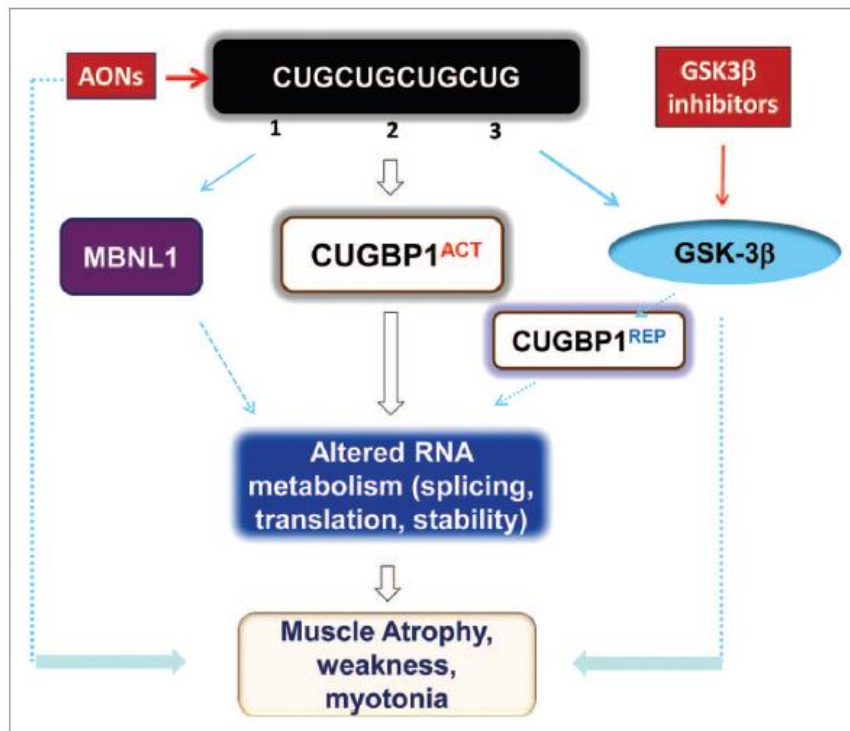


Figure 10. Événements toxiques causés par les répétitions de trinucleotides mutants dans les cellules DM1. Les répétitions provoquent trois événements moléculaires toxiques : (1) la séquestration de MBNL1, (2) des niveaux plus élevés de CUG-BP1, conduisant à une élévation de la forme active de CUG-BP1 (CUG-BP1 Act), et (3) l'élévation du niveau de la GSK3 β activée, qui réduit l'expression de la cycline D3 et convertit une portion de CUG-BP1 Act en CUG-BP1 Répressive. La réduction de l'expression de MBNL1 et l'augmentation de la forme CUG-BP1 Act conduisent à une dérégulation de l'épissage, de la stabilité et de la traduction des ARN messagers. L'augmentation de la forme CUG-BP1 REP réprime quant à elle la traduction des ARNm dans les granules de stress. Ces différents changements moléculaires entraînent une myotonie, une faiblesse et une atrophie musculaire. L'administration

d'inhibiteurs de la GSK3 β réduit l'histopathologie, la faiblesse et la myotonie du muscle DM1, tout comme la dégradation par un oligonucléotide ciblant le transcrit *DMPK* mutant (Wei et al., 2013).

Dans les cellules DM1, la dégradation de CDK4 entraîne une hypophosphorylation de CUG-BP1 en SER³⁰² qui se lie alors préférentiellement au facteur d'inhibition de la traduction EIF2a pour réprimer la traduction de transcrits dans les granules de stress (Huichalaf et al., 2010). Dans un modèle de souris Jones et al ont démontré qu'un traitement par deux inhibiteurs de la GSK3 β , le lithium et la 4-benzyl-2-méthyl-1,2,4-thiadiazolidine-3,5-dione (TDZD-8) améliorent l'histologie musculaire, augmentent la force musculaire et réduisent la myotonie des souris (Jones et al., 2012).

En étudiant les protéines capables de se lier à ces répétitions de CUG, Miller et al. ont identifié une autre famille de facteurs d'épissage impliqués dans le développement : les protéines de la famille MBNL, fortement exprimées dans le sang, l'œil, le cerveau, les cellules cardiaques et le muscle squelettique (J. W. Miller et al., 2000). Chez la souris, l'analyse de l'expression des gènes *Mbnl1*, *Mbnl2* et *Mbnl3* au cours du développement montre qu'ils sont co-exprimés avec la *Dmpk* notamment au cours du développement du système nerveux, et des différents muscles tels que le diaphragme fortement impacté dans la DM1 (Kanadia et al., 2006). Par des expériences d'immunofluorescence, Fardai et al ont montré qu'à la différence des protéines CUG-BP, les facteurs d'épissage MBNL1 et MBNL2 sont captées par les répétitions de CUG du transcrit portant l'allèle *DMPK* mutant dans les agrégats intranucléaires (Fardaei, Larkin, Brook, & Hamshere, 2001; Fardaei et al., 2002; Mankodi et al., 2002).

Cette interaction entre les protéines MBNL et les transcrits *DMPK* mutants serait à l'origine de la formation des agrégats intranucléaires et auraient pour conséquence d'une part le blocage de l'export du transcrit mutant en vue de sa traduction et d'autre part la déplétion intracellulaire en MBNL1. Cette hypothèse a été validée par des expériences d'ARN interférence dirigées contre MBNL1 dans des myoblastes de patients montrant que l'extinction de cette seule protéine suffit à faire disparaître les agrégats de transcrit DM1 muté (Dansithong, Paul, Comai, & Reddy, 2005). La diminution de la fraction libre de protéines MBNLs dans la cellule entraîne à son tour une modification de la biogénèse des transcrits dans le muscle, le cœur mais aussi le cerveau. Parmi ceux-ci on retrouve les variants *INSR*+ exon 11 et *SERCA1* + exon 22 mais aussi d'autres défauts d'épissages pour lesquels une relation causale avec des symptômes de la maladie ont pu être établi (Dansithong et al., 2005; Hino et al., 2007). Dans le cœur, MBNL1 participe entre autres aux défauts d'épissages affectant les transcrits *TNNT* sur l'exon 5 et *SCN5A* sur l'exon 6a, ce dernier étant relié aux défauts de conduction cardiaque chez les patients DM1 (Freyermuth et al., 2016; Ho et al., 2004). Enfin, dans le cerveau, l'implication de MBNL1 dans des défauts d'épissages observés chez les patients DM1 concerne par exemple les transcrits codant la protéine Tau (MAPT) dont le rôle dans des maladies neurodégénératives a largement été décrit (Leroy et al., 2006).

Lors de ces études mécanistiques, un rôle antagoniste des protéines MBNLs et CUG-BPs est souvent mis en évidence (Dansithong et al., 2005; Ho et al., 2004). Compte tenu des altérations fonctionnelles qui touchent chacune de ces deux protéines de fixation à l'ARN, on comprend le maintien de transcrits foetaux dans les tissus des patients DM1. L'ampleur de ces défauts a pu être évalué par des techniques de transcriptomes différentiels réalisés à partir de modèles animaux de la DM1. Ces études montrent des altérations touchant plusieurs centaines de transcrits dans le muscle squelettique mais aussi dans le cerveau (Goodwin et al., 2015). Dans le muscle, la contribution du facteur d'épissage MBNL1 dans ces altérations a été évaluée en comparant les transcriptomes de modèles de souris DM1 à celle de

souris *Mbn1* *-/-* et révèle une communauté de défaut d'épissage de l'ordre de 80% (Du et al., 2013; Suenaga et al., 2012). L'impact fonctionnel de certains d'entre eux a pu être évalué *in vivo*. C'est notamment le cas de l'exon 7 du canal chlore à l'origine de la myotonie observée chez les patients DM1 (Charlet et al., 2002). Dans un modèle de souris transgéniques exprimant 250 répétitions de CTG, Mankodi et al observent des atteintes musculaires qui reproduisent la myotonie et montrent que celle-ci est causée par l'inclusion anormale de l'exon 7 du canal chlore (Mankodi et al., 2002). Alternativement, les défauts d'épissages concernant l'exon 11 du transcrit *BIN1* ainsi que l'exon 78 du transcrit *DMD*, tous deux retrouvés chez les patients DM1, sont capables d'altérer la mobilité et l'architecture musculaire lors de leur expression ectopique dans des modèles animaux (Fugier et al., 2011; Rau et al., 2015) tandis que le défaut d'épissage de l'exon 29 du transcrit *CACN1S* altère la conductance des fibres musculaires chez la souris (Tang et al., 2012).

Enfin, une autre conséquence de l'expression du transcrit *DMPK* mutant comportant les répétitions de CUG est l'expression de protéines homopolymères de polyglutamine, de polyalanine et de polysérine toxiques issues de la traduction des expansions CTG du transcrit mutant par un mécanisme indépendant de l'ATG nommé *RAN* (repeat associated non-ATG) *translation*. Ces homopolymères sont détectés dans le modèle de souris transgéniques DMSXL exprimant les répétitions de CTG dans le contexte du locus de la *DMPK* humaine (Huguet et al., 2012) ainsi que dans des échantillons de cœur de patients DM1 (Zu et al., 2011). Des expériences visant à explorer la toxicité de ces polymères dans le contexte de la DM1 permettront de mieux définir le rôle de la *RAN* translation dans la pathogénèse de la DM1.

Ainsi, la présence de la mutation causale de la DM1 modifie non seulement l'expression des gènes du locus *DMWD-DMPK-SIX6* mais aussi la biogénèse des ARN messages interagissant avec les deux familles de protéines de fixation à l'ARN : CUG-BP et MBNL. Cependant, il a été démontré que ces stigmates moléculaires et fonctionnels de la maladie étaient réversibles lors de la surexpression de MBNL1 ou la répression de CUG-BP1 dans des modèle murins de la DM1 ouvrant la porte au développement d'approches thérapeutiques (Kanadia et al., 2006; Mahadevan et al., 2006).

Approches thérapeutiques

La DM1 est une maladie qui se caractérise par une forte variabilité clinique et génétique, ce qui entraîne certaines difficultés dans le diagnostic des patients et la mise en place d'essai cliniques (Tome & Gourdon, 2020). Il n'existe actuellement malheureusement qu'une prise en charge symptomatique des patients. La myotonie et la somnolence sont atténuées grâce à la prescription de Mexilétine et Modalafil. Les troubles digestifs sont traités par la métoclopramide, les douleurs musculaires sont habituellement soulagées par la prise d'anti-inflammatoires non stéroïdiens tandis que la pose d'un pacemaker est préconisée pour les troubles de la conduction cardiaque. Toutefois, les développements thérapeutiques sont nombreux et ciblent chacun des mécanismes pathogéniques décrits pour cette maladie (Figure 11).

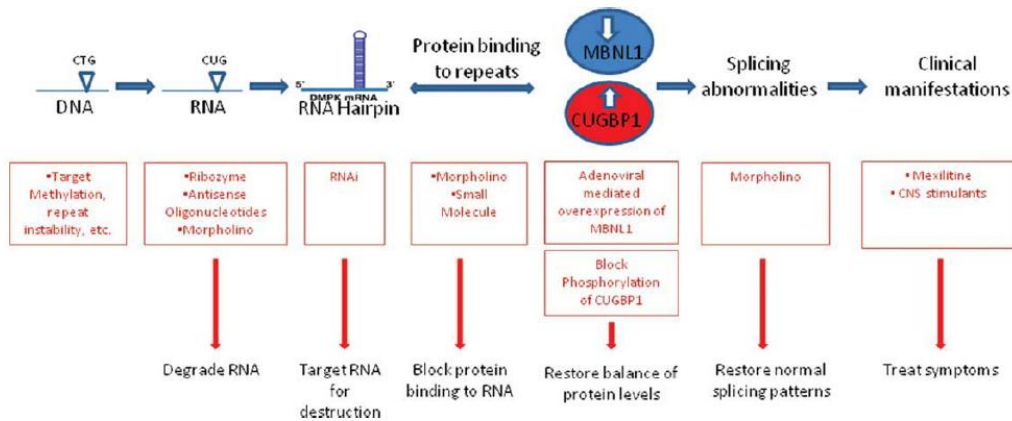


Figure 11 : Schéma récapitulatif des différentes stratégies thérapeutiques développées pour le traitement de la DM1 (Foff & Mahadevan, 2011).

L'étude des mécanismes de la maladie et la recherche de traitements curatifs nécessitent de disposer de modèles cellulaires et murins pertinents. Les premières études ont utilisé des prélèvements post-mortem d'échantillons de patients ou des biopsies musculaires invalidantes pour les patients. Face à la nécessité de disposer de modèles plus accessibles, de nombreux modèles cellulaires et animaux ont été développés.

-Outils cellulaire

In vitro, la recherche de nouveaux traitements a été réalisée sur des modèles cellulaires plus ou moins spécifiques de la maladie en fonction du biomarqueur ciblé. Les approches utilisant des vecteurs rapporteurs utilisés pour mesurer la taille des répétitions CTG, l'épissage alternatif ou l'expression de MBNL1 ont pu être réalisées dans des lignées cellulaires saines transfectés (Hubert, Lin, Dion, & Wilson, 2011). D'autres biomarqueurs ont nécessité des outils cellulaires issus de patients. La DM1 étant multi-systémique, les criblages réalisés sur les foci ont quant à eux pu être menés dans des fibroblastes de patients dont le prélèvement peut être réalisé sans impacter le muscle des patients (Ketley et al., 2014). Dans ces cellules, différents défauts d'épissages peuvent être analysés pour valider l'effet des composés identifiés. Pour avoir accès à des biomarqueurs plus fonctionnels et plus proches du muscle squelettique, différentes équipes ont trans-différencié des fibroblastes de patients en myoblastes via la surexpression stable du facteur de transcription MyoD (O'Leary et al., 2010; Ravel-Chapuis et al., 2012; Savkur et al., 2001). Bien que différents des myoblastes, ces fibroblastes reprogrammés ont contribué à l'identification de voies métaboliques perturbées dont l'altération a été confirmée in vivo dans des modèles murins de la maladie (Brockhoff et al., 2017) mais aussi à la réalisation de cribles de composés thérapeutiques (Ketley et al., 2020). Toutefois, le fait de pouvoir disposer de cultures primaires de myoblastes issus de patients DM1 était indispensable. Dans ce contexte cellulaire plus physiologique, Furling et al ont montré que les myoblastes DM1 présentent une senescence précoce et un défaut de fusion myogénique (Arandel et al., 2017). Pour thésauriser ces cellules obtenues à partir de biopsies, une lignée de myoblastes de patients DM1 possédant 1400 répétitions a été immortalisée par la transduction conjointe de la télomerase humaine (TERT) et de la kinase CDK4 pour lever le contrôle du cycle cellulaire par la protéine p16 (Mamchaoui et al., 2011). Ces myoblastes immortalisés, présentent également un défaut de fusion en comparaison aux cellules saines et sont adaptables pour des approches de criblage à large échelle. Le panel d'outils cellulaires pour étudier la DM1 est donc assez riche mais il se restreint au lignage myogénique pour des études chez l'Homme.

Les cellules souches pluripotentes humaines (hES_DM1 ou IPS_DM1) ont avantageusement complété ce tableau compte tenu de leur propriété d'auto-renouvellement et de pluripotence. En comparant ces IPS_DM1 différenciées versus indifférenciées, Ueki et al. ont révélé une dynamique variable de l'amplification des répétitions de cTG au cours de la différenciation cellulaire (Ueki et al., 2017). Au stade différencié, ces cellules ont été utilisées pour modéliser la DM1 et pour la recherche de nouveaux traitements. Ainsi, un criblage de composé thérapeutiques visant la désagrégation des foci intranucléaire a été réalisé dans des progéniteurs du mésoderme issu de hES_DM1, conduisant à l'identification des glycosides cardiaques (Maury et al., 2019). Pour étudier les atteintes neurales de la DM1 chez l'homme, le seul modèle cellulaire humain provient de la différenciation de cellules souches pluripotentes humaines différenciées en progéniteurs neuraux et neurones, en astrocytes et en motoneurones (Denis et al., 2013; Marteyn et al., 2011; Ueki et al., 2017; Y. Wang et al., 2018; Xia et al., 2013). Dans ces cellules, la présence de foci et des défauts d'épissage spécifiques de ce lignage sont retrouvés. Ainsi, Gao et al décrit dans des neurones dérivés d'IPS_DM1, les défauts d'épissage affectant les transcrits *MAPT* et *APP* identifiés par Dahennes et al dans des cerveaux de patients DM1 post-mortem (Dhaenens et al., 2011; Gao et al., 2016). Ces dérivés d'IPS ou hES ont également contribué à la mise en évidence de différentes atteintes fonctionnelles affectant la voie mTOR dans les progéniteurs de neurones (Denis et al., 2013), ainsi qu'un défaut d'arborisation des motoneurones dans la DM1 (Marteyn et al., 2011). Plus récemment, l'optimisation des protocoles de différenciation vers les lignages myogéniques et cardiaques ont montré qu'il était possible de travailler sur les différents biomarqueurs moléculaires et fonctionnels de la DM1 avec ces cellules. Ainsi, les myoblastes dérivés d'IPS_DM1 présentent des défauts de fusion myogéniques associés à la présence des foci et des défauts d'épissages associés (Tahraoui et al., en preparation). Le défaut d'activation de la voie mTOR est également retrouvée dans des cellules satellite de muscle squelettiques dérivées d'IPS DM1 (Song et al., 2020). Enfin, des modèles cellulaires d'étude des atteintes cardiaques de la DM1 sont de plus en plus décrits à partir de dérivés d'IPS_DM1 humaines. Plusieurs équipes ont généré des cardiomyocytes DM1 qui expriment des marqueurs de différenciation cardiaque, des foci intranucléaires, des défaut d'épissage du canal sodique cardiaque *SCN5A* mais aussi celui du canal sodium *CaV1* (Poulin et al., 2021; Tang et al., 2012). Poulin et al démontrent que les défauts d'épissages qui touchent ces canaux ioniques perturbent le flux de Ca^{2+} et de Na^{+} impactent les potentiels d'action des cardiomyocytes DM1 (Poulin et al., 2021) (Figure 12). Gao et al ont tiré profit de la pluripotence des IPS_DM1 pour démontrer l'efficacité de leur stratégie CRISPR/Cas9 dans des myoblastes, des cardiomyocytes et des neurones DM1 simultanément (Gao et al., 2016).

Comme chaque outil cellulaire, les CSPh présentent certaines limites d'utilisation. Une immaturité des progénies générées est décrite dans l'ensemble des lignages. Par exemple, alors que les cardiomyocytes dérivés d'IPS sont fonctionnels et ont prouvé leur utilité dans l'évaluation des médicaments et des maladies, les cardiomyocytes dérivés d'hiPSC n'ont pas de système tubulaire en T bien développé, présentent un potentiel d'action et des paramètres calciques similaires à ceux du cœur embryonnaire. Similairement, la distribution et la fonction de la dystrophine dans ces cardiomyocytes contraste aussi avec le schéma de localisation membranaire défini dans le muscle squelettique et cardiaque adulte (Dick et al., 2013). Un autre bémol à l'utilisation des CSPh est la nécessité de travailler sur plusieurs lignées simultanément afin de s'affranchir de biais provenant de la spécificité d'un clone cellulaire ce qui rend leur utilisation laborieuse et onéreuse.

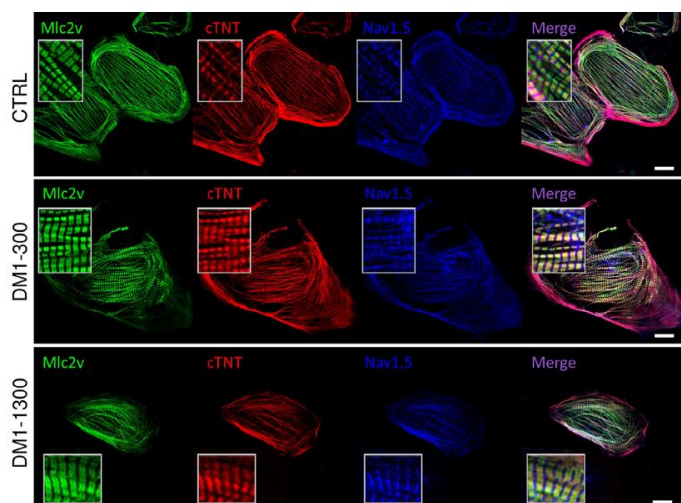


Figure 12. Détection au microscope confocal de l'expression de marqueurs cardiaques détectés par immunofluorescence dans des cardiomyocytes dérivés de lignées d'IPS DM1. La myosine light chain2v (mlc2v) est colorée en vert, la troponine T cardiaque (cTnT) en rouge et le canal sodium cardiaque (Nav1.5) est coloré en bleu. Barre d'échelle : 20 μ M. (Poulin et al., 2021).

-Modèles animaux :

L'étude de la pathogénèse comme la recherche de nouveaux traitements, ont toujours été menées conjointement dans des modèles *in vitro* et *in vivo*. Pour la DM1, différents modèles animaux existent et permettent de cibler les atteintes de la maladie dans différents organes. Chez la souris, la perte de fonction du gène *DMPK*, celle de *MBNL1* et la surexpression de *CUGBP1* ont été modélisés. Cependant, les modèles murins les plus utilisés sont les souris HSA-LR, DM200 et DMSXL (Table 6)(pour Revue(Gomes-Pereira, Cooper, & Gourdon, 2011)).

Le modèle de souris HSA-LR : Les souris HSA-LR expriment de façon homozygote un transgène qui comprend un fragment génomique du gène de l'actine squelettique humaine dans lequel 250 répétitions CTG ont été introduites dans la région 3'UTR. Ces souris présentent les atteintes de la DM1 dans le muscle squelettique incluant une faiblesse musculaire, des noyaux situés au centre des fibres musculaires, des défauts d'épissage alternatifs et une myotonie (Mankodi et al., 2002).

Le modèle de souris DM200 : Les souris DM200 surexpriment de façon homozygote un transgène GFP fusionné à la région 3'UTR de la *DMPK* contenant 200 répétitions de GCT sous le contrôle du promoteur *DMPK* humain sensible à la doxycycline. Le modèle reproduit les caractéristiques cardinales de la dystrophie myotonique, y compris la myotonie, les anomalies de la conduction cardiaque, l'histopathologie et les défauts d'épissage de l'ARN. Le transgène ne code pas de protéine *DMPK* et modélise l'impact des répétitions de CTG dans la physiopathologie de la DM1 (Mahadevan et al., 2006).

Le modèle de souris DMSXL : Le modèle de souris DMSXL est une lignée de souris homozygotes portant plus de 1000 répétitions CTG (Huguet et al., 2012), dérivée de la lignée de souris transgéniques DM300, qui porte 45 kb de séquence génomique humaine du locus DM1 (Seznec et al., 2000). Le modèle montre des défauts d'épissage légers mais des foci intranucléaires dans tous les organes, un retard de croissance, des altérations histologiques, une faiblesse et une atrophie musculaire ainsi que des défauts respiratoires. Ces souris présentent également différentes atteintes cognitives et comportementales décrites dans la DM1 (Hernandez-Hernandez et al., 2013).

Le modèle EpA960 : Ce modèle de souris transgénique DM1 est spécifique du cœur. Les souris expriment 960 répétitions de CTG dans le contexte de la région 3'UTR de la *DMPK* sous le contrôle du promoteur de la chaîne lourde de l' α -myosine. Les souris présentent les caractéristiques cardiaques moléculaires et pathologiques de la DM1 telles qu'une cardiomyopathie dilatée, des arythmies et un dysfonctionnement systolique (G. S. Wang et al., 2007). Le croisement des souris EPA 960 avec des souris exprimant le CRE recombinase placée sous le contrôle de promoteurs spécifiques du lignage musculaire (Orengo et al., 2008) et neural (P. Y. Wang et al., 2017) ont également été générés.

Mouse model ^a	Therapeutic strategies ^b	Quantifiable phenotypes in target tissues				Limitations
		Skeletal muscle	Heart	CNS	Others	
<i>HSA</i> ^{LR}	Elimination of toxic RNA, disruption of RNA-MBNL protein interactions, MBNL upregulation, restoration of missplicing	Myotonia, myopathy, foci accumulation, MBNL1 sequestration, missplicing events	Not applicable	Not applicable	Not applicable	No muscle weakness, normal CELF1 levels
EpA960	Elimination of toxic RNA, disruption of RNA-MBNL protein interactions, MBNL upregulation, CELF1 downregulation, PKC inactivation	Myotonia, motor function, muscle wasting, myopathy, foci accumulation, MBNL1 sequestration, missplicing events	Cardiac conduction defects, cardiomyopathy, foci accumulation, MBNL1 sequestration, missplicing events	Not reported	Not reported	Leakage of transgene expression in skeletal muscle, high mortality due to cardiac complications
DM300 and/or DMSXL	Elimination of toxic RNA, disruption of RNA-MBNL protein interactions, MBNL upregulation, restoration of missplicing, modification of triplet repeat dynamics	Myotonia, myopathy, foci accumulation, muscle strength, missplicing events	Foci accumulation, missplicing events	Foci accumulation, missplicing events, tauopathy	Foci accumulation, missplicing events	Mild splicing abnormalities, interindividual variability, time-consuming breeding strategies
<i>DMPK-GFP</i> (CTG) ₅	Elimination of toxic RNA, NKX2-5 downregulation	Myotonia, myopathy, missplicing events.	Cardiac conduction defects	Not reported	Not reported	No muscle weakness, no RNA foci, short repeat sequence, high mortality
<i>Mbnl1</i> ^{A3/A3}	MBNL upregulation or replacement	Myotonia, myopathy, missplicing events	Cardiomyopathy	Motivation and apathy deficits	Not reported	No muscle weakness, normal CELF1 levels
TRECUGBP1	CELF1 downregulation, restoration of missplicing	Motor function, myopathy, muscle weight, missplicing events	Cardiac conduction defects, cardiomyopathy	Not reported	Not reported	High mortality

Table 6. Évaluation préclinique des stratégies thérapeutiques dans les modèles murins de la DM1 (Gomes-Pereira et al., 2011).

- Stratégies thérapeutiques

Cibler les répétitions de CTG dans le génome

L'une des approches thérapeutiques qui vient en premier à l'esprit consiste en la délétion des répétitions de CTG. Cet objectif est désormais atteignable grâce à l'utilisation de la technologie CRISPR/Cas9 dont différentes applications sont envisageables pour la DM1 (Figure 13).

La première méthode fait appel à une coupure de l'ADN permettant d'exciser les répétitions de CTG qui se situent en dehors de la séquence codante de la *DMPK*. La preuve de concept a été réalisée par différentes équipes (Lo Scudato et al., 2019; van Agtmaal et al., 2017). Par exemple, Lo Scudato et al. ont mis au point une stratégie d'édition de gène en utilisant le système CRISPR-Cas9 de *Staphylococcus aureus* (Sa) pour supprimer les répétitions de CTG dans le locus *DMPK* de myoblastes immortalisés DM1. In vivo, une seule injection intramusculaire de vecteurs AAV recombinants exprimant les composants CRISPR-SaCas9 a diminué le nombre d'agrégats de DMPK mutants détectés dans le muscle tibial antérieur des souris DMSXL (Lo Scudato et al., 2019). Il est à noter qu'une approche visant sélectivement l'allèle mutant est difficilement envisageable pour la DM1 compte tenu de l'absence de SNP clairement identifiés.

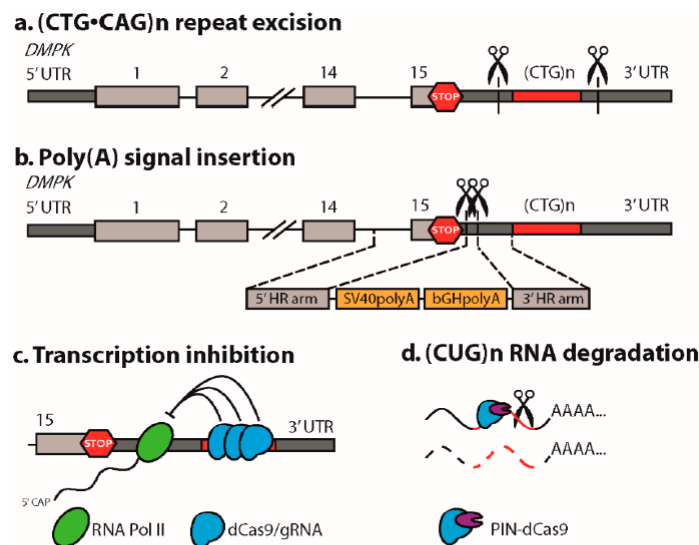
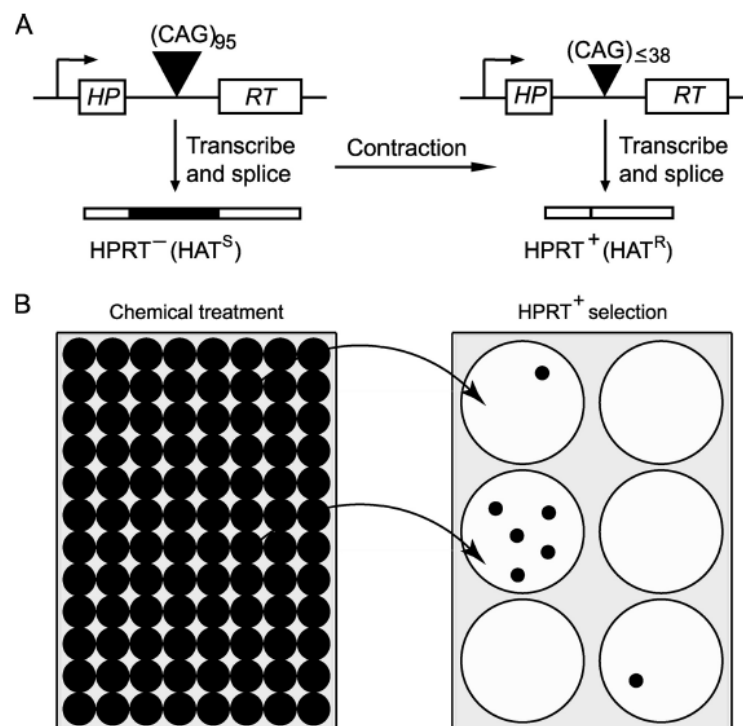


Figure 13. Stratégies CRISPR / Cas9 appliquées dans la DM1. (a) Le triplet (CTG)_n est excisée via un double clivage généré par CRISPR / Cas9, de chaque côté de la répétition, suivi par la jonction des deux extrémités par NHEJ. (b) La transcription de la répétition (CTG)_n dans le gène *DMPK* est empêchée en insérant un signal poly (A) prématuré entre le codon d'arrêt de la traduction et la région contenant les répétitions. Cette opération est réalisée en associant la coupure du gène par CRISPR/Cas9 suivie par un évènement de recombinaison homologue au cours duquel l'ADN donneur est intégré. (c) Le recrutement de la deadCas9 au niveau de la répétition de (CTG) dans le gène *DMPK* inhibe sa transcription en bloquant physiquement la progression de l'ARN polymérase II. (d) Le recrutement de la protéine dead Cas9 fusionnée à l'endonucléase PIN au niveau des répétitions (CUG)_n entraîne une dégradation du transcrit mutant *DMPK* (Raaijmakers, Ripken, Ausems, & Wansink, 2019).

Une autre approche consiste à utiliser une Cas9 modifiée : la deadCas9, dépourvue d'activité d'édition mais qui bloque le passage de la RNA polymérase au niveau du promoteur de la *DMPK*. Pinto, et al. ont ainsi démontré que la Cas9 désactivée bloque efficacement la transcription de la version étendue des répétitions CTG in vitro dans des myoblastes DM1 et in vivo dans le modèle HSA-LR. DM1 (Pinto et al., 2017). D'autres études démontrent une inhibition de l'expression du transcrit *DMPK* via l'insertion d'un site précoce de polyadéylation par recombinaison homologue évitant la transcription des CTG sans induire d'haplo-insuffisance en *DMPK*. Ces manipulations ont été introduites dans une lignée d'IPS DM1 dans laquelle la reversion des atteintes moléculaires ont été validé après différenciation dans le lignage myogénique, cardiaque et neural (Y. Wang et al., 2018). Les thérapies faisant appel à la technologie CRISPR/Cas9 sont extrêmement prometteuse mais doivent encore écarter différents problèmes tels que ceux liés à la délivrance et la biodistribution du produit thérapeutique pour cette maladie multisystémique, ainsi que les potentiels effets off-targets.

Une approche thérapeutique moins spécifique mais permettant à priori de contourner ces différents problèmes est l'utilisation de composés chimiques. Ainsi, Hubert et al ont développé un essai visant identifier des molécules capables d'induire la contraction de répétitions de CTG dont la validité a été



évaluée lors du criblage d'une chimiothèque de petite taille contenant des molécules possédant une autorisation de mise sur le marché (Figure 14). Par cette approche, ils ont identifié plusieurs composés tels que l'Acacetin ciblant la voie de transduction du signal TOP1-TDP1-SSBR, qui contrôle l'instabilité des répétitions. Ce crible ayant été réalisé dans une lignée de fibrosarcoma human, il serait intéressant d'étudier l'impact de cette molécule dans des modèles cellulaires permettant l'étude d'autres biomarqueurs de la DM1.

Figure 14. Stratégie de criblage visant à révéler des contractions de répétitions de CTG. Les cellules expriment un vecteur dans lequel le gène *HPRT* est interrompu par des répétitions de CTG. Lorsqu'un composé induit une contraction inférieure à 38 CTG, le transcrit *HPRT* est exprimé et confère une résistance aux cellules cultivées dans un milieu de sélection (Hubert et al., 2011).

Dégrader le transcrit DMPK mutant avec des oligonucléotides

Une autre piste thérapeutique cible l'expression du transcrit de l'allèle mutant de la *DMPK* portant les répétitions d'expansions CTG au moyen d'oligonucléotides. La preuve de concept a été apportée en 1999 par Langlois et al via l'utilisation de rybozyme qui entraîne un clivage supérieur à 60% du transcrit mutant associé à la diminution de la détection des agrégats intranucléaires et la correction du défaut d'épissage de l'*INSR* dans des myoblastes de patients DM1 (Langlois, Lee, Rossi, & Puymirat, 2003). Depuis, différentes équipes ont développé des approches utilisant des oligonucléotides antisens modifiés (ASO) qui vont se lier de façon complémentaire aux brins sens de l'ARNm, inhibant son expression voire provoquant sa dégradation. Deux formes d'AON sont utilisées dans le cadre de DM1 : AONs modifiés en 2'-O-méthyl (MOE) et les oligonucléotides morpholinos antisens phosphorodiamidate (PMO). Ces derniers vont plutôt jouer sur une inhibition de l'expression par un encombrement stérique sans déclencher de système de dégradation. Ces oligonucléotides ont prouvé leur efficacité *in vivo* dans des modèles murins de la maladie (Jauvin et al., 2017; J. E. Lee, Bennett, & Cooper, 2012; Wheeler et al., 2012). Un oligonucléotide antisens nommé IONIS-DMPKRx, développé par la société Isis Pharmaceuticals, a ainsi été testé chez des patients DM1 en 2015 dans le cadre d'un essai clinique de phase 1/2a (NCT02312011). L'efficacité de ce produit thérapeutique, validé chez la souris et chez le primate non humain dans les muscles squelettiques et cardiaques n'a cependant pas montré d'effet bénéfique chez les patients (Pandey et al., 2015). Cette absence d'effet a été attribuée à un défaut de pénétration de l'antisens et souligne l'importance de nouveaux développements concernant sa délivrance. En exemple, Klein et al. ont développé un l'oligomère morpholino phosphorodiamidate conjugué un peptide riche en arginine Pip6a (PMO) qui induit une correction durable avec une efficacité élevée des phénotypes associés à la DM1 aux niveaux moléculaires et fonctionnels (Klein et al., 2019).

Batra et al. ont développé une approche utilisant une technologie CRISPR /Cas9 où la Cas9 inactivée est fusionnée à une RNA endonuclease permettant de cibler spécifiquement le transcrit de la *DMPK* dans des myoblastes de patients DM1 (Batra et al., 2017). Motivés par le potentiel d'une approche basée sur la thérapie génique, les auteurs montrent que des injections intramusculaires ou systémiques de virus (AAV) codant pour la dead Cas9 modifiée et un ARN guide ciblant les répétitions CUG dans des modèles murins de la DM1, aboutit à l'expression jusqu'à trois mois de la Cas9 et de l'ARN guide, l'élimination des agrégats intranucléaires toxiques, la libération de MBNL1, la réversion de défauts d'épissages et une correction de la myotonie (Batra et al., 2021).

Enfin, l'expression du transcrit *DMPK* mutant peut être ciblée sous sa forme agrégée, détectée par RNA-FISH dans le noyau de cellules DM1, via le criblage de composés chimiques. Ketley et al ont ainsi développé deux cribles à large échelle de banques de composés. Après un premier crible conduisant à l'identification d'un premier composé thérapeutique, le Ro-31-8220 (Ketley et al., 2014), cette équipe a procédé à un second crible en utilisant une chimiothèque spécifique des kinases qui a révélé la CDK12 comme cible thérapeutique pour la DM1. Cette kinase est surexprimée dans des lignées cellulaires DM1 et des biopsies musculaires des patients. Son inhibition par certains inhibiteurs actuellement en essais cliniques pour d'autres indications, réduit l'expression du transcrit *DMPK* mutant (Ketley et al., 2020). En utilisant des hES-DM1, Maury et al., ont identifié quant à eux, qu'un traitement par des glycosides cardiaques, et plus particulièrement la Digoxin, induit une réduction de la détection de ces foci intranucléaires toxiques via un mécanisme dépendant du calcium et de l'inhibition de la voie ERK (Maury et al., 2015).

Approches thérapeutiques ciblant le gène MBNL1

L'inactivation génique de MBNL1 chez la souris reproduit plusieurs phénotypes moléculaires et fonctionnels de la DM1. Pour déterminer si la complémentation en MBNL1 piégé dans les foci pouvait suffire à contrecarrer les effets délétères des répétitions de CTG, Kanadia et al., ont traité des souris HSA LR avec un lentivirus induisant l'expression ectopique de MBNL1. La correction de phénotypes fonctionnels et moléculaires apportée par cette surexpression a validé l'identification de MBNL1 comme cible thérapeutique pour la DM1 (Kanadia et al., 2006).

-Bloquer l'interaction MBNL1/ transcrit DMPK mutant

Une autre approche mécanistique consiste en l'identification de composés chimiques visant à interférer avec la captation de MBNL1 par les agrégats intranucléaires de transcrit *DMPK*. Chakraborty et al., ont ainsi développé un test de polarisation de fluorescence pour identifier des composés pharmacologiques réduisant la liaison de MBNL1 aux répétitions CUG pathogènes. En utilisant cet essai dans un crible de composés chimiques, les auteurs ont identifié la Daunorubicin qui diminue les symptômes cardiaques de Drosophiles DM1 (Chakraborty et al., 2018). D'autres cribles de composés chimiques à haut débit (Hoskins et al., 2014) ou de petites chimiothèques de repositionnement (Nakamori, Taylor, Mochizuki, Sobczak, & Takahashi, 2016) ont également abouti à l'identification de composés tels que l'Erythromycine, pour sa capacité à réduire les foyers ribonucléaires et corriger les défauts d'épissage dans des fibroblastes de patients DM1 mais aussi in vivo dans le modèle de souris HSA LR exprimant 200 répétitions de CGT dans le muscle où il a montré son efficacité pour corriger la myotonie sans induire de toxicité (Nakamori et al., 2016).

-Favoriser l'expression de MBNL1

Des modificateurs pharmacologiques de l'expression de MBNL1 ont été recherché par criblage. Pour cela, Zhang et al. ont criblé une chimiothèque sur une lignée exprimant un gène rapporteur de l'expression de MBNL1. Une caractérisation plus poussée des molécules candidates, a révélé que les inhibiteurs de HDAC, l'ISOX et le vorinostat, augmentaient l'expression de MBNL1 dans les fibroblastes dérivés de patients DM1 et corrigeaient des défaut d'épissages associés à la maladie (Zhang et al., 2017). Une autre illustration de cribles visant l'expression de MBNL1 a été publiée par Chen et al. Les auteurs ont identifié un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS), la phénylbutazone (PBZ), qui régule à la hausse l'expression de MBNL1 dans les myoblastes C2C12 ainsi que dans le modèle de souris HSA (LR). Incidemment, l'effet de ce composé met en jeu deux mécanismes d'action distincts en favorisant l'expression de MBNL1 et en atténuant sa liaison aux répétitions de CUG toxiques (G. Chen et al., 2016).

L'effet thérapeutique de la surexpression de MBNL1 évaluée via la restauration des épissages et la correction de la myotonie a toutefois ses limites. En effectuant un croisement entre des souris transgéniques MBNL1 et des souris exprimant les répétitions de CTG de façon inductible, Yadava et al rapportent qu'ils ne retrouvent qu'une correction modérée des défauts d'épissage, des troubles cardiaques et de la myotonie. Hormis ces effets limités qui peuvent être associés à un niveau d'expression insuffisant de MBNL1, le problème est posé par l'aggravation de la myopathie et l'absence de régénération musculaire dans ces souris (Yadava et al., 2019).

Thérapies ciblant l'activation de CUG-BP1

Une approche complémentaire aux précédentes consiste à cibler les dérégulations qui affectent de CUG-BP1 compte tenu de l'impact délétère de la surexpression de cette protéine dans des modèles murins (Ho et al., 2005; N. A. Timchenko et al., 2004). Grâce à l'étude des mécanismes moléculaires conduisant à la dérégulation de cette protéine, l'équipe de Timchenko a identifié deux molécules présentant un intérêt thérapeutique dans des modèles pré-cliniques. Le premier concerne l'inhibition de l'activité de la PKC par l'utilisation du Ro 31-8220, une molécule également identifiée par Ketley al pour sa capacité à réduire les agrégats de CTG via un mécanisme indépendant de la PKC (Ketley et al., 2014). Un second axe thérapeutique concerne l'inhibition de l'activité de la GSK3b (Wei et al., 2013) par le Tideglusib. Cette molécule appartient à la classe chimique des thiazolidines connue pour induire des effets neuro-protecteur et anti-inflammatoire. Cette molécule est actuellement en cours d'évaluation pour le traitement de la maladie d'Alzheimer (Pubchem ID : 11313622). Le Tideglusib, a été testé dans les modèles murins de la DM1 HSA-LR et DMSXL avec des effets positifs sur la survie, la croissance et la fonction musculaire (M. Wang et al., 2019). Le Tideglusib (AMO-02) a récemment terminé un essai clinique de phase II pour le DM1 (Clinicaltrials.gov: NCT02858908). Les résultats de l'étude réalisée chez des patients atteints de la forme congénitale de la DM1 a bien été toléré par les patients. La majorité des sujets ont manifesté une amélioration de leur système nerveux central et symptômes neuromusculaires après 12 semaines de traitement par rapport au placebo de référence (Horrigan et al., 2020). D'autres essais visant à évaluer l'effet du Tideglusib pour la DM1 sont actuellement en préparation.

Criblages de composés chimiques modificateurs de l'épissage

Sur la base de l'hypothèse qu'une correction des épissages associés à la DM1 pourrait conduire à l'identification de composés permettant l'amélioration de la qualité de vie des patients DM1, plusieurs cribles de composés chimiques ont ciblé l'épissage. Ces épissages ciblaient soit le canal chlore à l'origine de la myotonie. L'essai utilisé dans ce crible consiste en un minigène permettant de suivre l'inclusion de l'exon 7 du CLCN1 grâce à un gène rapporteur : la luciférase. Le premier crible réalisé en 2010 dans des fibroblastes de patients modifiés par la surexpression du facteur de transcription MyoD a utilisé une banque de 13000 composés et a identifié la Triciribine, une molécule agissant comme un inhibiteur de la PI3K (Pubchem : 65399) (O'Leary et al., 2010). En 2013, un second crible réalisé avec un autre minigène contenant la luciférase comme gène rapporteur a été réalisé sur une banque de molécules bioactives dans la lignée de myoblastes murin C2C12. Incidemment, ce crible a identifié le Ro 31-8220 déjà connu, mais aussi la Manumycine A, un antibiotique d'un antibiotique (Oana et al., 2013). Les auteurs ont identifié l'implication de H-Ras dans le contrôle de l'épissage par ce composé. L'efficacité de la molécule a été validée sur l'épissage in vivo du canal chlore dans des souris HSA-LR sans que son efficacité sur la myotonie n'ait été évaluée.

Dans ce type d'approche, il serait intéressant de connaître la spécificité d'action de ces molécules sur l'épissage alternatif pour en évaluer l'intérêt thérapeutique pour la DM1 au delà même de la correction de la myotonie.

Utilisation des CSPh pour l'étude des modificateurs moléculaires et chimiques des défauts d'épissage de la DM1

Suite à mon expérience de stage post-doctoral dans le Service de Génomique Fonctionnelle d'Evry, mon objectif lors de mon arrivée à I-Stem a été de mettre en place un crible de génomique fonctionnelle par ARN interférence pour réduire l'expression de biomarqueurs de la maladie. A cette époque, des bibliothèques de siRNA ciblant le génome entier avait été constituées par des sociétés commerciales telles que Qiagen et Sigma. Ces bibliothèques avaient été utilisées avec succès pour le criblage de gènes impliqués dans le développement de certains cancers. Il est à noter que l'ampleur du criblage envisagé nécessitait i) la disposition d'une banque de siRNA, ii) un modèle cellulaire facile à utiliser et iii) une cible de criblage à la fois pertinente pour la DM1 mais aussi facile à utiliser et peu onéreuse.

Pour la mise en place d'un tel crible, j'ai obtenu un financement Stem Pôle permettant d'accéder à une banque « génome entier » de Qiagen dans laquelle un gène était ciblé par trois siRNA indépendants générés par analyse bio-informatique mais non validés. En ce qui concerne l'outil cellulaire, nous disposions à I-Stem de lignées de cellules souches embryonnaires humaines porteuses de la mutation causale de la DM1 dérivées dans le laboratoire du Dr Karen Sermon (Vrije Universiteit Brussels) (Mateizel et al., 2006). Etant donné que les protocoles de différenciation des lignées de CSPh commençaient à peine à être développés, nous avons choisi de réaliser le criblage sur une progénie de cellules souches de progéniteurs issus du mésoderme exprimant la plupart des marques des cellules souches mésenchymateuses (Mateizel et al., 2008) qui correspond à une ressource cellulaire pouvant facilement être amplifiées, congelées et manipulées par des robots. Enfin, nous avons développé deux essais dédiés à la DM1 ciblant les agrégats intranucléaires de transcrits *DMPK* mutés nommé par la suite foci et le défaut d'épissage du récepteur à l'insuline (*INSR*). Pour la détection des foci au format de plaques à 96 et 384 puits, j'ai obtenu un financement ASTRE permettant d'équiper I-Stem en microscope automatisé de High Content Screening et avons adapté la détection des foci décrit par Fadaei et al. dans un format miniaturisé (Fardaei et al., 2001) (Figure 15). Parallèlement aux approches classiques de criblage à haut débit, cette approche permettait d'analyser phénotypiquement les cellules après criblages sur plusieurs paramètres (prolifération, marqueurs détectés par les fluorochromes) grâce à l'utilisation automatisée d'algorithmes d'analyse d'image. Concernant la détection de l'épissage de *INSR*, il s'agissait là d'un essai moléculaire, plus onéreux à utiliser à plus bas débit dans la phase de validation des hits potentiellement identifiés dans un crible secondaire. Pour cela, nous avons mis au point un essai duplex taqman permettant de discriminer simultanément l'expression relative de chacun des deux variants transcriptionnels *INSRA* (*INSR* -exon 11) et *INSRB* (*INSR* + exon 11). Pour évaluer ce défaut d'épissage à haut débit, j'ai obtenu un financement pour équiper I-Stem d'une machine de PCR quantitative en temps réel permettant de travailler au format de plaques à 384 puits.

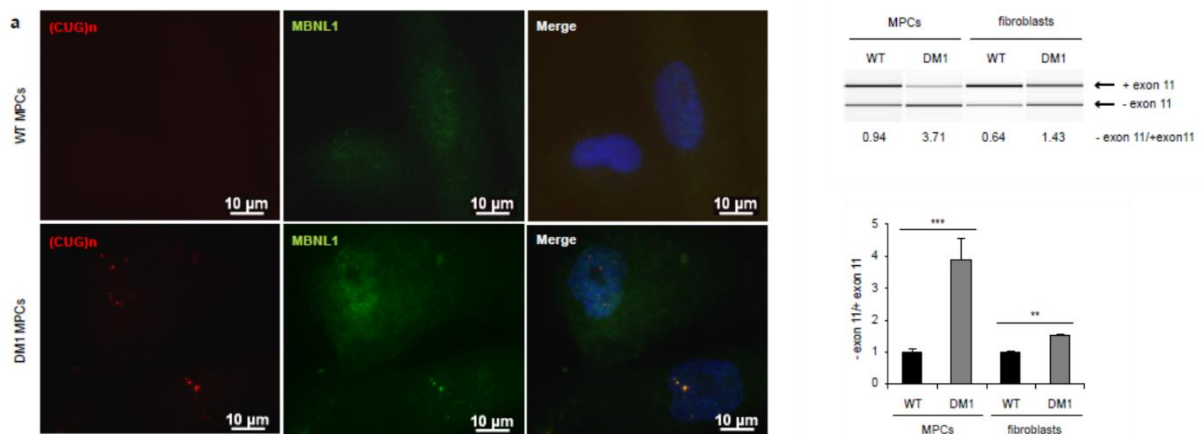


Figure 15. Détection de biomarqueurs de la DM1 dans des précurseurs du mésoderme (MPCs) dérivés de cellules souches embryonnaires humaines VUB03-DM1. Le transcrit DMPK portant les répétitions de trinocléotides CTG est détecté par RNA-Fish dans le noyau des cellules sous la forme de foci. Ces cellules expriment en conséquence un défaut d'épissage de l'exon 11 du récepteur à l'insuline (*INSR*) détecté par PCR classique ou par PCR quantitative dans un essai duplex utilisant des sondes Taqman.

Après la mise en place de ces outils, nous avons précédé à la preuve de concept de l'approche sur une petite librairie ciblant une quinzaine de protéines de fixation à l'ARN. En effet, à cette époque l'implication des protéines CUG-BP1 et MBNL1 avait été décrite dans le contrôle de l'épissage de l'*INSR* (Savkur et al., 2001) et Dansithong et al. montraient que l'extinction par ARN interférence de MBNL1 induisant une désagrégation des foci intranucléaires (Dansithong et al., 2005). De plus, Talukdar et al montraient que d'autres RBPs telles que l'hnRNP H pouvaient également interférer sur ces défauts d'épissages (Talukdar et al., 2011). Pour une preuve de concept, les RNA binding protéines (RBPs) ont été choisies sur la base de leur homologie avec les protéines CELF ou leur appartenance à la famille des hnRNPs (Geuens, Bouhy, & Timmerman, 2016). Cette mini-librairie a été testée dans les MPCs dérivés de la lignée de hES VUB-03 DM1 (>1000CTG). Par cette approche, nous n'avons pas identifié de RBP capable d'induire une désagrégation des foci comme observé avec un siRNA ciblant MBNL1. A l'inverse, différents siRNA se sont révélés efficaces pour moduler l'inclusion de l'exon 11 de l'*INSR*. Ces résultats nous indiquaient que nous avions ciblé ici des gènes qui se comportaient à la manière de CUG-BP1 dont la stabilisation participait au défaut d'épissage de l'*INSR* sans intervenir dans la biogénèse des foci. Nous avons validé l'effet de l'extinction d'ELAVL1, qui partage un domaine RRM avec CUGBP1, sur la correction des défauts d'épissage affectant l'exon 22 de *SERCA1* mais aussi l'exon 5 de la *cTNT*. L'implication d'ELAVL1 sur la régulation de ces différents biomarqueurs a été confirmé par des expériences de surexpression. Ces résultats suggéraient que ce gène pourrait jouer le rôle d'un gène modificateur des défauts d'épissages induit par CUG-BP1 dans la DM1. Dans la littérature, Wang et al, démontraient que l'activité d'ELAVL1 pouvait différer en fonction de sa localisation subcellulaire et que celle-ci était contrôlée par l'AMPK (W. Wang et al., 2002). Nous avons donc testé l'effet d'activateur de l'AMPK afin de déterminer si une modification de la localisation subcellulaire d'ELAVL1 pouvait mimer l'effet de son extinction via des siRNAs. Parmi les différents activateurs connus de l'AMPK, nous nous sommes intéressés à la metformine, qui présentait l'avantage de correspondre à un antidiabétique connu depuis les années 1970 utilisé pour le traitement de la résistance à l'insuline. Dans les MSC VUB03-DM1, nous avons testé l'effet de la metformine et avons analysé l'impact du

traitement sur l'expression des foci et les défauts d'épissages associés à la DM1. Nous avons observé que la metformine ne participait pas à une réduction notable des foci mais qu'elle induisait une correction partielle de l'épissages de l'*INSR*, et ceux de la *CTNT* et du canal chlore via l'utilisation de minigènes rapporteurs.

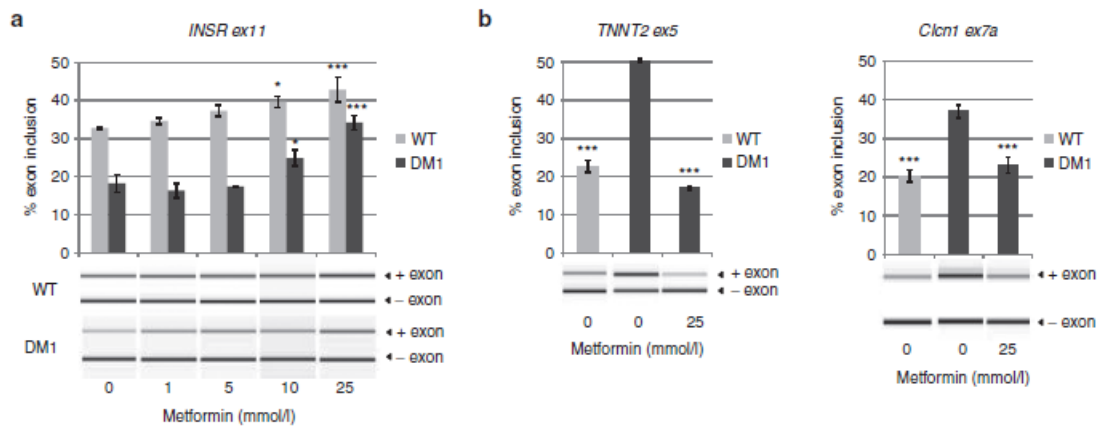


Figure 16. Caractérisation de l'effet de la metformine sur des défauts d'épissages associés à la DM1 dans des MPCs VUB03-DM1 et VUB-01 saines. (a) La metformine promeut l'inclusion de l'exon 11 de l'*INSR* dans les MPCs DM1 et saines indiquant la mise en jeu d'un mécanisme indépendant de l'expression des répétitions de CTG. (b) La metformine corrige les défauts d'inclusions de l'exon 5 du transcrit *TNNT2* et de l'exon 7a du transcrit *Clcn1* codés par des minigènes transfectés dans les MPCs VUB03 (Laustriat et al., 2015).

Afin de mieux caractériser l'effet de la metformine sur l'épissage et déterminer la spécificité d'action nous avons réalisé une analyse par RNA-seq des MSC-VUB03-DM1 en collaboration avec la plateforme de CNG (EVRY) et l'équipe du Dr Didier Auboeuf (ENS, Lyon). Nous avons ainsi identifié la régulation de différents évènements d'épissages de types 5' alternatifs, exon cassette, exon mutuellement exclusif et 3' alternatifs par ce composé. Parmi les RBP régulées par la metformine, nous avons identifié une répression de RBM3 dont l'implication dans plusieurs des évènements d'épissages identifiés a pu être validée. Afin de mieux caractériser son intérêt pour la DM1, nous avons analysé l'expression de défauts d'épissage validés dans des biopsies de patients DM1 dans des myoblastes immortalisés de patients DM1 obtenus auprès du Dr Denis Furling (Hôpital de la Pitié Salpêtrière, Paris). Nous avons ainsi pu étendre l'effet de la metformine sur l'atténuation des défauts d'épissages *INSR* exon 11, *DMD* exon 71, *DMD* exon 78, *KIF13A* exon 32 et *TNNT2* exon 5. Grâce à une collaboration avec le Dr Geneviève Gourdon et le Dr Alban Vignaud, nous avons pu mettre en évidence la correction du défaut d'épissage de l'exon 5 du transcrit *TNNT2* dans le modèle murin DMSXL. Une légère amélioration de la tonicité des souris DMSXL traitées qui n'apparaissent plus différentes en terme de performance par rapport à des souris saines a également pu être observée. Afin d'évaluer l'efficacité de la metformine sur l'épissage chez l'homme, nous avons développé une collaboration avec le Dr Guillaume Charpentier de l'hôpital de Corbeil-Essonnes afin de mesurer l'effet de la metformine sur l'épissage de l'*INSR* dans le sang de patients diabétiques. Dans le cadre de l'essai interventionnel Metforgène (NCT01349387) nous avons confirmé l'impact du traitement sur l'inclusion de l'exon 11 de l'*INSR* par PCR quantitative dans le sang des patients après une période d'un mois de traitement à la metformine suivant une période de sevrage pendant laquelle les patients étaient traités par un antidiabétique d'une autre famille que la metformine. Cet effet a également été validé sur l'épissage de l'exon 6 du récepteur FAS contrôlé par ELAVL1 (Izquierdo, 2010) (Figure 17).

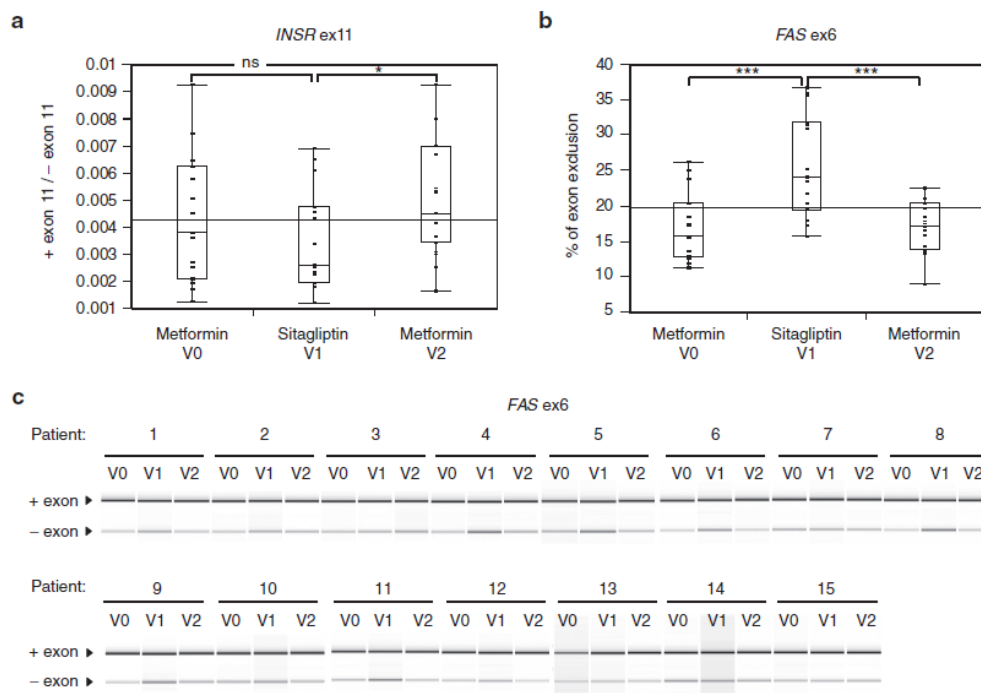


Figure 17. Régulation de l'épissage alternatif de l'exon 11 de l'*INSR* et de l'exon 6 du transcrit *FAS* analysés par PCR dans le sang de patients diabétiques traités à la metformine lors de l'essai clinique Metforgène (Laustriat et al., 2015).

Depuis cette étude, différentes équipes travaillant sur la DM1 ont également mis en évidence l'importance de l'AMPK dans la pathogénèse de la DM1. En 2017, Brockhoff et al recherchent la dérégulation des voies métaboliques centrales dans la pathologie musculaire associée à la DM1 à la recherche de cibles thérapeutiques potentielles pour la maladie. Dans un modèle de souris HSA-LR, ils observent un défaut d'activation de l'AMPK dans le muscle dans des conditions de restriction métabolique, tandis que la signalisation mTORC1 reste active. Ces données sont confortées par la démonstration d'un flux autophagique perturbé dans le muscle des souris HSA-LR et dans des myotubes DM1 humains en culture. L'utilisation d'un activateur direct de l'AMPK, l'AICAR améliore nettement la fonction musculaire des souris HSA-LR et réduit fortement la myotonie via la correction du défaut d'épissage de l'exon 7 du canal chlore (Brockhoff et al., 2017).

Similairement, Ravel-Chapuis et al ont étudié l'état de la signalisation de l'AMPK dans le muscle squelettique DM1. Les auteurs constatent également une répression de la voie de l'AMPK dans le modèle de souris HSA-LR et des myoblastes DM1 dérivés de patient. L'activation pharmacologique chronique de la signalisation AMPK chez les souris DM1 avec l'AICAR a montré de multiples effets bénéfiques sur le phénotype DM1 : un traitement de 6 semaines avec l'AICAR a amélioré l'histologie musculaire des souris et corrigé plusieurs événements associés à la toxicité de l'ARN. (Ravel-Chapuis, Al-Rewashdy, Belanger, & Jasmin, 2018).

Enfin, García-Puga et al ont également montré une dynamique mitochondriale et un métabolisme énergétique réduits dans des PBMC des patients DM1 dont le traitement par la metformine a inversé les défauts métaboliques et mitochondriaux ainsi que d'autres phénotypes de vieillissement accéléré, tels que l'altération de la prolifération de fibroblastes DM1 (Garcia-Puga, Saenz-Antonanzas, Fernandez-Torron, Munain, & Matheu, 2020).

L'ensemble de ces résultats mettent en évidence l'implication de la dérégulation de l'AMPK dans la physiopathologie musculaire DM1 et apportent les données pré-cliniques manquantes dans notre étude. Incidemment, Brockhoff et al n'observent pas d'effet de la metformine dans les souris HSA LR ce qui peut s'expliquer par le fait que la metformine est un activateur indirect de l'AMPK, moins puissant de l'AMPK, mais aussi par l'utilisation d'un protocole de traitement inadapté. En effet, alors que l'AICAR est injecté en intra-péritonéal, la metformine est administrée par gavage, une voie de délivrance bien moins efficace. Ces conditions expérimentales pourraient s'avérer insuffisantes pour le modèle HSA qui exprime assez fortement les répétitions de CTG dans le muscle squelettique.

Compte tenu de ces différentes études, du fait que la metformine soit également décrite comme une molécule bloquant la RAN translation (Zu et al., 2020) et que ce médicament soit utilisé dans la prise en charge du diabète de certains patients DM1 (Kouki et al., 2005), le laboratoire CECS, partie privée d'I-STEM, a sponsorisé l'évaluation du potentiel thérapeutique de la metformine pour la DM1 dans l'essai clinique Myomet (EudraCT_ 2013-001732-21).

Myomet : un essai clinique chez les patients DM1 pour évaluer le potentiel thérapeutique de la metformine.

Le nombre d'essai thérapeutique pour le traitement de la DM1 est en constante augmentation (Figure 18). Différents types d'essais interventionnels ont déjà eu lieu chez les patients DM1 en faisant appel à des approches variées. Parmi celles-ci, on peut citer une thérapie cognitive comportementale. Dans cet essai multicentrique, les auteurs ont analysé l'effet d'une thérapie cognitivo-comportementale combinée à un exercice sur l'état de santé des patients DM1. Les auteurs ont observé une augmentation de la capacité d'activité mesurée par exemple par un test de marche de 6 minutes (6MWT) et la participation sociale des patients à 10 mois. Cet essai clinique démontre ainsi qu'une thérapie comportementale pourrait être envisagée chez les patients DM1 présentant une grande fatigabilité (Okkersen et al., 2018).

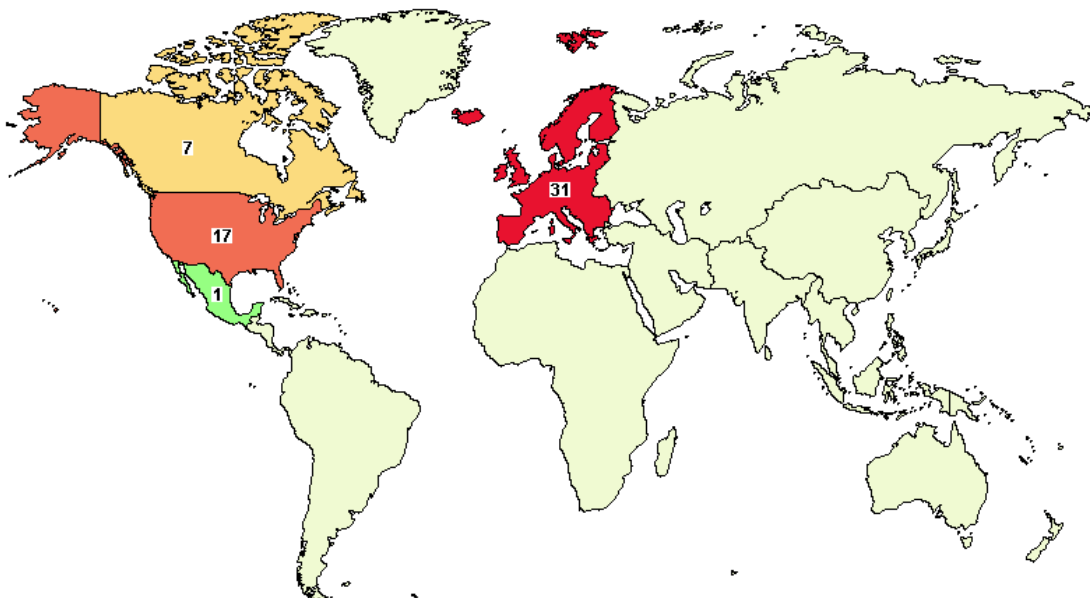


Figure 18. Répartition mondiale du nombre d'essais cliniques dédiés à la DM1 (<https://www.myotonic.org/study-trial-resource-center>).

D'autres approches thérapeutiques qui s'appuient sur la thérapie génique AAV (ASO DMPK, CRISPR/Cas9 ciblant les répétitions de CTG) ou l'injection d'oligonucléotides (visant le transcrit *DMPK* ou l'interaction entre MBNL1 et les répétitions de CUG) représentent des pistes prometteuses. Parmi ces candidats médicaments, le gapmers IONIS-DMPKRx (ISIS 598769) a été testé dans un essai clinique de phase I/II par la société IONIS. La molécule a été bien tolérée chez les patients DM1 traités mais n'a pas présenté de réponse thérapeutique significative du fait de l'insuffisance de molécules ayant pu atteindre dans les muscles ((Muscular Dystrophy Association, Ionis Reports Setback on DMPKRx Program for Myotonic Dystrophy, <https://strongly.mda.org/ionis-reports-setback-dmpkrx-program-myotonic-dystrophy>). Les modifications structurales de ces gapmères et oligonucléotides antisens, actuellement en cours de développement, devraient donner lieu à d'autres essais (pour revue (Pascual-Gilabert, Lopez-Castel, & Artero, 2021)) (Figure 19).

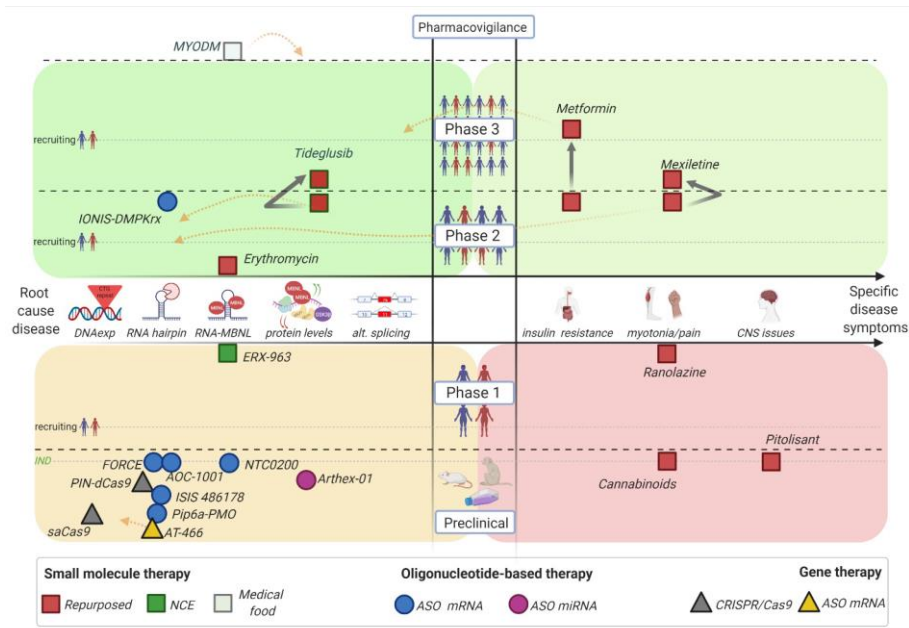


Figure 19. Etat d'avancement clinique des différents traitements de la DM1 en cours de développement (Pascual-Gilabert et al., 2021).

Les molécules chimiques pourraient quant à elles rencontrer des difficultés pour entrer en essai clinique du fait de leur potentielle toxicité. Les molécules ayant déjà fait l'objet d'essais cliniques pour la DM1 correspondent d'ailleurs à des molécules en repositionnement. Parmi celles-ci, plusieurs d'entre elles ont terminé une phase I/II et sont en cours d'évaluation en une Phase III. Ainsi, la **Mexilétine**, un anti-arythmique, a été testée pour sa capacité à réduire ou prévenir la myotonie en bloquant les canaux sodiques impliqués dans la contraction et relaxation des muscles (M. P. Takahashi & Cannon, 2001). L'effet de la molécule a été évalué dans deux essais cliniques de phase II chez des patients adultes atteints de DM1 (Heatwole et al., 2021; Logigian et al., 2010). Les résultats des études indiquent un effet positif sur la myotonie chez les patients ambulatoires sans bénéfice significatif sur le 6MWT. Ce médicament fait actuellement l'objet dans un essai clinique de phase III chez des enfants et des adolescents atteints de DM1 sous le nom NaMuscla. L'effet du **Tideglusib** (ou AMO-02) initialement testé dans la maladie d'Alzheimer, a été évalué chez des patients atteints de formes congénitales de la DM1. Chez la plupart des patients, une amélioration des symptômes neuromusculaires cliniques a été observée (Horrigan et al., 2020). De ce fait, et compte tenu de la tolérance observée dans ce premier essai, un essai de phase III a d'ores et déjà été annoncé. La troisième molécule candidate est **metformine** testée dans l'essai de phase I/II Myomet. Fait intéressant, la cible théorique de la metformine et du Tideglusib ciblent des kinases appartenant à un même pathway. En effet, l'AMPK est un senseur métabolique au même titre que la GSK3β. En condition anabolique, Suzuki

et al ont montré que la GSK3 forme un complexe stable avec l'AMPK. La GSK3 β phosphoryle alors la sous-unité catalytique de l'AMPK, inhibant ainsi son activité (Suzuki et al., 2013). Cette régulation restreint l'induction de l'autophagie et de l'inhibition de l'initiation de la traduction par l'AMPK. Ces résultats sont en adéquation avec l'inhibition de l'activation de l'AMPK rapportée dans la DM1.

La mise en place d'un essai thérapeutique pour la DM1 est difficile du fait de la progression lente de la maladie. Il est ainsi difficile d'anticiper la possibilité de corriger des symptômes dont l'évolution dans le temps était encore mal connue lors de l'élaboration de l'essai. Grâce au DM scope mis en place par le Dr Guillaume Bassez et les différentes études observationnelles visant à mieux connaître d'histoire naturelle de la maladie, le choix des biomarqueurs et le recrutement des patients est maintenant facilité. L'essai Myomet a été réalisé au centre de recherche clinique de l'hôpital Henri Mondor sous la direction du Dr Guillaume Bassez sur 40 patients chez lesquels la metformine ou un placebo a été administré par voie orale trois fois par jour, pendant de 48 semaines à la dose maximale. Le résultat primaire a ciblé la distance parcourue pendant le test de marche de 6 minutes, de la ligne de base à la fin de l'étude. Les changements dans la force musculaire et l'effet sur la myotonie, les variables de la marche, les paramètres biologiques et la qualité de vie ont été étudiés en critères secondaires. Les patients randomisés dans deux bras ont finalement révélé des résultats similaires dans toutes les mesures physiques et dans le 6MWT. Pour les 23/40 patients qui ont complètement terminé l'étude d'un an, les différences entre les groupes étaient statistiquement significatives, avec le groupe traité (n = 9) gagnant une distance de 32,9m, tandis que le groupe placebo (n = 14) a gagné 3,7m. Cette amélioration de la mobilité était associée à une augmentation de la puissance mécanique totale (P = 0,01), due à une augmentation des directions crânienne et antéro-postérieure suggérant un effet du traitement sur la marche. Les effets positifs du traitement par metformine sur 6MWT sont apparus après 16 semaines de traitement (lors de la première évaluation intermédiaire), quantitativement similaires à ceux enregistrés à 1 an. En revanche, à l'exception de la perte de poids limitée attendue associée à la metformine traitement, il n'y a eu aucun changement dans aucun des autres paramètres secondaires, y compris la myotonie et la force musculaire. Les patients dans le groupe traité présentaient une incidence plus élevée d'effets indésirables légers à modérés, principalement des dysfonctionnements gastro-intestinaux nécessitant des symptômes traitement. Bien que les résultats ne soient statistiquement significatifs que pour la population de patients per protocole et non pour l'analyse en intention de traiter, la metformine à la dose maximale tolérée a fourni un effet prometteur sur la mobilité et les capacités de marche des patients myotoniques (Figure 20). La metformine est actuellement en cours d'évaluation pour le traitement des patients DM1 dans un essai de phase III en Italie (**EudraCT Number:** 2018-000692-32) sponsorisé par DIP. MEDICINA DEI SISTEMI UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA TOR VERGATA.

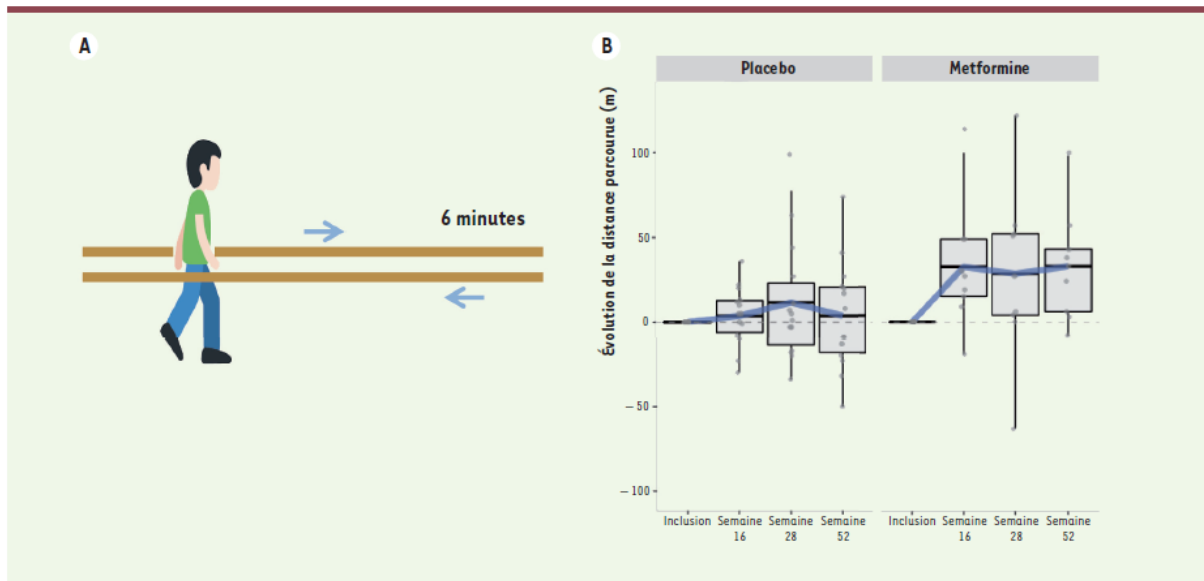


Figure 20. Evaluation de l'effet de la metformine sur le test de marche de 6 minutes chez les patients DM1 ayant participé à l'essai clinique Myomet. (A) La distance parcourue par le patient en 6 minutes est évaluée sur le même parcours et dans les mêmes conditions à différents temps de l'essai clinique. (B) Un groupe de neuf patients traités ayant terminé l'étude, a montré une augmentation de la distance parcourue dès la 16^{ième} semaine en comparaison au groupe ayant reçu un composé placebo (Bassez et al., 2018).

Dans l'essai Myomet, le traitement à la metformine n'a pas induit de modification de l'épissage de l'*INSR* mesuré dans le sang des patients DM1. Ce résultat suggère que la metformine n'était pas assez efficace pour produire cet effet dans le contexte de la DM1 à la différence des patients diabétiques qui prennent de la metformine depuis plusieurs années et qui ont été enrôlés dans l'essai metforgène. Ceci pourrait être expliqué par le défaut d'activation de l'AMPK révélé dans différents modèles cellulaires et animaux de la DM1.

Enfin, on ne peut exclure la présence de non répondeurs à la molécule chez les patients DM1. Grâce à une étude transcriptomique réalisée sur des échantillons sanguins de patients diabétiques, il est maintenant possible de discriminer le potentiel de réponse des patients au traitement sur la base d'un groupe de 56 gènes (Ustinova et al., 2020).

Contexte

La recherche de composés thérapeutiques pour la DM1 nous a amené à reconsidérer les différentes étapes nécessaires à l'identification d'un médicament candidat. Pour chaque maladie, il faut identifier un biomarqueur pertinent, réussir à miniaturiser sa détection tout en maîtrisant son coût. Une fois le crible réalisé, le développement d'une molécule chimique en médicament nécessite encore un long processus tenant compte de paramètres explorés cette fois *in vivo* tels que la toxicité, la biodistribution et l'efficacité du composé. Ainsi, de nombreux jalons doivent être franchis tout au long du processus de développement d'un médicament. Face à ce constat, nous nous sommes demandé s'il était possible de développer une approche alternative qui tirerait bénéfice de régulations géniques connues qu'il « suffirait » d'exploiter dans le cadre d'une approche thérapeutique. Par exemple, l'analyse du transcriptome par RNA seq de cellules traitées à la metformine montrait qu'un médicament pouvait réguler l'expression et l'épissage de différents gènes. Parallèlement, l'utilisation de la metformine, un médicament utilisé depuis les années 1970, nous a permis d'envisager plus facilement et à moindre coût, un essai clinique chez les patients DM1 compte tenu du fait que ses effets chez l'homme étaient bien connus. Ainsi, l'utilisation d'un médicament pour une autre indication, appelée « repositionnement », est un procédé qui s'est largement répandu ces dernières années. Des bases de données existent désormais pour identifier un composé régulant un gène cible. C'est le cas par exemple, de la « connectivity map » permettant d'établir des liens entre des molécules, des processus physiologiques et des maladies (Lamb et al., 2006) (Figure 21).

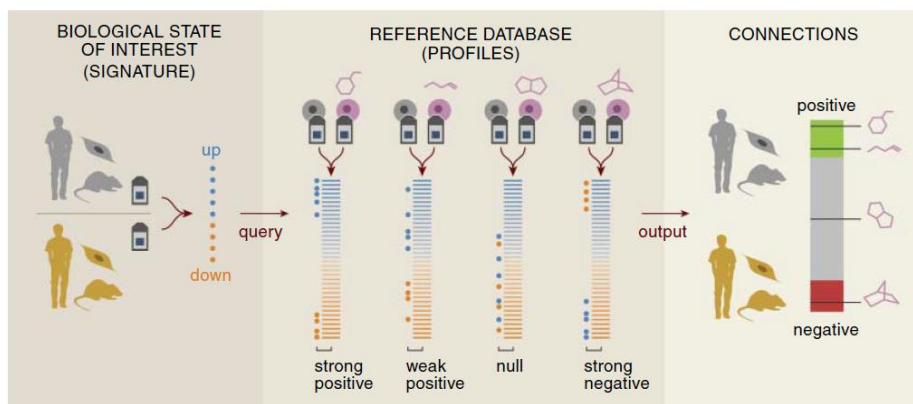


Figure 21. Concept de la carte de connectivité. Les profils transcriptomiques de patients et de modèles murins de maladies monogéniques sont comparés à ceux de cellules traitées par des composés chimiques. La modulation dans un sens thérapeutique de gènes communément partagés par ces deux groupes contribuera à l'identification *in silico* de nouveaux traitements (Lamb et al., 2006).

Nous avons donc entrepris la constitution d'une base moléculaire de régulations géniques obtenues par RNAseq dans des progéniteurs du mésoderme (MPCs) dérivés de cellules hES saines en réponse à 50 médicaments. Les molécules ont été sélectionnées sur une indication permettant d'envisager un repositionnement et une structure chimique variée. Grâce à l'obtention d'un financement « France Génomique », le séquençage de cette collection de 150 échantillons a été réalisé par le Centre National de Recherche en Génétique Humaine (CNRGH, Evry). Nous avons développé une collaboration avec le Dr Didier Auboeuf (ENS, Lyon) pour l'analyse bio-informatique des variations d'expression génique et d'épissage alternatif. L'analyse des séquençages montre que ces différents médicaments régulent un

faible nombre de gènes et d'épissages ce qui est cohérent étant donné que leur processus de développement cible les molécules les plus spécifiques. Par cette approche, nous avons identifié 4 gènes impliqués dans des maladies rares (la sclérose amyotrophique latérale (SLA), une myopathie myofibrillaire et deux leukodystrophies) pouvant être régulés par le repositionnement de médicament (Table 7). Pour la suite du projet, nous nous sommes intéressés au gène *SEQUESTOSOME-1* (*SQSTM1*) codant la protéine SQSTM1/p62 car des mutations de ce gène sont à l'origine de formes de SLA pour lesquelles aucune stratégie thérapeutique n'existe.

Gene	Disease		OMIM number	Transmission	Molecular Genetic	Incidence	Drug Log2FC>1.45	Regulation
PLP1	Pelizeus-Merzbacher Disease	PMD	312080	Recessive X linked	Duplication	1/ 7663	Manumycin Prazosin Chloroquine	Down
LMNB1	Adult-onset Demyelinating Leukodystrophy	ADLD	169500	Autosomal dominant	Duplication	< 1 / 1 000 000	Manumycin Pentamidine Rosuvastatin	
SQSTM1	Frontotemporal dementia / Amyotrophic Lateral Sclerosis 3	FTDALS3	616437	Autosomal dominant	Loss of function	1-9 / 100 000	Amoxapine Prazosin Cyproheptadine	UP
DES	Myofibrillar myopathy-1	MFM1	601419	Autosomal dominant	Loss of function	< 1 / 1 000 000	Rosuvastatin	UP

Table 7. Liste de quatre gènes causaux de maladies monogéniques pour lesquels un potentiel composé thérapeutique a été identifié dans le crible moléculaire par RNA-seq.

La Sclérose Amyotrophique Latérale (SLA)

La sclérose latérale amyotrophique (SLA), ou maladie de Charcot, est une pathologie neurodégénérative rare qui se traduit par la destruction des neurones moteurs en charge de la commande des muscles. La SLA toucherait 3 /100 000 personne dans le monde, pour un âge moyen de survenue d'environ 60 ans. Chez les personnes âgées, cette maladie affecterait 1 personne sur 400 après 80 ans (Broussalis et al., 2018). Les malades décèdent en général 3 à 5 ans après le diagnostic. Selon un document de la Haute Autorité de la Santé, le diagnostic de la pathologie est « essentiellement clinique » : les symptômes peuvent permettre au praticien de reconnaître la maladie. Malgré tout, ces signes étant parfois trompeurs et peu spécifiques, le diagnostic de la maladie peut être difficile. Pour confirmer le diagnostic, le médecin peut avoir recours à un électroneuromyogramme (ENMG).

La SLA est une pathologie neurodégénérative grave qui se caractérise par une perte progressive des motoneurons du cortex, du tronc cérébral et de la moelle épinière. Les muscles concernés sont impliqués dans la motricité volontaire : muscles des membres, mais aussi de la parole, de la déglutition et même les muscles respiratoires. La SLA peut se présenter sous deux formes : bulbaire et spinale. Elles peuvent parfois apparaître d'emblée de manière simultanée. Dans la majorité des cas, ces deux formes finissent par se rejoindre au cours du temps pour ne faire qu'une seule entité. En cas de forme bulbaire, la zone de la bouche est atteinte en premier lieu. Cela provoque des troubles d'articulation et de déglutition. Dans le cas de la forme spinale, ce sont les muscles des membres qui sont prioritairement touchés. Les symptômes se caractérisent alors par une faiblesse d'un membre qui s'étend par la suite à d'autres membres. Suivent ensuite des phénomènes de spasticité, une atrophie musculaire, des difficultés à respirer, une perte de poids, des troubles du comportement. A terme, l'insuffisance respiratoire devient très sévère et représente un des principaux facteurs de mortalité de la maladie.

La SLA est étroitement liée à la démence fronto-temporale (DFT). Comme la SLA, FTD est une maladie neurodégénérative caractérisée par une dégénérescence des lobes frontaux et temporaux du cerveau, entraînant des troubles du comportement, de la personnalité et du langage. Il est estimé que près de 50% des patients SLA présentent des signes de dysfonctionnement comportemental et / ou de déficience cognitive, ressemblant à la démence, et jusqu'à 15% des patients atteints de SLA atteignent les critères de diagnostic des patients atteints de FTD (appelés patients ALS-FTD ou FTD-ALS). En raison de ce chevauchement clinique, génétique et pathologique, la SLA et la DFT sont désormais considérées comme les partenaires d'un continuum de la maladie, appelé le Spectre ALS-FTD, plutôt que deux entités distinctes de la maladie (Ling, Polymenidou, & Cleveland, 2013).

Il n'existe pour le moment pas de traitement curatif de la pathologie, la prise en charge étant principalement symptomatique. Le seul médicament dit « de fond » pour cette indication est le riluzole, administré en vue d'augmenter l'espérance de vie des patients et de retarder le moment où la ventilation artificielle devient indispensable (modifié de : <https://www.frm.org/recherches-maladies-rares/sla/tout-savoir-sur-la-sclerose-laterale-amyotrophique>).

Les causes de la SLA sont mal connues avec ~90% de cas sporadiques (sALS) alors que seulement ~10% correspondent à des cas familiaux (fALS) (Turner et al., 2017). Par des analyses de liaison et plus tard le développement du séquençage combiné à des études « GWAS » (Genome-Wide Association Study), plusieurs gènes causaux de la maladie ont été identifiés. Des études réalisées dans différents pays ont contribué à définir une trentaine de gènes dont la mutation est associée à la SLA, avec une représentation plus fréquente de certains d'entre eux. Ainsi, le premier gène identifié, SOD1, présente une prévalence de 15% des cas familiaux (Rosen et al., 1993). En 2011, de la découverte d'une grande expansion de répétition hexanucléotidique (GGGGCC) dans le premier intron du gène C9ORF72, associe ce gène muté à 46% des cas de SLA familiale et 21,1% des cas de SLA sporadiques dans la population finlandaise. Les auteurs de cette étude estiment que cette mutation, associée à celle du gène SOD1, représente 87% de la SLA familiale en Finlande. (GWAS) (Laaksovirta et al., 2010). Depuis, plusieurs autres gènes ont complété cette liste de gènes candidats mais avec une plus faible contribution (Volk, Weishaupt, Andersen, Ludolph, & Kubisch, 2018) (Table 8). Les mutations dans quatre gènes (C9ORF72, SOD1, TDP-43 et FUS/TLS) représentent plus de 50% des cas de SLA. Parmi ces gènes, plusieurs contribuent à l'étiologie de la SLA et la DFT tels que l'extension de répétition C9orf72 et les mutations des gènes TBK1, VCP et TPD-43. En revanche, d'autres gènes sont spécifiquement associés à une seule des maladies, comme SOD1 pour l'ALS ou MAPT et GRN pour la DFT. De plus, bien que les mutations TPD-43 soient rares dans la SLA et la DFT (<1%), l'agrégation de cette protéine dans les régions cérébrales et les motoneurones se retrouvent dans la majorité des cas de SLA (jusqu'à 97%) et chez les patients DFT (jusqu'à 50%) (Ling et al., 2013).

Gene	Chromosomal locus	Inheritance	Prevalence familial ALS/sporadic ALS (in percentage)
<i>C9orf72</i>	9p21.2	AD, DN	35/5
<i>SOD1</i>	21q22.1	AD, AR, DN	15/2
<i>FUS</i>	16p11.2	AD, DN	4/1
<i>TARDBP/TDP43</i>	1p36.22	AD	4/1
<i>CCNF</i>	16p13.3	AD	4/2
<i>NEK1</i>	4q33	AD	2/2
<i>TBK1</i>	12q14.2	AD, DN	1/1
<i>VCP</i>	9p13.3	AD, DN	1/1
<i>SQSTM1</i>	5q35.3	AD	1/<1
<i>MATR3</i>	5q31.2	AD	<1/<1
<i>CHCHD10</i>	22q11.23	AD	<1/<1
<i>PFN1</i>	17p13.2	AD	<1/<1
<i>TUBB4A</i>	2q35	AD	<1/<1
<i>UBQLN2</i>	Xp11.21	XL	<1/<1
<i>OPTN</i>	10p13	AD	<1/<1
<i>KIF5A</i>	12q13.3	AD	NA/NA
<i>HNRNPA1</i>	12q13.13	AD, DN	NA/NA
<i>HNRNPA2B1</i>	7p15.2	AD	NA/NA
<i>CHMP2B</i>	3p11.2	AD	NA/NA
<i>SETX</i>	9q34.13	AD	NA/NA
<i>SPG11</i>	15q21.1	AR	NA/NA
<i>ALS2</i>	2q33.1	AR	NA/NA

AD autosomal-dominant, *AR* autosomal-recessive, *DN* de novo, *XL* X-linked, *NA* not available

Table 8. Liste des gènes dont la mutation est associée à la sclérose latérale amyotrophique (SLA) (Volk et al., 2018).

Compte tenu des différents gènes pouvant à être l'origine de la maladie, plusieurs mécanismes cellulaires différents conduisent à la mort des motoneurons dans la SLA (Le Gall et al., 2020). Ces différents processus cellulaires, représentés sur la Figure 22, incluent : **(1)** Des altérations du transport nucléocytoplasmique des molécules d'ARN et des protéines de liaison à l'ARN. **(2)** Une modification du métabolisme de l'ARN : plusieurs protéines importantes de liaison à l'ARN sont mal localisées dans la SLA, avec une accumulation dans le cytosol ou une déplétion nucléaire. L'épuisement nucléaire provoque des défauts de transcription et d'épissage. Dans le cytoplasme, certaines protéines de liaison à l'ARN s'accumulent dans des granules de stress (TDP-43, FUS, ATXN2, hnRNP A1 / A2). **(3)** Un défaut de protéostasie avec une accumulation de protéines agrégées (TDP-43, FUS, SOD1, RMR). Une surcharge du système du protéasome et une autophagie réduite peuvent contribuer et / ou provoquer cette accumulation. **(4)** Une réparation de l'ADN altérée : deux gènes de la SLA récemment identifiés agissent conjointement sur la réparation de l'ADN, suggérant qu'une altération de la réparation de l'ADN pourrait également contribuer à la pathogénèse de la SLA. **(5)** Un dysfonctionnement mitochondrial et un stress oxydatif : plusieurs protéines (SOD1, TDP-43, C9orf72, FUS) peuvent perturber le fonctionnement des mitochondries. Il en résulte une formation accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui s'accumulent dans la cellule et altèrent les molécules d'ADN, d'ARN ainsi que

les protéines. Un défaut d'activation de la voie NRF2-ARE a également été décrite dans les motoneurones mutés SOD1, limitant la mise en place d'une réponse anti-oxydante. **(6)** Un dysfonctionnement et une dégénérescence des oligodendrocytes, entraînant à une prise en charge réduite des motoneurones. **(7)** Une neuro-inflammation : les astrocytes et la microglie sécrètent moins de facteurs neuro-protecteurs et plus de facteurs toxiques.

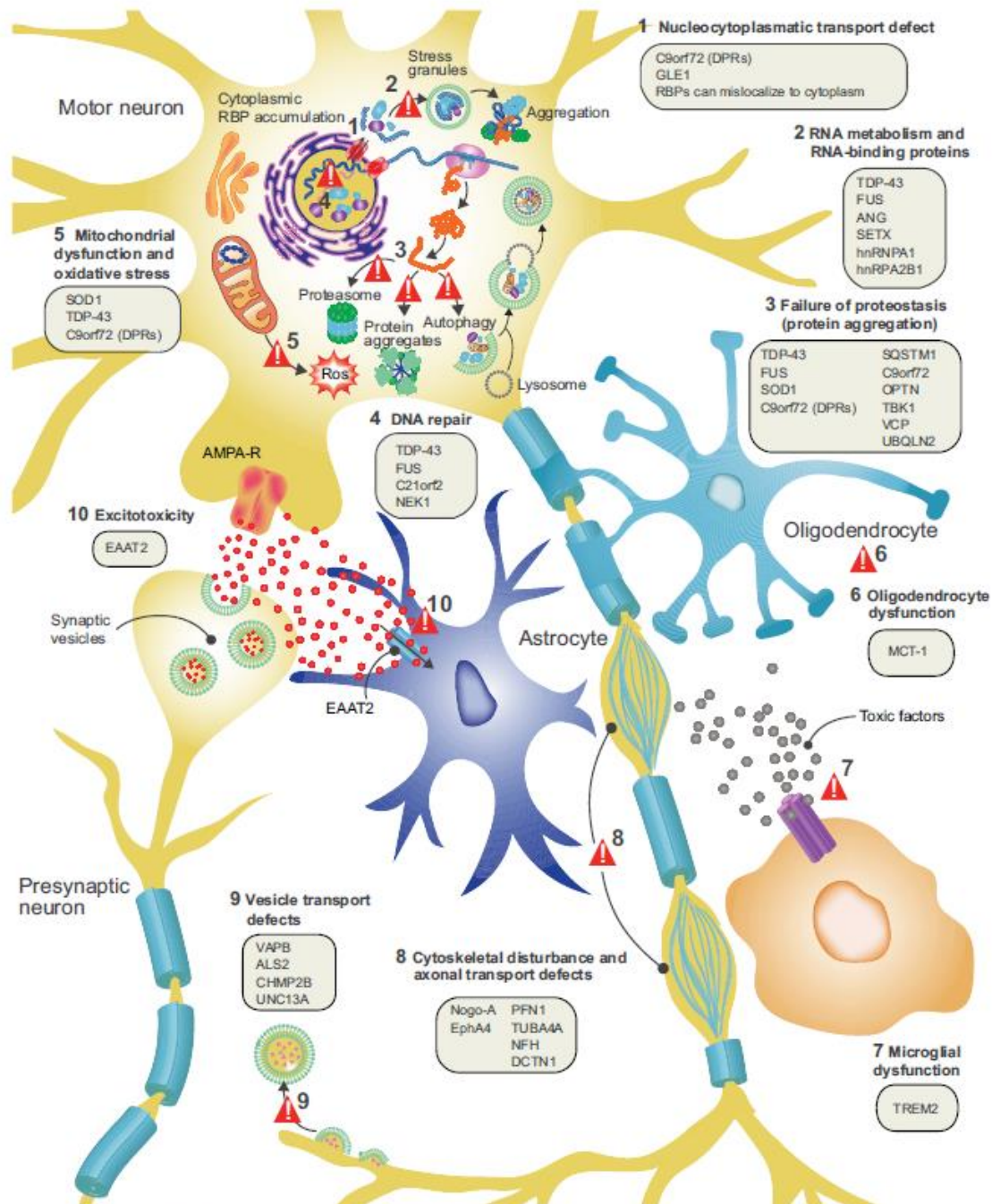


Fig. 1. See next page for legend.

Figure 22. Mécanismes impliqués dans la pathogénèse de la SLA (Van Damme, Robberecht, & Van Den Bosch, 2017).

(8) Un transport axonal défectueux : plusieurs mutations liées à la SLA provoquent une désorganisation des protéines du cytosquelette et perturbent le transport axonal. **(9)** Un transport vésiculaire défectueux : plusieurs protéines mutées dans la SLA (VABP, ALS2, CHMP2B, UNC13A) sont impliquées dans le transport vésiculaire, suggérant l'implication de cette fonction cellulaire dans la pathogénèse de la SLA. **(10)** Une excitotoxicité : La perte du transporteur astroglial glutamate EAAT2, par exemple, provoque une accumulation de glutamate extracellulaire, ce qui provoque une stimulation excessive des récepteurs du glutamate (par exemple, les récepteurs AMPA) et un afflux excessif de calcium dans les motoneurones.

Parmi ces différents mécanismes pathogéniques, je me focaliserai sur les défauts d'autophagie et de protéostasie pour lesquelles la modulation de la protéine SQSTM1/p63 pourrait représenter un intérêt thérapeutique.

Fonctions cellulaires de la protéine SQSTM1/p62

Le gène *SQSTM1* code la protéine d'échafaudage SQSTM1/p62 qui joue différents rôles dans la cellule : SQSTM1 est un acteur important de l'autophagie sélective mais c'est également un régulateur de NF- κ B, de la réponse anti-oxidative et de l'apoptose.

Dans le contexte de l'autophagie, SQSTM1 est considérée comme une protéine cargo, dont le rôle est de capter les protéines devant être éliminées pour les recruter au niveau des auto-phagosomes. Il est considéré comme un récepteur autophagique au même titre que l'Optineurine (OPTN) et NBR1. Grâce à son domaine UBA, SQSTM1 capte les protéines ubiquitinylées et interagit, via son domaine LIR, avec la protéine LC3B-II qui tapisse la surface de l'auto-phagosome. L'ensemble sera dégradé par la voie de l'autophagie sélective lors de la fusion des auto-phagosomes avec les lysosomes (Matsumoto, Wada, Okuno, Kurosawa, & Nukina, 2011) (Figure 23). SQSTM1 interagit également avec d'autres protéines de la voie de l'autophagie pour former des complexes multimériques incluant le récepteur autophagique NBR1 grâce à son domaine PB1 et l'optineurine ubiquitinylée via son domaine UBA (Z. Liu et al., 2014). L'autophagie sélective est importante pour la déplétion d'organelles endommagées ou des protéines mal conformées qui pourraient s'accumuler dans les neurones post-mitotiques. En accord avec cette hypothèse, des souris *SQSTM1*^{-/-} présentent des symptômes de neuro-dégénération, une hyper-phosphorylation de Tau et des défauts de mémoire (Ramesh Babu et al., 2008). L'activité de SQSTM1 dans l'autophagie est régulée par la TANK-Binding Kinase 1 (TBK1) qui phosphoryle SQSTM1/p62 sur le résidu Serine-403 de son domaine UBA. Cette modification active la fixation de SQSTM1/p62 à l'ubiquitine et augmente l'activité autophagique de la cellule (Matsumoto, Shimogori, Hattori, & Nukina, 2015; Matsumoto et al., 2011).

Parallèlement, SQSTM1 assure une fonction de régulation de la réponse au stress oxydatif. En condition normale, le facteur de transcription NRF2 est constitutivement dégradé par la voie ubiquitine/protéasome via son interaction avec Keap1, un adaptateur de l'ubiquitine ligase. En présence de réactifs oxygénés ou d'oxyde nitreux, Keap1 est modifié sur un résidu cystéine et perd son affinité pour NRF2 dont l'expression se stabilise dans la cellule. En conséquence, NRF2 transite jusqu'au noyau où il va induire la transcription de nombreux gènes cyto-protecteurs. Dans un modèle de souris de déficiente en autophagie, Komastu et al ont montré que SQSTM1 n'est plus consommé par le flux autophagique et s'accumule dans le cytoplasme. Il déplace alors l'interaction entre Keap1 et

NRF2, stabilise ce dernier qui migre alors au noyau pour induire la transcription de diverses enzymes cyto-protectrices (Komatsu et al., 2010).

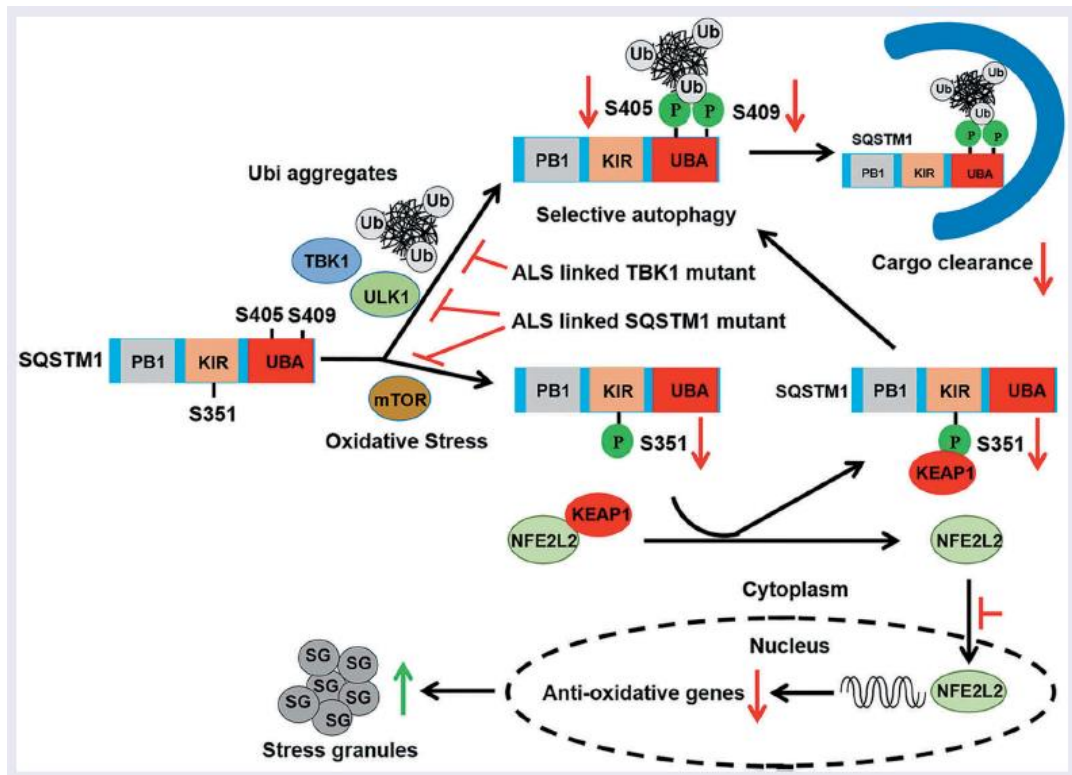


Figure 23. Fonctions cellulaires de SQSTM1 altérées par des mutations associées à la SLA (Deng et al., 2020).

Enfin, SQSTM1/p62 interagit directement avec TRAF6 un régulateur clé de la cascade induite par RANKL dans les ostéoblastes et le NGF dans les neurones. Une stimulation par ces cytokines induit la formation d'un complexe ternaire constitué de SQSTM1/TRAF6 et d'une isoforme atypique de PKC ($PKC\zeta/\lambda$). Ce complexe phosphoryle I κ B, conduisant à sa dégradation et la libération de NF- κ B qui devient actif et transcrit des gènes anti-apoptotiques (Wooten et al., 2005). Dans les neurones, l'interaction entre SQSTM1 et TRAF6 participe à la voie de transduction induite par le NGF, importante pour la survie et la différenciation neuronale (Wooten et al., 2005).

Mutations de SQSTM1 dans l'ALS

Bien qu'elles ne représentent que 1% des cas de SLA familiales et moins de 1% des cas sporadiques, de nombreuses mutations de *SQSTM1* ont été répertoriées dans le monde (Fecto et al., 2011; Hirano et al., 2013; Le Ber et al., 2013; Teyssou et al., 2013) (Table 9). Des mutations dans ce gène apparaissent d'ailleurs également en association avec des mutations de C9orf72 (Nguyen, Van Broeckhoven, & van der Zee, 2018). Les mutations de *SQSTM1* sont également associées à la démence Fronto-temporale (3% des cas) et représentent la majorité des cas de patients atteint de la maladie de Paget (OMIM# 167250) qui induit des déformations et une fragilité osseuse causées par une résorption osseuse exacerbée impliquant les ostéoclastes (Ralston & Albagha, 2014). Contrairement aux mutations associées à la maladie de Paget, qui affectent principalement le domaine UBA, les mutations trouvées chez les patients ALS-FTLD couvrent plusieurs régions essentielles pour la fonction SQSTM1/p62 (Figure 24).

Table 1 – SQSTM1 mutation spectrum in patients with ALS and FTLD.							
Mutation	Exon	Change (bp)	p62 Domain	ALS patients	SALS patients	FTLD patients	Controls
A33V	1	c.98C>T	PB1	1/498 ^a	2/765 ^a	1/358 ^e	6/4957 ^{a,d}
A53T	1	c.157G>A	PB1	–	1/765 ^d	–	0/4550 ^{a-1}
M87V	2	c.259A>G	PB1	–	1/765 ^d	–	0/4660 ^{a-1}
V90M	2	c.268G>A	PB1	–	1/765 ^d	–	0/4489 ^{a-1}
I99L	2	c.295A>C	PB1	–	1/765 ^b	–	0/4650 ^{a-1}
K102E	3	c.304A>G	C-terminal to PB1	–	1/765 ^d	–	0/4660 ^{a-1}
R110C	3	c.328C>T	–	–	–	1/358 ^e	0/4652 ^{a-1}
V153I	3	c.457G>A	ZZ	–	3/765 ^{a,c}	–	9/5213 ^{a,d}
E155K	3	c.463G>A	ZZ	1/498 ^f	–	–	0/4300 ¹
P228L	5	c.683C>T	TBS	–	1/765 ^a	–	4/5024 ^{a-1}
V234V	5	c.702G>A	TBS	1/498 ^a	–	–	0/5024 ^{a-1}
K238E	5	c.712A>G	TBS	2/498 ^a	2/765 ^{a,b}	1/358 ^e	35/5521 ^{a,b,g,h}
K238del	5	c.714–716delGAA	TBS	–	1/765 ^a	–	0/724 ^a
V259L	6	c.775G>C	–	–	–	1/358 ^b	0/4445 ^{a-1}
H261H	6	c.783C>T	Close to PEST1	–	1/765 ^a	–	1/5038 ^{a-1}
E274D	6	c.822G>C	PEST 1	14/498 ^{a,f}	23/765 ^{a,b}	14/358 ^{b,e}	288/6200 ^{a,b,g,i,j}
P296P	6	c.888G>T	Close to PEST1	1/498 ^f	–	–	1/4965 ^l
R312G	6	c.1029A>G ^k	–	–	–	6/358 ^e	0/4652 ^{a-1}
S318P	6	c.952T>C	–	1/498 ^a	–	–	0/5038 ^{a-1}
S318S	6	c.954C>T	–	13/498 ^{a,f}	13/765 ^a	4/358 ^e	248/6050 ^{a,d,e,i,j}
E319K	6	c.955G>A	–	1/498 ^a	–	1/358 ^b	2/5841 ^{a,b,j}
R321C	6	c.961C>T	–	–	1/765 ^a	–	5/5693 ^{a-1,j}
R321H	6	c.962G>A	–	–	–	1/358 ^e	0/4652 ^{a-1}
D337E	7	c.1011C>G	LIR	–	1/765 ^b	–	0/4650 ^{a-1}
L341V	7	c.1021C>G	LIR	–	1/765 ^b	–	0/4650 ^{a-1}
K344E	7	c.1032A>G	Close to LIR/KIR	–	–	1/358 ^b	0/4445 ^{a-1}
V346V	7	c.1038G>A	KIR	1/498 ^f	–	–	4/4300 ¹
P348L	7	c.1044C>T	KIR	–	1/765 ^b	–	0/4445 ^{a-1}
S370P	7	c.1108T>C	PEST 2	1/498 ^a	–	–	0/5033 ^{a-1}
<u>A381V</u>	7	c.1142C>T	close to UBA	–	–	1/358 ^e	0/4839 ^{a,j}
<u>P387L</u>	7	c.1160C>T	Close to UBA	–	–	1/358 ^e	0/4839 ^{a,j}
<u>A390X</u>	7	c.1165+1G>A	Intronic	–	1/765 ^d	–	–
<u>P392L</u>	8	c.1175C>T	UBA	5/524 ^{a,d,f}	1/851 ^a	1/358 ^e	18/6014 ^{a,c,d,g,i}
<u>G411S</u>	8	c.1231G>A	UBA	1/498 ^a	–	–	0/5037 ^{a-1}
<u>G425R</u>	8	c.1273G>A	UBA	–	1/765 ^b	–	0/5037 ^{a-1}
P438L	8	c.1313C>T	C-terminal region	–	1/765 ^b	–	1/4805 ^{a,d,i}
P439L	8	c.1316C>T	C-terminal region	–	1/765 ^c	–	3/5287 ^{a-c,i}

Summary of SQSTM1 mutations found in eight studies on patients with ALS/FTLD. All mutations except the intronic variant A390X are located in coding regions of the SQSTM1 gene. Variants G61G, S328S, P348P, and A117V were reported in the supplementary information in [24] as rare variants and are not included in this table. (e) [63] is a case report whereas the other papers examined larger cohort of patients with ALS/FTLD. Those mutations which are underlined have previously also been reported in patients with PDB [59]. Note that these studies of ALS/FTLD patients have also uncovered other non-UBA domain variants in patients with co-existing PDB (R110C) or family members presenting with PDB but not ALS (E155K) [39,40].

Table 9. Différentes mutations de SQSTM1 identifiées chez les patients atteints de SLA et DFT (Rea, Majcher, Searle, & Layfield, 2014).

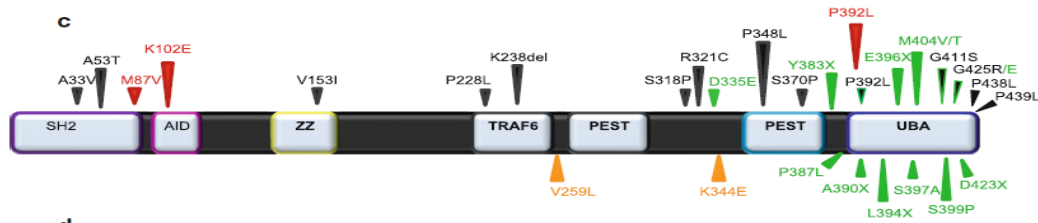


Figure 24. Représentation des domaines de la protéine SQSTM1 et des mutations associées à la maladie Paget (en vert), la SLA (en noir) et la DFL (en orange) (Teyssou et al., 2013).

Les patients porteurs de mutation de SQSTM1/p62 associés à la SLA présentent des inclusions de p62 dans les motoneurones tandis que ces inclusions sont retrouvées dans l'hippocampe et le cortex cérébral dans le cas de patients FTLD (Arai et al., 2003; Teyssou et al., 2013), laissant supposer que l'accumulation de SQSTM1/p62 résulterait d'un défaut d'autophagie. Des études fonctionnelles réalisées sur des fibroblastes de patients ou des cellules exprimant par transfection ces mutants de SQSTM1 ont contribué à mieux cerner leur impact fonctionnel dans la cellule. Ainsi, Goode et al, ont montré pour la première fois en 2016, l'effet d'une mutation localisée dans le domaine LIR (LC3-interaction region) de SQSTM1, nécessaire à son interaction avec la protéine LC3B. Ce variant L341V réduit de trois fois l'affinité de la liaison entre LC3B et SQSTM1/p62, mesurée par RMN. En conséquence, les protéines SQSTM1 mutées sont moins facilement incorporées dans les autophagosomes, altérant la qualité du flux autophagique (Goode et al., 2016). La même équipe s'est penchée sur des mutations situées dans le domaines KIR de SQSTM1, responsable de son interaction

avec Keap1. Comme attendu, les auteurs montrent que seules les mutations localisées dans ce domaine affectent le lien entre SQSTM1 et Keap1 et réduisent l'activité transcriptionnelle de NRF2 (Goode, 2016). D'autres équipes ont confirmé le lien entre une mutation et de SQSTM1 et l'activité de NRF2 : Bartolome et al ont étudié le rôle de SQSTM1/p62 dans le métabolisme énergétique dans des fibroblastes de patients FTD porteurs deux mutations de SQSTM1 et dans une lignée cellulaire de neuroblastome dopaminergique (SH-SY5Y) humaine déplétée en SQSTM1/p62. Ils ont observé que l'absence de la protéine ou sa mutation inhibe l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale en raison d'une insuffisance en NADH pour la chaîne de transport d'électrons. Cette inhibition du complexe I affaiblit le potentiel de membrane mitochondriale et provoque l'augmentation intracellulaire de réactifs oxygénés. Ces déséquilibres sont corrigés par l'activation pharmacologique du facteur de transcription Nrf2 confirmant l'importance de SQSTM1 dans le contrôle du stress oxydatif (Bartolome et al., 2017). Récemment, Deng et al ont pu faire le lien entre les conséquences fonctionnelles de la mutation de SQSTM1 et différents biomarqueurs de la SLA. Les auteurs confirment que les mutations de TBK1 et SQSTM1, associées à la SLA et FTD, perturbent l'autophagie sélective en transfectant des lignées avec des vecteurs permettant l'expression de cinq protéines SQSTM1 mutées dans le domaine UBA et le domaine KIR. En plus de ce mécanisme, ils révèlent que la mutation G427R, présente dans le domaine KIR, abolit la phosphorylation de SQSTM1 en Ser351 et entraîne la perte de son interaction avec KEAP1. En conséquence, Nrf2 est dégradée et n'assure plus la transcription des gènes de réponse au stress oxydatif. Ce type de stress est connu pour induire l'agrégation cytoplasmique de la protéine de fixation à l'ARN TDP-43, qui représente 4% des cas de fSLA. Dans les cellules transfectées, le stress induit par l'expression de SQSTM1-G427R est associée à l'apparition de granules de stress contenant TDP-43. Finalement, l'expression de ce même mutant dans des neurones corticaux primaires de souris réduit de la complexité dendritique et altère la signalisation de NFE2L2/Nrf2 (Deng et al., 2020).

Dans l'ensemble, ces expériences montrent que le rôle de SQSTM1 dans l'autophagie sélective inclue au-delà de sa fonction bien connue de recyclages d'organelles et des protéines, une part importante dans la réponse au stress oxydatif des cellules deux processus qui contribuent à la survie des cellules.

In vivo, l'inactivation génique de *Sqstm1* chez la souris entraîne l'apparition d'agrégats de protéines ubiquitinylées dans les hépatocytes et les neurones (Komatsu et al., 2007; Wooten et al., 2008). Dans cette étude, les inclusions sont associées à un défaut d'autophagie dans les hépatocytes uniquement suggérant que l'importance de SQSTM1 pour l'autophagie peut varier selon les tissus (Komatsu et al., 2007). Les atteintes neuronales des souris SQSTM1^{-/-} ont été depuis confirmé par d'autres équipes décrivant dans le cerveau une agrégation de la protéine Tau hyperphosphorylée associée à une hyperactivation de la GSK3b et de la JUN kinase (Ramesh Babu et al., 2008). Chez ces souris, une augmentation de l'anxiété, une dépression et une perte de la mémoire des souris ont été observées (Ramesh Babu et al., 2008). Ces symptômes pourraient être attribués au rôle de *SQSTM1* dans la gestion du stress oxydatif. En effet, Kwon et al ont rapporté un effet de la perte d'expression de SQSTM1 dans le cerveau et le foie où l'activité de Nrf2 est fortement réduite. Il en résulte une diminution de l'expression de la NAD(P)H déshydrogénase NQO1 et un défaut de maintien de l'intégrité du potentiel membranaire mitochondrial (Kwon et al., 2012). Ces résultats sont en adéquations avec l'altération du potentiel membranaire des mitochondries, observée dans les fibroblastes de patients mutés SQSTM1 par Bartolomé (Bartolome et al., 2017). Aucune atteinte du système neuro-musculaire n'a cependant pas été détecté dans les modèles de perte d'expression de *SQSTM1* à la différence de souris SOD1-H46R qui reproduisent les différentes atteintes de la SLA. En

revanche, le croisement de ces souris avec des souris *SQSTM1*^{-/-} exacerbe les symptômes de la maladie dans les progénies (*SOD1* H46R ; *SQSTM1*^{-/-}) et notamment les atteintes motrices (Hadano et al., 2016). L'analyse en histopathologique confirme que la perte de *SQSTM1* résulte en une dégénérescence prématurée des motoneurones dans la moelle épinière (Hadano et al., 2016). Chez le Zebrafish par contre, la perte d'expression de *SQSTM1* suffit à la dégénérescence des motoneurones et à l'apparition de défaut locomoteurs mesurés sur la nage des poissons (Lattante et al., 2015).

Ainsi, plusieurs mutations de *SQSTM1* sont associées à une perte de l'efficacité de l'autophagie sélective et/ou de la réponse au stress oxydatif laissant supposer que la complémentation cellulaire en protéine *SQSTM1* fonctionnelle pourrait apparaître comme une stratégie thérapeutique. L'augmentation de l'expression de *SQSTM1* pourrait également présenter un bénéfice pour des cellules porteuses de mutations situées d'autres gènes associés à la SLA. Brady et al ont montré que les agrégats intracellulaires de TDP-43 sont co-localisés avec *SQSTM1*/p62. Afin de comprendre le rôle de cette interaction, ils ont procédé à la surexpression de *SQSTM1* et ont observé que celle-ci provoque la dégradation des agrégats de TDP-43 via la voie de l'autophagie et du protéasome (Brady, Meng, Zheng, Mao, & Hu, 2011). En utilisant différents mutants de TBK1, Foster et al ont démontré que la phosphorylation de *SQSTM1* médiée par TBK1, est nécessaire pour la dégradation de TDP-43 via l'autophagie (Foster et al., 2020). Enfin, Deng et al ont observé que des mutations de *SQSTM1* se traduisent par l'apparition intracellulaire d'agrégats de TDP-43 (Deng et al., 2020). Ces différentes expériences suggèrent que l'augmentation pharmacologique de *SQSTM1* pourrait réduire le stress cellulaire et débarrasser les cellules des agrégats de TDP-43. Une autre protéine mutante associée à la SLA pouvant être éliminée par *SQSTM1* est *SOD1*. Dans des cellules exprimant le mutant *SOD1* A4V, *SQSTM1* joue un rôle d'adaptateur qui capte les protéines mutantes *SOD1* et les achemine vers les autophagosome où ils seront dégradés indépendamment de toute ubiquitinylation (Gal et al., 2009). Ces résultats sont à mettre en perspective avec ceux obtenus in vivo dans des souris *SOD1* H46R présentés plus haut suggérant que *SQSTM1* contribue à contre carter les effets de la mutation touchant *SOD1*. Cependant, une étude réalisée par la même équipe, dans laquelle les auteurs testent un potentiel effet thérapeutique de la surexpression de *SQSTM1* dans les souris *SOD1* H46R, révèle contre toute attente une aggravation des symptômes des souris (S. Mitsui et al., 2018). Cet effet n'était pas attendu car une approche similaire avait démontré un effet bénéfique sur de souris atteinte d'atrophie musculaire bulbaire et spinale (*SBMA*, *Spinal and bulbar muscular atrophy*) causée par des expansions de trinuécléotides (Doi et al., 2013). Ces études montrent qu'il est difficile d'anticiper l'effet thérapeutique de la surexpression de *SQSTM1* qui doit être testée au cas par cas en fonction des dérèglements induits par les mutations sur l'autophagie, le stress oxydatif et le protéasome. A travers la lecture de ces différentes études, on observe également un manque de modèles cellulaires humains dans lesquels les mutations seraient exprimées de façon physiologiques. Les IPS dérivées de fibroblastes de patients ou les lignées de CSpH modifiées par édition géniques devraient contribuer à accélérer la compréhension de la pathogénèse de la SLA.

Exploration du potentiel de repositionnement de composés thérapeutiques pour les maladies rares

Compte tenu du faible nombre de patients atteints de mutations dans le gène *SQSTM1*, il n'existe pas de développement thérapeutique spécifique pour ces patients. Dans ce contexte, le repositionnement de médicament pourrait représenter une opportunité d'accéder rapidement à un traitement. A l'issue

de notre crible, nous avons souhaité tester la capacité du Prazosin à réguler l'expression de *SQSTM1* et compenser sa perte de fonction dans différents contextes cellulaires. Le chlorhydrate de prazosine (Prazosin) est un médicament développé dans les années 1970 et commercialisé par Pfizer sous le nom de Minipress. C'est un antagoniste sélectif des récepteurs alpha-1 adrénergiques qui réduit la résistance périphérique et détend les muscles vasculaires lisses par un mécanisme inconnu. Il est utilisé dans le traitement de l'insuffisance cardiaque, de l'hypertension, du phéochromocytome, du syndrome de Raynaud, de l'hypertrophie prostatique et de la rétention urinaire.

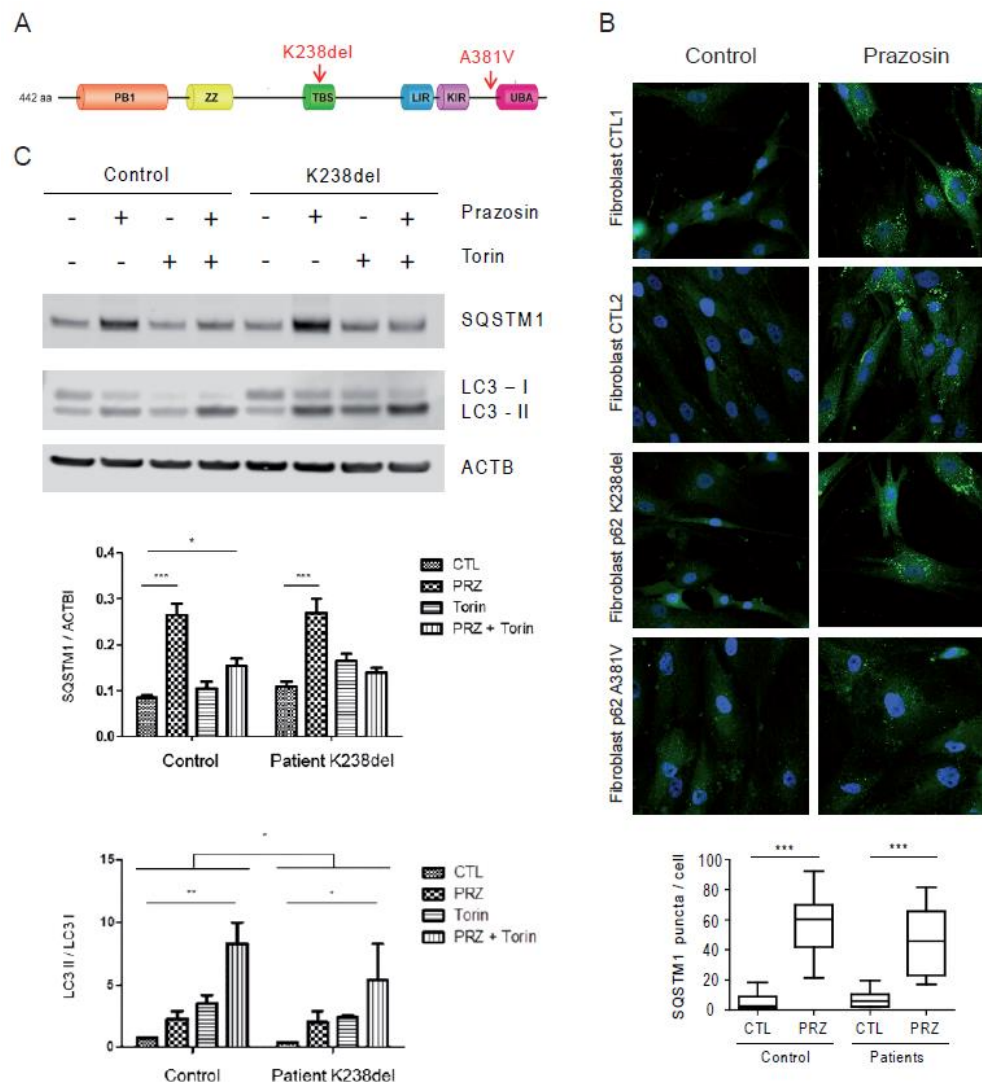


Figure 25. Caractérisation de l'effet du traitement au Prazosin sur des fibroblastes de patients atteints de DFT et porteurs de mutation du gène *SQSTM1*. (A) Position des mutations du gène *SQSTM1* présentes dans les fibroblastes de patients. (B) Effet du Prazosin sur l'oligomérisation de *SQSTM1* dans des fibroblastes contrôles ou mutés. (C) Impact du Prazosin sur l'expression de *SQSTM1* et la modification de la protéine LC3B dans les fibroblastes mutés K238del.

Après avoir validé dans des MPCs sains la régulation du transcrite *SQSTM1* en réponse au Prazosin, nous avons analysé les effets de la molécule dans des fibroblastes de patients porteurs des mutations **K238del** et **A381V**, obtenus en collaboration avec le Dr Andrei Abramov (UCL Institute of Neurology Queen Square, London). Ces mutations sont localisées dans le domaine TBS (K238del) et en amont du domaine UBA (A381V) (Figure 25).

Dans ces cellules, nous avons observé que le Prazosin induit une l'expression de SQSTM1 qui s'oligomérisent sous la forme de « bodies » formés au point de naissance des auto-phagosomes (Figure 25). Cet effet est moins efficace dans les fibroblastes **A381V**, affectant le domaine UBA, en comparaison avec les fibroblastes contrôles et **K238del**. Dans les fibroblastes K238del que nous avons pu amplifier, nous avons observé par Western blot que l'augmentation de SQSTM1 en réponse au Prazosin induit la modification de LC3B-I en LC3B-II, témoignant de l'induction du flux autophagique. Ce postulat est conforté par l'effet synergique sur LC3B-II, du Prazosin et de la Torine un inducteur de l'autophagie n'induisant pas d'augmentation de SQSTM1. La SLA étant causée par la dégénérescence des motoneurones, nous avons par la suite testé le Prazosin dans ces cellules dérivées à partir des cellules souches pluripotentes saines. Dans les motoneurones traités, le Prazosin induit une augmentation du transcrit *SQSTM1*, significative mais cependant beaucoup moins importante que dans les MPCs. Ce traitement se traduit toutefois par l'apparition de bodies de SQSTM1 dans les motoneurones ainsi que la modification de la protéine LC3B, démontrant la capacité du Prazosin à induire l'autophagie dans des motoneurones sains. D'un point de vue mécanistique, nous avons démontré par Western blot que cet effet est indépendant de la voie mTOR, à la différence de la Rapamycine. Afin d'évaluer le potentiel thérapeutique du Prazosin dans un contexte de perte de fonction décrite chez les patients porteurs de mutations de SQSTM1, nous avons généré des clones d'IPS dans lesquels une délétion causant une perte d'expression de *SQSTM1* a été opérée sur un ou deux allèles par la technologie CRISPR/Cas9. Après avoir vérifié que ces clones peuvent être différenciés en motoneurones avec la même efficacité que les IPS initiales, nous avons caractérisé l'effet de la perte d'expression de *SQSTM1*. Dans les motoneurones SQSTM1 +/-, une chute drastique des bodies de SQSTM1 est observée suggérant qu'une diminution de moitié de la quantité de protéine perturbe le processus de dimerisation et d'oligomérisation. Dans ces cellules, la quantité de LC3B associée à la membrane des auto-phagosomes (LC3B-II) n'est pas perturbée en l'absence d'inducteur autophagique. Après traitement à la Torine, on observe une réduction de la quantité de LC3B-II dans les motoneurones SQSTM1 +/- et -/- en comparaisons aux motoneurones sains. Similairement, la diminution des lysosomes, détectés via la détection de la protéines LAMP2, en réponse à la Torine n'est plus observée dans les motoneurones SQSTM1 +/- et -/-. Ces données cumulées suggèrent une réduction du flux autophagique dans les motoneurones SQSTM1 +/- et -/-. En comparaison aux cellules SQSTM1 +/+, ces cellules présentent une augmentation de l'expression de la Caspase 3 clivée, exprimée par les cellules en apoptose, révélant une toxicité causée par la perte d'expression des SQSTM1. Globalement, ces résultats montrent que l'autophagie est sous optimale dans les motoneurones SQSTM1 +/- et -/- ce qui peut les conduire à une mortalité accrue en présence d'inducteurs de l'autophagie. Nous avons évalué l'effet d'un traitement au Prazosin sur ces différents paramètres cellulaires dans les motoneurones SQSTM1 +/--. Nous avons constaté une augmentation du nombre de bodies SQSTM1 bien que moindre en comparaison aux cellules saines, une augmentation de la protéines LC3B-II et une réduction du signal LAMP2, tous deux associés à une induction du flux autophagique. Enfin, l'évaluation du nombre résiduel de motoneurones après 24 jours de différenciation montre un effet bénéfique du Prazosin sur la survie des motoneurones. Pour mesurer le potentiel thérapeutique de cette molécule dans un contexte plus physiologique, nous avons testé l'effet d'un traitement au Prazosin dans un modèle de Zebrafish développé par le Dr Edor Kabashi (Institut Imagine, Paris) dans lequel l'expression de *SQSTM1* réprimée par un oligonucléotide antisens (Lattante et al., 2015). Nous avons pu vérifier l'absence de toxicité en réponse à un traitement au Prazosin qui améliore les paramètres de la nage des poissons. Des expériences complémentaires visant à analyser l'expression de SQSTM1 et étudier la survie des motoneurones, nous permettront de

déterminer si l'augmentation de SQSTM1 peut contribuer à limiter la dégénérescence des motoneurones décrite dans ce modèle (Lattante et al., 2015). Enfin, il serait intéressant de déterminer si le Prazosin peut présenter un intérêt thérapeutique pour un plus grand nombre de patients en évaluant l'effet de ce composé sur des agrégats de TDP-43 dans des cellules de patients atteints de SLA. Ces expériences montrent que le Prazosin, médicament possédant une autorisation de mise sur le marché, pourrait représenter une molécule candidate pour compenser la perte de fonction associée à une mutation de SQSTM1. Nous montrons également que la perte de fonction de SQSTM1 se traduit par des atteintes du flux autophagique dans des motoneurones humains issus de CSpH. Il serait pertinent d'explorer le métabolisme oxydatif dans ces cellules afin de déterminer si ce modèle reproduit l'ensemble des atteintes cellulaires décrites dans la littérature.

Importance de l'intégrité de l'empreinte parentale pour l'utilisation des cellules souches pluripotentes humaines

Contexte

La recherche de gènes modificateurs de l'épissage au moyen de petits ARN interférant m'a donné l'envie d'explorer le rôle des microRNAs dans la DM1. Dans ce but, nous avons procédé à l'analyse de leur expression différentielle entre 3 lignées de cellules hES non mutées : les lignées SA01, VUB01 et H9 et 3 lignées de hES DM1 : VUB-19 (>500 CTG), VUB03 (>1000CTG) et VUB24 (>2000CTG), dérivées dans le laboratoire du Dr Karen Sermon (Vrije Universiteit, Bruxelles). L'analyse d'un panel de 200 microRNAs analysés par PCR quantitative au stade pluripotent et dans des dérivés du mésoderme (MPCs, mesodermal progenitor cells) a révélé un ensemble de microRNAs fortement dérégulés. Fait intéressant, nous avons constaté qu'une forte proportion d'entre eux appartenait à un même locus génétique nommé *DLK1-DIO3* présentant la particularité d'être soumis à l'imprinting parental.

Un défaut d'empreinte épigénétique de ce locus a été décrit par Stadtfeld et al (Stadtfeld et al., 2010) lors des premières expériences de reprogrammation de cellules somatiques en IPS, suggérant que la dérégulation de ce cluster de microRNAs pourrait provenir d'un défaut de dérivation des lignées de hES utilisées plutôt que d'une atteinte de la DM1.

Les gènes soumis à l'empreinte parentale

Si la plupart des gènes des mammifères sont exprimés de façon biallélique, certaines régions chromosomiques portent des gènes dont l'expression est mono-allélique et dépend de l'origine parentale. La découverte de ces gènes provient d'expériences de transfert nucléaire réalisées chez la souris en 1984 (McGrath & Solter, 1984; Surani, Barton, & Norris, 1984). Dans ces expériences réalisées sur des œufs de souris fécondés, l'échange de noyaux issus du spermatozoïde et avec ceux issus de l'ovocyte génère des gynogénotes (deux noyaux femelles) ou des androgénotes (deux noyaux mâles) qui ne se développent jamais à terme malgré leur composition diploïde. Ces études ont démontré que même s'ils possédaient des séquences d'ADN identiques, les génomes masculin et féminin des mammifères n'étaient pas interchangeables et que la présence de chacun des deux génomes parentaux est indispensable au développement à terme de l'embryon. Peu de temps après, les travaux de Cattanach et Kirk ont démontré que l'effet de l'origine parentale était localisé dans des régions spécifiques de certains chromosomes (Cattanach & Kirk, 1985) dans des expériences de croisements de souris présentant une disomie uniparentale (UPD) obtenues à partir de souris hétérozygotes pour

des translocations Robertsoniennes. Bruce Cattanaach et son équipe ont ainsi déterminé des régions chromosomiques non équivalentes en fonction de leur origine maternelle ou paternelle, et qui affectent la croissance, le comportement ou la viabilité des souris. Ces résultats ont permis de préciser la nécessité de l'expression de gènes exclusivement paternels et maternels pour que les embryons se développent normalement.

Remarquablement, le phénomène d'empreinte génomique est observé principalement chez les mammifères euthériens (mammifères avec placenta à vie longue), mais pas chez les Prototherians (mammifères pondeuses), les oiseaux ou les reptiles (Hore, Rapkins, & Graves, 2007). L'analyse de la fonction de ces gènes révèle que la plupart d'entre eux sont impliqués dans la régulation de la croissance fœtale. En effet, ces différents gènes sont impliqués dans le contrôle de la croissance placentaire, l'allaitement et le métabolisme des nutriments (Frost & Moore, 2010; Piedrahita, 2011). Depuis, l'importance des gènes soumis à l'imprinting a également été révélée pour des étapes post-natales telles que la thermogénèse, la nourriture, la régulation du métabolisme, ou les comportements mère-enfant afin d'optimiser les soins maternels.

Chez l'humain, environ 100 gènes soumis à l'empreinte parentale ont été identifiés à ce jour (Human Book Imprinting catalogue (NRG, 2014 Atlas) et 250 chez la souris. Grâce aux techniques de séquençage à haut débit, le nombre de ces gènes est régulièrement réévalué à la hausse. Ces gènes sont généralement regroupés en domaines chromosomiques, appelés **clusters**, répartis sur 20kb à 3,7 Mb d'ADN, bien qu'il existe aussi des exemples de gènes uniques (Edwards & Ferguson-Smith, 2007). Les clusters contiennent à la fois les gènes d'expression paternelle et maternelle qui produisent souvent à la fois des ARNs codants et des ARNs non codants. Chaque cluster possède une région de contrôle de l'empreinte parentale (**Imprinting Control Region, ICR**) qui régit l'expression selon l'empreinte parentale. Ces régions font l'objet de modifications épigénétiques sous la forme de méthylations de l'ADN allèle-spécifiques. Ce type de régulation confère aux gènes concernés une expression mono-allélique dans la plupart des types cellulaires bien que dans certains cas, cette expression mono-allélique soit restreinte à certains tissus (par exemple pour le gène *UBE3*) ou certains stades du développement (pour le gène *KCNQ1*).

Mise en place de l'empreinte parentale au cours du développement.

Chez les mammifères euthériens, deux événements majeurs de reprogrammation épigénétiques du génome par perte de méthylation de l'ADN ont lieu au cours du développement : le premier lors des phases précoces de l'embryogénèse et le second au cours de la gamétogénèse (Figure 26). La première vague de déméthylation globale survient après la fécondation. Le pronucléus paternel subit une déméthylation active qui est terminée avant la première réplication de l'ADN alors que le chromosome maternel est déméthylé par un mécanisme passif dépendant de la réplication de l'ADN. Cette déméthylation massive aurait pour rôle d'effacer toute régulation provenant des cellules germinales parentales pour permettre un nouveau profil d'expression génique caractéristique du zygote. La vague de reméthylation à l'échelle du génome a lieu au moment de l'implantation de l'embryon, au stade blastocyste, et ces marques seront transmises aux cellules filles tout au long du développement des individus. Dans l'épiblaste, cette première vague concerne les cellules somatiques et épargne les cellules de la lignée germinales qui conservent les marques d'impression établis dans les gamètes parentaux (Figure 26). La seconde vague de méthylation concerne les cellules de la lignée germinale lors de la gamétogénèse. Lorsque les cellules germinales primordiales (PGC, primordial germ cells) de l'embryon en développement pénètrent dans la crête génitale primitive pour permettre aux gonades

définitives et sexuellement différenciées de se développer, une de-méthylation à l'échelle du génome efface les marques d'imprinting présentes sur les chromosomes maternels et paternels. Une méthylation de novo suit alors pour établir les nouvelles empreintes reflétant le sexe de l'embryon.

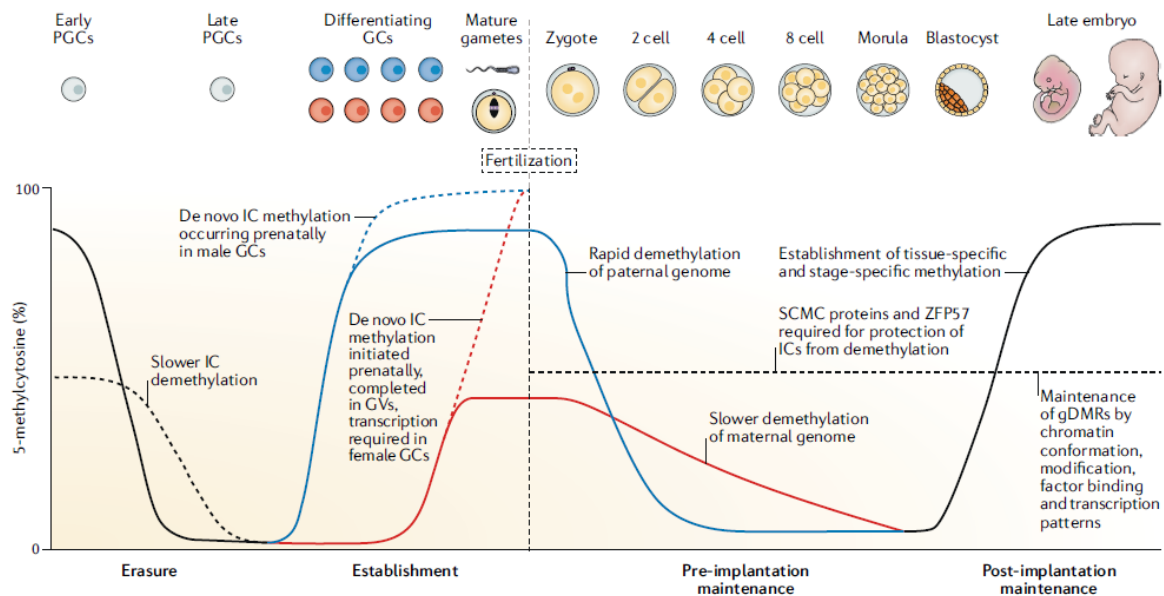


Figure 26. Reprogrammation de la méthylation de l'ADN au cours du développement humain (Monk, Mackay, Eggermann, Maher, & Riccio, 2019).

Mécanismes moléculaires

Un gène soumis à l'empreinte génomique est caractérisé par un déséquilibre du niveau d'expression des allèles parentaux. Dans les cas extrêmes, un allèle est exprimé tandis que l'autre allèle est conservé dans un état silencieux. Pour suivre une telle régulation, chaque cluster de gènes soumis à l'empreinte parentale est contrôlé par une région **germinale différenciellement méthylée** (gDMR), également connu sous le nom de **DMR primaire**. Ces centres de contrôle de l'expression contiennent des **régions différenciellement méthylées (DMRs)**, où la méthylation de l'ADN diffère entre les allèles d'origine paternels ou maternels. Les DMRs sont également caractérisés par des configurations différentes de la chromatine sur chacun des chromosomes parentaux. Sur l'allèle méthylé, ces marques prennent la forme d'histones caractéristiques de la chromatine fermée sur un allèle (par exemple, la diméthylation de l'histone 3 sur la lysine 9 (H3K9me2), la triméthylation de l'histone 3 sur la lysine 9 triméthylation (H3K9me3) et la triméthylation de l'histone 4 sur la lysine 20 (H4K20me3)) tandis que l'allèle non méthylé porte des marques d'histones méthylées caractéristique de la chromatine ouverte sur l'autre (par exemple, H3K4me2 et H3K4me3). Les marques épigénétiques des DMRs évoluent au cours du développement pour assurer l'expression adéquate des gènes des clusters.

L'ADN des vertébrés est méthylé sur les résidus cytosine de dinucléotides CpG par des DNA méthyltransférase. Trois méthyltransférases fonctionnelles ont pu être identifiées chez les mammifères : *Dnmt1*, *Dnmt3a* et *Dnmt3b* ont été identifiées pour jouer un rôle important dans la méthylation de novo et sont essentielles pour le développement embryonnaire. Par des expériences d'inactivation de gènes, Kaneda et al ont démontré en 2004 que la perte de fonction de *Dnmt3a* dans la lignée germinale perturbe l'établissement des empreintes paternelles et maternelles (Okano, Bell, Haber, & Li, 1999).

Empreinte parentale et maladies

De par les expériences réalisées lors de leur mise évidence, il a longtemps été considéré que les gènes soumis à l’empreinte parentale jouent un rôle important dans les étapes antenatale lors du développement du placenta et de l’embryon. Les analyses réalisées depuis lors démontrent que les gènes imprimés contrôlent un large nombre de processus biologiques dont les effets s’étendent jusqu’à l’âge adulte et la perturbation de leur expression est associée à de nombreuses pathologies (Monk et al., 2019). Ces pathologies se caractérisent par des défauts du développement, des troubles du métabolisme (diabète, obésité), des désordres du psychiques en relation avec le comportement social adulte, les troubles psychiatriques et le cancer (Peters, 2014).

Les défauts d’empreinte peuvent avoir plusieurs origines. Parmi celles-ci, on trouve des délétions de régions contenant les DMRs qui régulent un cluster de gènes soumis à l’empreinte. Un autre type d’altération consiste en une unidisomie parentale (UPD) dans laquelle les deux copies d’un chromosome proviennent d’un parent. C’est le cas par exemple de la région chromosomique 15q11–q13 soumise à l’empreinte et dont la perturbation conduit à deux troubles neuro-développementaux distincts : L’absence des gènes d’origine maternelle induit le syndrome de Prader-Willi tandis que l’absence des gènes d’origine paternelle provoque le syndrome d’Angelman.

Dérégulation de l’empreinte parentale dans les cellules souches pluripotentes

La méthylation des loci soumis à l’imprinting est généralement maintenue dans les lignées de CSpH au même titre que l’inactivation du chromosome X. Le maintien de ces marques épigénétiques contribue ainsi à la reproduction de défauts d’empreinte parentale lors de la reprogrammation de cellules somatiques en IPS permettant la modélisation pathologique des syndromes d’Angelman (Chamberlain et al., 2010) et de Prader-Willi (Burnett et al., 2016). Dans certains cas cependant, la perte de ces marques épigénétique a pu être constatée dans des lignées de hES. Ces altérations ont été attribuées aux conditions de culture et il a été montré qu’elles pouvaient être évitées via l’utilisation d’acide ascorbique ou du duo d’inhibiteurs de la MEK et de la Gsk3 β , connu pour l’induction des CSpH naïves (Habib et al., 2014; Stadtfeld et al., 2012). Ce phénomène est important à prendre en considération car il a été observé une fréquence anormale des maladies liées à l’imprinting telle que le syndrome Beckwith-Wiedemann dans le cadre d’assistance à la procréation médicale où les oocytes et embryons sont manipulés in vitro (Uyar & Seli, 2014)). Les pertes d’imprinting les plus fréquemment retrouvées dans les CSpH concernent les loci contenant les gènes *H19*, *IGF2*, *MEG3*, *PEG3*, *PEG10* et *MEST* (par exemple (Rugg-Gunn, Ferguson-Smith, & Pedersen, 2005)). L’expression anormale de certains de ces gènes associés à des cancers (*IGF2* et *MEG3*) pourraient conférer un avantage prolifératif aux lignées de CSpH affectées. Comme évoqué plus haut, ces anomalies correspondent à différentes pathologies et il est important de les détecter dans les lignées utilisées dans les laboratoires. Parmi celles-ci, j’ai été amenée à m’intéresser à celles qui touchent le locus *DLK1-MEG3* dans la région chromosomique 14q32.

Ce locus contient des gènes exprimés paternellement (*DLK1* et *RTL1*) et des gènes et microRNAs exprimés maternellement (*GTL2* (alias, *MEG3*), *RTL1as* (antisens *RTL1*) et Mirg (alias *MEG9*)) (Figure 27).

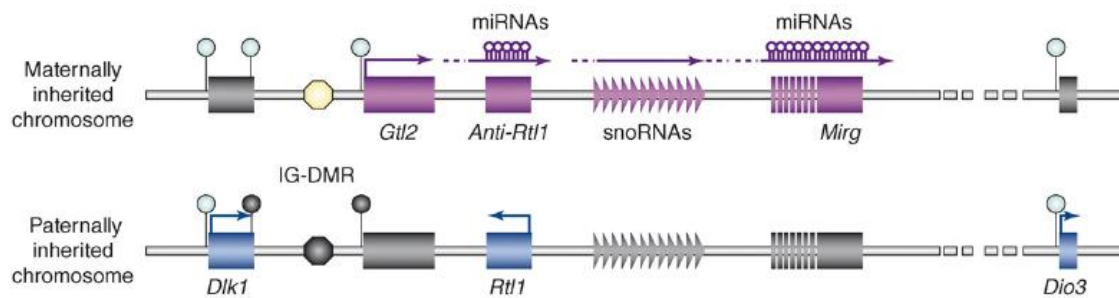


Figure 27. Représentation schématique du cluster *DLK1-DIO3*. Le domaine imprimé *Dlk1-Dio3* contient trois gènes codant les protéines, *DLK1*, *RTL1* et *DIO3*, exprimées à partir du chromosome hérité paternellement et plusieurs gènes correspondant à des ARN non codant (ARNnc) exprimés par le chromosome hérité de la mère. Cette empreinte est régulée par le DMR intergénique (IG-DMR), un élément intergénique entre *DLK1* et *GTL2* qui provoque la répression des gènes codant sur l'allèle maternel et la transcription des gènes non codants. Les flèches indiquent le sens de la transcription (da Rocha et al., 2007).

L'expression correcte de ces différents gènes et microRNAs est sous le contrôle du DMR intergénique *DLK1-GTL2* (IG-DMR). Celui-ci est normalement hyperméthylé dans l'allèle paternel et hypométhylés dans l'allèle maternel. Sa délétion, hyperméthylation ou hypométhylation sur le mauvais allèle a été observé chez les patients de syndromes UPD14 maternels et paternels (Kagami et al., 2008; Sutton & Shaffer, 2000) souffrant entre autre de retard de croissance, d'anomalies squelettiques, de dysmorphie faciale, de puberté prématurée et d'obésité (Table 10).

	matUPD14	Paternal deletion of <i>Dlk1-Gtl2</i>	Paternal deletion of <i>Wars25-snoRNAs</i>	patUPD14	Maternal deletion of <i>Dlk1-Gtl2</i>	Maternal deletion of <i>Wars25-snoRNAs</i>
Predicted gene dosage ^b	<i>DLK1</i> : 0x <i>ncRNAs</i> : 2x <i>RTL1</i> : 0x	<i>DLK1</i> : 0x <i>ncRNAs</i> : 1x <i>RTL1</i> : 1x	<i>DLK1</i> : 0x <i>ncRNAs</i> : 1x <i>RTL1</i> : 0x	<i>DLK1</i> : 2x <i>ncRNAs</i> : 0x <i>RTL1</i> : 4x	<i>DLK1</i> : 1x <i>ncRNAs</i> : 0x <i>RTL1</i> : 4x	<i>DLK1</i> : 1x <i>ncRNAs</i> : 0x <i>RTL1</i> : 2x
Facial appearance	High forehead, short philtrum, downturned mouth	Facial dysmorphism similar to matUPD14	Facial dysmorphism similar to matUPD14	Face—hairy forehead, blepharophimosis, micrognathia and prominent philtrum	Facial dysmorphism as in patUPD14	Facial dysmorphism similar to (but milder than) patUPD14
Growth	Pre- and postnatal growth retardation	Pre- and postnatal growth retardation	Pre- and postnatal growth retardation	Normal prenatal growth, ^c severe postnatal growth retardation	Normal prenatal growth, ^c postnatal growth retardation	Normal prenatal growth ^c
Motor system	Joint laxity; muscle hypotonia; Motor delay	Motor delay	Motor delay	Developmental delay; joint contractures; feeding difficulties	Developmental delay; joint contractures; feeding difficulties	Developmental delay; feeding difficulties
Skeleton	Reduced height (by accelerated skeletal maturation); dysmorphic face, hands and feet	Reduced height; dysmorphic features of face, hands and feet	Reduced height; dysmorphic features of face, hands and feet	Small and typical bell-shaped thorax with 'coat-hanger' appearance of the ribs	Small and typical bell-shaped thorax with 'coat-hanger' appearance of the ribs	Small and typical bell-shaped thorax with 'coat-hanger' appearance of the ribs
Placenta	nd	nd	nd	Placentomegaly	Placentomegaly	Placentomegaly
Neurological processes	Normal/mild mental retardation	No mental retardation	No mental retardation	Moderate to severe mental retardation	ND	ND
Specific characteristics	Early puberty, recurrent otitis media; occasional obesity	Early puberty, occasional obesity	No early puberty	Complicated pregnancies with polyhydramnios and premature delivery; abdominal wall defects	Complicated pregnancies with polyhydramnios and premature delivery; abdominal wall defects	Complicated pregnancies with polyhydramnios and premature delivery; mild abdominal wall defects
Refs	[82,83]; reviewed in [11]	[59]	[59]	[84,85]; reviewed in [12]	[59]	[59]

^a*Dlk1-Dio3*, delta-like 1 homology-type III iodothyronine deiodinase; ncRNA, noncoding RNA; ND, not determined.

^bGene dosage of the *DLK1-DIO3* domain in humans is difficult to monitor because these genes are weakly or not expressed in leukocytes; the predicted gene dosage is based mainly on expression studies in human placentas and from predictions based on the known dosage of these genes in humans and mice and considering the extent of the deletions.

^cpatUPD14 patients are frequently delivered prematurely; their growth is normal compared with gestational age-matched reference.

Table 10. Anomalies pathologiques dans des modèles murins présentant des défauts génétiques du locus *DDK1-DIO3* (da Rocha et al., 2007).

Ainsi, il était important de déterminer si la surexpression des microRNAs du locus *DLK1-MEG3* détectée par PCR quantitative dans les trois lignées de hES-DM1 que nous avons en notre possession correspondait à une atteinte de la DM1 ou si elle témoignait plutôt de l'altération de l'imprinting parental de ce locus génétique dans les lignées contrôles. Incidemment, la surexpression du gène *MEG3* avait déjà été détecté dans le transcriptome différentiel réalisé sur les mêmes MPCs DM1 versus MPCs saines par le Dr Geneviève Piétu à I-Stem. Nous avons donc entrepris la caractérisation du statut de méthylation de l'IG-DMR dans ces lignées et avons exploré l'impact fonctionnel du défaut d'imprinting de ce locus sur le potentiel de différenciation de ces lignées de CSpH.

Impact de la perte d'imprinting du locus *DLK1-DIO3* sur le potentiel de différenciation des cellules souches pluripotentes humaines.

Afin de déterminer si la surexpression des microRNAs appartenant au locus *DLK1-MEG3* était causé par un défaut d'imprinting versus une délétion génomique, nous avons analysé le profil de méthylation de l'IG-DMR dans différentes lignées de hES. Comme illustré en Figure 28, nous avons pu corrélérer ce défaut d'expression des microRNAs à une hyperméthylation de l'IG-DMR dans les lignées contrôles.

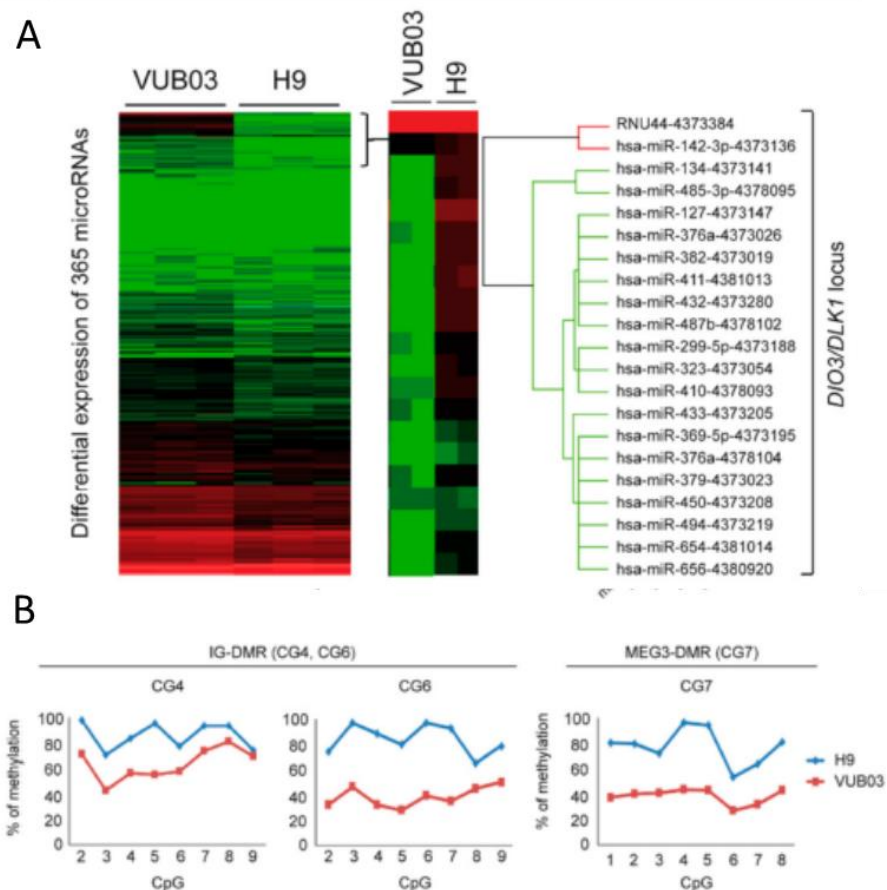


Figure 28. Expression des microRNAs du locus *DLK1-DIO3* dans des lignées de cellules souches embryonnaires humaines. (A) Analyse de l'expression de 200 microRNAs par RT-qPCR Taqman dans des MPCs dérivées de lignées de hES saines (H9) ou porteuses de la mutation causale de la DM1 (VUB03) montrant la perte d'expression du cluster de microRNAs du locus *DLK1-DIO3* dans la lignée H9. (B) La perte d'expression des microRNAs est expliquée par une hyperméthylation, mesurée par pyroséquençage, de l'IG-DMR dans la lignée H9 (Barrault et al., 2019).

Ce locus contenant le plus grand cluster de microRNAs chez l'homme, nous nous sommes demandé quel pouvait être l'impact de la perte de ces microRNAs pour les lignées de CSpH. Nous avons procédé à l'analyse des cibles de chacun de ces quarante microRNAs et avons recherché si certaines voies de signalisation ou métaboliques pouvaient être particulièrement ciblées. Nous avons ainsi identifié que les récepteurs de la voie du TGFβ étaient anormalement sur-représentés parmi les cibles des différents microRNAs (Table 11).

	Type 1 TGFβ receptors family					Type 2 TGFβ receptors family		
	ACVR1	ACVR1B	ACVR1C	BMPR1A	BMPR1B	ACVR2A	ACVR2B	BMPR2
DIO3/DLK1 microRNA		miR-770		miR-136		miR-770	miR-770	miR-136
		miR-337					miR-370-3p	
			miR-432				miR-323a-3p	
			miR-494_3p			miR-380	miR-380	miR-329-3p
			miR-543			miR-543	miR-543	miR-494_3p
		miR-496			miR-495-3p		miR-495-3p	
			miR-654-3p				miR-654-3p	miR-376a-3p
								miR-376b
			miR-487b		miR-300		miR-300	miR-376a
	miR-381	miR-1185			miR-381		miR-1185	miR-300
			miR-889-3p		miR-889-3p	miR-889	miR-381	miR-381
		miR-889	miR-889-3p		miR-889-3p		miR-487b	miR-889-3p
	miR-544		miR-889-3p		miR-889-3p		miR-487b	miR-889-3p
			miR-382				miR-544a-3p	miR-544a-3p
			miR-485-3p				miR-544a-3p	miR-655
							miR-323b	
			miR-541				miR-154	
			miR-409-3p			miR-409-5p	miR-377-3p	
							miR-409	
			miR-410-3p				miR-369-3p	miR-369-3p
	miR-656-3p	miR-656-3p		miR-656-3p		miR-410-3p		

Table 11. Liste des sites putatifs de fixation des microRNAs du locus *DLK1-DIO3* dans la région 3' non codante des transcrits codant les récepteurs de la famille du TGFβ (Barrault et al., 2019).

Parmi ceux-ci, le récepteur *ACVR2B* contient dans sa partie 3' transcrite non traduite des sites de fixation putatifs pour 19 des microRNAs du locus *DLK1-MEG3*. A la différence des autres récepteurs, *ACVR2B* joue un rôle assez spécifique dans la régulation de l'ostéogénèse qui est perturbée chez les patients atteints d'UPD14. Afin de vérifier si *ACVR2B* était régulé par ces microRNA, nous avons surexprimé 7 d'entre eux dans la lignée contrôle SA01 et avons observé par des expériences de Western blot, une répression de l'expression d'*ACVR2B* par chacun des microRNA testés (Figure 29).

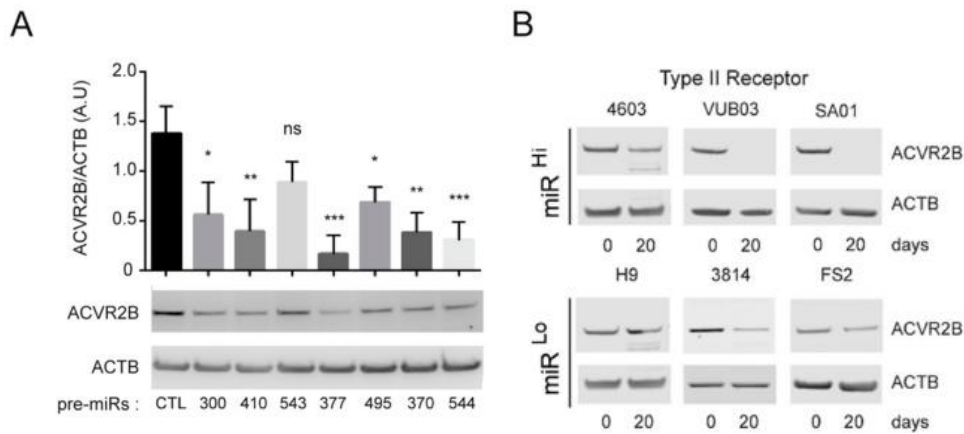


Figure 29. L'expression du récepteur ACVR2B est régulée par différents microRNAs du locus *DLK1-DIO3*. (A) La surexpression de 8 microRNAs du locus *DLK1-DIO3* possédant un site putatif de fixation sur le transcrite *ACVR2B* entraîne une répression d'ACVR2B évaluée par Western blot à l'exception du microRNA-543. (B) L'analyse de l'expression du récepteur ACVR2B au cours de la différenciation ostéogénique montre un défaut de son extinction dans les MPCs n'exprimant pas les microRNAs (miR Lo) versus les MPCs exprimant ces microRNAs (miR Hi) (Barrault et al., 2019).

Nous avons alors entrepris la caractérisation de l'expression d'ACVR2B au cours de la différenciation ostéogénique de précurseurs du mésoderme dérivés de lignées de hES présentant une régulation correcte ou anormale du locus *DLK1-MEG3*. Lorsque les microRNAs du locus sont correctement exprimés, une diminution de l'expression d'ACVR2B est observée au cours de la différenciation ostéogénique. Dans les lignées ayant perdu l'expression du cluster de microRNAs, cette répression est compromise. Nous avons alors caractérisé la différenciation ostéogénique de ces différentes lignées pour évaluer l'impact du maintien de l'expression d'ACVR2B. Nous avons constitué un groupe de 10 lignées de cellules souches pluripotentes incluant des lignées de hES et des lignées d'IPS, dans lesquelles nous avons caractérisé l'expression des microRNAs afin de disposer de deux groupes de cinq lignées correctement (miR High) ou anormalement régulées (miR Low) par imprinting. Nous avons observé que les lignées n'exprimant pas les microRNAs présentaient un défaut de différenciation ostéogénique révélé par coloration à l'Alizarine qui marque des plages de dépôts de calcium par dans les ostéocytes différenciés. Ce défaut de différenciation est également démontré par un défaut d'activité de la phosphatase alcaline ainsi qu'un retard d'expression des gènes de différenciation *RUNX2* et *OCN* dans les lignées miR Low. L'implication d'ACVR2B dans ce défaut de différenciation a finalement pu être prouvée via l'expression ectopique de ce gène dans des MPCs miR High exprimant les microRNAs du cluster *DLK1-MEG3* dont la différenciation ostéogénique, analysée par coloration à l'alizarine ou phosphatase alcaline, a pu être bloquée (Figure 30).

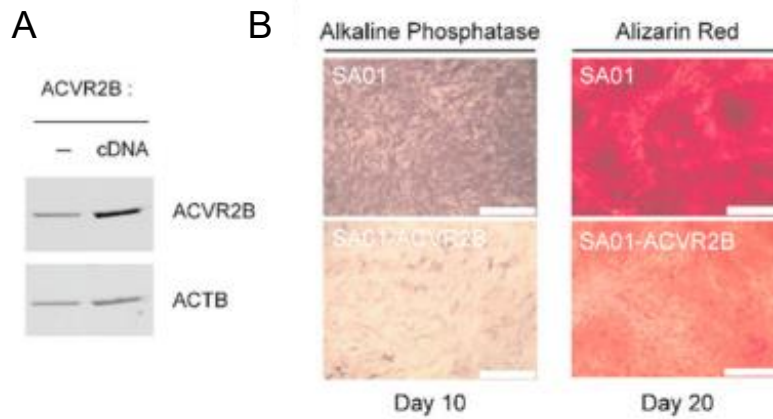


Figure 30. La surexpression du récepteur ACVR2B dans des MPCs inhibe leur différenciation en ostéoblastes, mesurée au jour 10 par l'activité de la phosphatase alcaline et à jour 20 par une coloration des dépôts calciques au rouge Alizarine (Barrault et al., 2019).

Cette étude a fait l'objet d'un article publié dans le journal *Cells* en Novembre 2019 (Barrault et al., 2019). Ces résultats sont à mettre en perspective avec des études décrivant l'implication du gène *MEG3*, exprimé par l'allèle maternel comme les microRNAs, dans le contrôle de la différenciation ostéogénique (S. Chen, Jia, Zhang, Zheng, & Zhou, 2018). Il semble donc que les gènes et microRNAs exprimés par l'allèle maternel partagent une fonction commune ce qui souligne l'importance d'une régulation fine et correcte des gènes soumis à l'empreinte parentale.

Du point de vue du modèle cellulaire, ces travaux montrent que l'imprinting parental est un paramètre important à évaluer lors de l'utilisation des CSPh. Ce type de défaut peut avoir des conséquences délétères aussi bien pour des approches de thérapie cellulaire que pour des projets de modélisation pathologique. Le dosage respectif des gènes d'un même cluster soumis à l'empreinte parentale peut être réalisé par simple PCR quantitative et devrait être inclus dans la batterie de tests réalisés dans le cadre des contrôles de qualité associés à l'utilisation des CSPh.

Chapitre3. Exposé des futurs projets de recherche

La Dystrophie Myotonique de type 1 est une maladie multi-systémique mais les atteintes de certains organes peuvent s'avérer particulièrement invalidantes pour les patients. C'est le cas du système nerveux dont les dysfonctions se manifestent chez les patients sous la forme de symptômes divers : une hypersomnolence diurne, des troubles des fonctions cognitives (immaturité et difficultés d'apprentissage chez l'enfant, ralentissement intellectuel chez l'adulte), des troubles de l'humeur (anxiété, agressivité, dépression, apathie) et un déficit dans la reconnaissance des émotions chez autrui (Gourdon & Meola, 2017). Ces atteintes varient en fonction des formes de DM1 développées par les patients (Table 12).

Phenotypes	Age of onset	Clinical findings*	CNS symptoms*	CTG length
Congenital	Birth	Infantile hypotonia Respiratory failure Feeding difficulties Cardiorespiratory complications	Learning disability Reduced IQ values Speech and language delay	>1,000
Childhood onset	1–10 years	Facial weakness Myotonia Heart Conduction defects	Reduced IQ values Attention deficit Deficit in visuo-spatial/constructive skills Autism spectrum disorder Communication problems Social anxiety Fatigue	50–1000
Juvenile	10–20 years	Classical motor and heart symptoms can be absent and can appear later on	Visuo-spatial deficit Executive dysfunction Learning difficulty Social and Mating problems	50–1000
Adult onset	20–40 years	Weakness Myotonia Cataracts Conduction defects Insulin resistance Respiratory failure	Lower IQ scores Frontal dysexecutive syndrome Apathy Avoidant personality Lack of initiative Social interactions problems Theory of mind deficit Fatigue Sleepiness	50–1000
Late onset/Asymptomatic	>40 years	Mild myotonia Cataracts		50–100
Pre-mutation	N/A	None		38–49

*Note that the described features can be very variable from one individual to another
N/A, Not applicable.

Table12. Principales atteintes cliniques cérébrales des patients atteints de DM1 (Gourdon & Meola, 2017).

Une étude longitudinale réalisée sur neuf ans, montre une aggravation significative au fil du temps de la mémoire verbale, l'attention visuelle et la vitesse de traitement de l'information tandis que le fonctionnement intellectuel reste stable. Les fonctions exécutives, le langage et la mémoire visuelle sont altérés plus tôt dans la vie adulte, tandis que la mémoire verbale, l'attention visuelle et la vitesse de traitement diminuent plus tard. Globalement, les résultats de l'étude suggèrent un processus de vieillissement normal précoce et accéléré (Gallais, Gagnon, Mathieu, & Richer, 2017). La caractéristique neuropsychiatrique la plus marquante chez les patients DM1 est un mode de personnalité ayant une tendance à l'évitement, la réduction de la perception des symptômes et des signes de la maladie.

Ces symptômes sont corrélés à des modifications structurelle observées par imagerie dans les cerveaux de patients. Ces études ont révélé une atrophie cérébrale qui peut évoluer dans le temps (Baldanzi et al., 2016). Les atteintes de la substance blanche observées dans les différentes régions du cerveau sont corrélées au nombre de répétitions CTG (Baldanzi et al., 2016; Minnerop et al., 2011) ainsi qu'à la

réduction du métabolisme du glucose (Annane et al., 1998; Mielke, Herholz, Fink, Ritter, & Heiss, 1993) et du flux sanguin (Meola et al., 1999; Romeo et al., 2010).

L'analyse des défauts moléculaires sous-jacents a pu être investiguée dans des prélèvements post-mortem de cerveaux de patients DM1. L'expression de la *DMPK* est observée dans les différentes régions du cerveau (Gennarelli et al., 1995). Le transcrit *DMPK* mutant est détecté sous la forme de foci qui captent les protéines MBNL1 et MBNL2 (Jiang, Mankodi, Swanson, Moxley, & Thornton, 2004). Une forte expression de CUGBP1 est également observée dans les neurones corticaux humains DM1. En conséquence, de nombreux défauts d'épissages sont détectés. Parmi ceux-ci, on retrouve des gènes précédemment décrits pour leur implication dans des maladies neuro-dégénératives (*MAPT*, *APP*) (Jiang et al., 2004; Sergeant et al., 2001) ou leur importance pour la plasticité synaptique (*GRIN1*) (Jiang et al., 2004). Les défauts d'épissages sont présents sur l'ensemble du cerveau (dans la substance grise comme la substance blanche) à l'exception du cervelet (Nishi et al., 2020). Du point de vue fonctionnel, les participations de CUG-BP1 et MBNL2 dans l'épissage des exons 2 et 3 du transcrit *MAPT* ont été confirmées par différentes équipes (Dhaenens et al., 2011; Goodwin et al., 2015). Depuis ces premières études, l'analyse des altérations transcriptomiques a été réalisée à l'échelle du génome entier sur des échantillons de cortex frontal de patients DM1 révélant de nouveaux défauts d'épissage correspondant à des récepteurs de neurotransmetteurs, des canaux ioniques et des protéines d'échafaudage synaptique (Wang et al., 2020 ; BioRxiv). Une analyse par HITS-CLIP, révèle que beaucoup d'entre eux sont dépendant de MBNL1 et MBNL2 dont la déplétion par les répétitions de CGT engendre des défauts d'épissages mais aussi des changements de site de polyadénylation (Goodwin et al., 2015).

Ainsi, dans les cerveaux de patients DM1, on retrouve les mêmes mécanismes pathogéniques que ceux découverts dans le muscle squelettique, c'est-à-dire la présence de foci qui dérèglent l'activité des protéines de fixation à l'ARN de la famille MBNL et CELF. En conséquence, la biogénèse des transcrits est altérée et engendre des dysfonctionnements cellulaires. Pour aller plus loin dans la compréhension des processus cellulaires impactés dans le lignage neural et leur lien avec les symptômes de la DM1, deux modèles animaux existent (Braz, Acquaire, Gourdon, & Gomes-Pereira, 2018): les souris DMSXL décrites plus haut (Huguet et al., 2012) et les souris EpA960/CaMKII-Cre exprimant des répétitions de CTG dans le lignage neural uniquement (P. Y. Wang et al., 2017). L'étude comportementale des souris DMSXL et EPA960 montre que ces souris présentent plusieurs symptômes observés chez les patients DM1 tels que l'anxiété, un défaut de mémoire, un ralentissement de l'apprentissage et une anhédonie. Ces différentes atteintes laissent supposer une perturbation du système nerveux central marquée par une atrophie du cortex et de l'hypocampe, zones où les répétitions sont exprimées dans les souris EPA960 (P. Y. Wang et al., 2017)). Des atteintes de la coordination motrice mettant en cause le cervelet sont également rapportées dans les souris DMSXL (Sicot et al., 2017). Les foci, associés aux répétitions de CTG, sont retrouvés dans les différentes régions du cerveau des souris EPA 960 et DMSXL bien que 80% d'entre eux soient localisés dans le cortex (Hernandez-Hernandez et al., 2013) mais aussi dans le cervelet des souris DMSXL (Sicot et al., 2017). Comme chez l'Homme, la présence de foci est synonyme de déplétion en MBNL1 mais aussi MBNL2 ainsi qu'une expression accrue de 30% des protéines CUG-BP1 et CUG-BP2 (CELF1 et CELF2). En conséquence, de nombreux défauts d'épissages décrits chez l'humain ont été retrouvés dans le cerveau et le tronc cérébral des souris DMSXL touchant les transcrits *APP*, *GRIN1*, *MAPT* ou *MBNL1* (Hernandez-Hernandez et al., 2013). La comparaison des transcriptomes de cerveaux de souris DMSXL et de souris Knock-out MBNL2 montre un large recouvrement des modifications d'épissages. Cependant la contribution des protéines CELF est également retrouvée

comme attesté par le défaut d'épissage des exons 15 et 16 du transcrit *Fxr1* (Hernandez-Hernandez et al., 2013). Alternativement, la dérégulation des protéines MBNL et CELF participe à la modification de l'expression génique indépendamment de l'épissage. Ainsi, les protéines SYN1 et RAB3B, deux protéines importantes pour la plasticité synaptique, sont surexprimées dans les cerveaux de souris DMSXL via des mécanismes moléculaires dépendants de MBNL1 et CELF1 respectivement. Un autre acteur sous le contrôle de MBNL1 a également été identifié dans le cervelet : il s'agit du récepteur au glutamate GLUT1 (Sicot et al., 2017). Ces variations d'expression ou d'épissage de gènes concernent plusieurs composants pré et post-synaptiques (Figure 31) entraînant la perturbation de sa fonction mesurée par des expériences d'électrophysiologie dans les souris DMSXL et les souris EPA960 ainsi que par la dé-régulation des neuro-transmetteurs dosés dans les cerveaux des souris DMSXL.

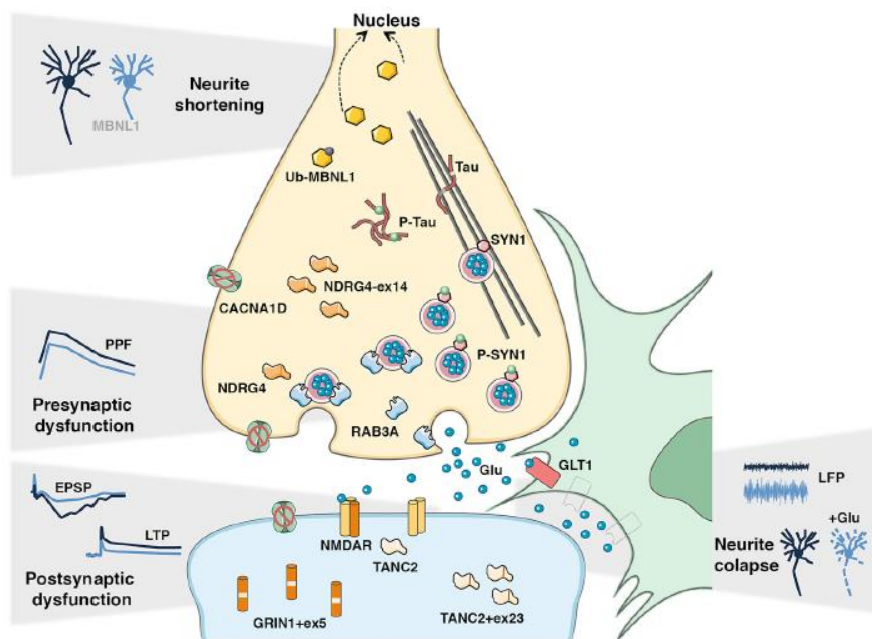


Figure 31. Altérations moléculaires associées au dysfonctionnement synaptique dans la DM1. Les altérations moléculaires mises en évidence dans le SNC de modèles de souris DM1 semblent impliquer à la fois des événements pré et post-synaptiques, qui conduisent à un dysfonctionnement synaptique global. Dans le compartiment pré-synaptique, l'hyperphosphorylation de SYN1, la surexpression de RAB3A et les défauts d'épissage de *Mapt / Tau*, *NdrG4* et *Cacna1d* contribuent à altérer la plasticité synaptique à court terme, notamment via la diminution de la facilitation des impulsions appariées (PPF) détectée dans les souris DMSXL. Dans le compartiment post-synaptique, les défauts d'épissage de *Grin1*, *Tanc2* et *Cacna1d* peuvent perturber le fonctionnement du récepteur NMDA voltage-dépendant, et par conséquent, et par conséquent les mécanismes de potentialisation à long terme (LTP) détectés chez les souris EpA960. Enfin, la réduction des niveaux de GLUT1 dans les astrocytes voisins entraîne probablement une hyperexcitabilité, démontrée par une augmentation de la potentialisation locale du champ (LFP) chez les souris DMSXL. La mauvaise localisation de MBNL1 dans le noyau suite à une désubiquitination anormale diminue la neuritogenèse et affecte la morphologie des neurones dans les souris EpA960. Ensemble, ces événements provoquent probablement une transmission synaptique défectueuse et une connectivité cérébrale anormale à l'origine des atteintes cognitives et comportementales observés dans la DM1 (Braz et al., 2018).

Par ailleurs, Wang et al décrivent une déplétion locale des protéines MBNL1/2 dans les neurites et axones des neurones corticaux DM1 altérant leur intégrité et aboutissant à la réduction de leur taille dans les souris EpA960/CaMKII-Cre (P. Y. Wang et al., 2017). Ce phénotype rappelle les défauts de distribution de neurones corticaux, la réduction de la complexité dendritique et les altérations des densités postsynaptiques observés dans les souris déplétées en protéines MBNL1/2 (J. Lee et al., 2019). Ces modèles animaux apportent une meilleure compréhension des processus physiologiques à l'origine des troubles psychomoteurs des patients DM1. Plusieurs dérégulations géniques, nouvellement identifiées dans les souris DMSXL, ont été validés dans des cerveaux de patients DM1 témoignant de la robustesse du modèle. Ceci explique leur utilisation pour évaluer l'efficacité et la biodistribution de nouveaux médicaments lors de leur phase de développement pré-clinique (M. Wang et al., 2019).

L'identification de composés chimiques thérapeutiques nécessite quant à elle des outils cellulaires adaptés au criblage à haut débit. Bien que des cellules de cerveau de souris DMXL puissent être mises en culture, des modèles cellulaires humains pouvant être largement amplifiés sont plus adaptés. Les cellules souches pluripotentes humaines sont particulièrement intéressantes pour ce type d'approche du fait de leurs propriétés cardinales présentées dans le chapitre 2. Les neurones dérivés d'IPS ou hES DM1 représentent de plus le seul modèle cellulaire neural humain exprimant le transcrite *DMPK* de façon physiologique. Des cellules progénitrices neuronales (NSC, Neural Stem Cell) et neurones ont également été utilisés pour le développement et la validation de nouveaux outils thérapeutiques utilisant la technologie CRISPR/ Cas9 avant leur utilisation in vivo (Gao et al., 2016; Y. Wang et al., 2018; Xia et al., 2015). En effet, on retrouve dans ces modèles cellulaires l'expression des transcrits mutants de *DMPK* conduisant à la formation des foci mais aussi les défauts d'épissage des transcrits *MAPT*, *GRIN*, *APP* et *MBNL1*. Parallèlement à ces applications, les dérivés neuronaux de CSPH hES DM1 ont contribué à la mise en évidence de dysfonctions de voies métaboliques (Denis et al., 2013) et l'étude de la dynamique des répétitions CTG dans le lignage neural (Du et al., 2013). Enfin, l'atteinte de cellules neurales en dehors du système nerveux central a été démontré pour la première fois grâce au potentiel de différenciation des CSPH en motoneurones (Marteyn et al., 2011). Outre la caractérisation descriptive de la présence des foci et des défauts d'épissages associés, il serait intéressant de pouvoir réaliser des tests d'électrophysiologie ou de flux calcique visant à caractériser des défauts fonctionnels de la communication entre les neurones DM1 comme ceux récemment développés dans l'équipe de Cécile Martinat pour étudier la communication entre les motoneurones et les myotubes DM1. Les organoïdes cérébraux et les assemblages associant des cellules saines et DM1 devraient favoriser la mise en évidence des défauts d'architecture cellulaire décrits chez les patients et dans les modèles murins de la maladie mais aussi l'étude des synapses incluant des astrocytes (A. M. Pasca et al., 2015).

Sur le versant de l'utilisation des CSPH pour l'étude de traitements pour la DM1, nous avons entamé un projet de caractérisation de l'effet de composés thérapeutiques sur le lignage neural en utilisant des NSCs et neurones corticaux dérivés d'IPS DM1 dérivés dans le laboratoire. Ce projet s'appuie sur trois constats : 1°) de nouveaux traitements ayant recours à des oligonucléotides ou la stratégie de CRISPR/Cas9 sont développés pour la DM1 mais leur délivrance et efficacité dans l'ensemble des organes touchés par la DM1, y compris le cerveau, reste à démontrer. 2°) L'efficacité des composés chimiques candidats n'a pas été caractérisée sur le lignage neural et 3°) Un essai clinique européen multicentrique visant à stimuler les fonctions cognitives des patients DM1 améliore des paramètres de leur qualité de vie mais aussi leur performance physique dans un test de marche de 6 minutes (6MWT)

(Okkersen et al., 2018). C'est dans le cadre du consortium Européen E-Rare « Recognition », faisant suite à l'essai Optimistic, que nous testons l'effet de cinq molécules : la Metformine (ciblant l'AMPK), le Tidéglusib (ciblant la GSK3 β), le PD0325901 (ciblant la voie MEK/ERK) et deux inhibiteurs d'histone acétyl transférase : le SAHA et le LBH589 sur le lignage neural. L'utilisation de ces molécules chez l'Homme a été approuvée par la FDA (Food And Drug Administration) et deux d'entre elles sont actuellement en essai clinique de phase III pour le traitement de la DM1 (Metformine et le Tidéglusib). Le LBH589 a été identifié dans le laboratoire par le Dr Cécile Martinat à l'issue d'un crible de composés ciblant l'expression du transcrit de la *DMPK* (Manuscrit en préparation). L'effet de ce composé a été validé in vitro pour sa capacité à inhiber la formation de foci et corriger des épissages associés à la DM1. Nous avons testé les composés seuls ou en combinaison avec la metformine afin d'explorer un potentiel effet synergique entre eux. Les combinatoires présentant le plus d'efficacité correspondent à la metformine combinée aux deux inhibiteurs de HDAC : le SAHA et le LBH589. Ces combinatoires montrent un effet important à des doses plus faibles de composés sur la détection des foci et la correction différents épissages (*MBNL1* exon 5, *MAPT* exon 2,3 et 10, *DMD* exon 78) dans les NSC et neurones DM1. Pour la suite de ce projet, je souhaiterai d'une part évaluer l'effet de ces traitements sur les neurones DM1 au niveau fonctionnel mais aussi progresser dans la compréhension de leur mécanisme d'action.

En tirant profit du potentiel de différenciation des IPS DM1, je souhaiterai caractériser dans les myoblastes et neurones les effets de ces composés sur les séquences régulatrices du gène *DMPK* par des expériences d'ATAC-seq. Nous rechercherons ainsi un effet du LBH589 sur la facilitation d'accès de la chromatine aux facteurs de transcription. Une fois que nous aurons pu cartographier les sites nouvellement accessibles à la fixation de facteurs de transcription suite aux traitement par le LBH589, la metformine et les deux composés, nous procéderons à des délétions de ces séquences d'intérêt par la technologie CRISPR/Cas9 afin de déterminer la contribution de chacune d'entre elles dans l'expression du transcrit *DMPK* dans les neurones, myoblastes et MPCs. Ces délétions devraient nous permettre d'établir une liste restreinte de facteurs de transcription connus pour se fixer dans ces régions (Buckley, Lacey, & Ehrlich, 2016). En utilisant une approche de CRISPRi, nous pourrions finalement affiner la liste des candidats et théoriquement identifier des mécanismes de contrôle de la régulation du gène *DMPK* dans les neurones et les myoblastes. Ces expériences contribueront à identifier des nouvelles cibles thérapeutiques pour la DM1 qui pourraient de plus être tissu spécifiques. De telles interactions pourront être soumises à un crible thérapeutique de composés en utilisant un test alpha-lysate d'interaction entre des acides nucléiques et des protéines. Ce crible pourrait contribuer à l'identification de molécules chimiques ciblant spécifiquement l'expression de la *DMPK* dans le cerveau ou les myoblastes et éviterai des effets « off-target » générés par des composés dotés d'un spectre d'action plus large sur la transcription.

Un second projet important à mes yeux consisterait en la caractérisation des altérations neurales de la DM1 dans des organoïdes cérébraux à partir de lignées d'IPS mutées. Pasca et al ont mis au point un modèle « simple et reproductible » pour modéliser en 3D une structure semblable à un cortex pluristratifié, appelé sphéroïdes corticaux à partir de CSpH. L'un des atouts des sphéroïdes est leur composition mixte en neurones corticaux et astrocytes, ce qui les rend plus pertinents physiologiquement qu'une culture neuronale pure. Les neurones présentent une activité spontanée enregistrée en électrophysiologie témoignant de la formation de synapses (A. M. Pasca et al., 2015). De tels outils seraient précieux pour modéliser les atteintes neurales de formes congénitales de la DM1.

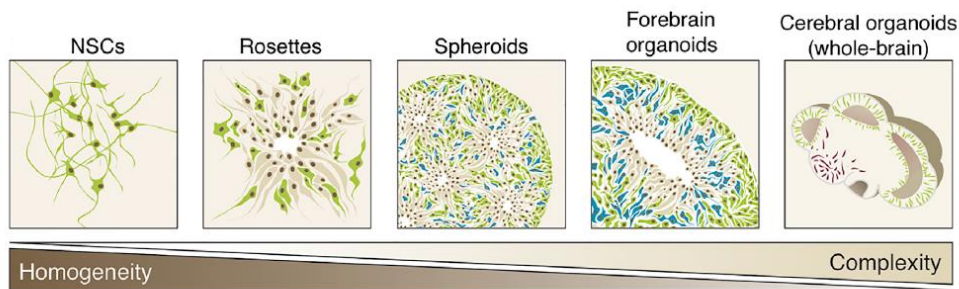


Figure 32. Schéma représentant le compromis entre l'homogénéité et la complexité cellulaire selon les modèles cellulaires pouvant être développés à partir de cellules souches pluripotentes humaines (Kelava & Lancaster, 2016).

La structure des synapses et leur fonctionnalité pourrait être comparées à celles obtenues à partir d'IPS dépourvue des expressions de MBNL1 et MBNL2, générées par la technologie CRISPR/Cas9 dans l'équipe du Dr Cécile Martinat. Enfin, si des altérations peuvent être constatées, il serait intéressant de soumettre ces organoïdes à un crible de composés chimiques comme décrit par Woodruff et al (Woodruff et al., 2020). Dans cette étude, les auteurs décrivent une activité neuronale spontanée, rythmique et hautement synchronisée des cultures 3D de neurones corticaux et d'astrocytes. Cette activité peut être visualisée sous forme d'oscillations de calcium sur des lecteurs fluorescents à haut débit standards. L'activité spontanée des sphéroïdes utilisés est homogène dans les différents puits analysés et modulable par des composés de référence tels que la tétrodontoxine démontrant la présence de circuits neuronaux fonctionnellement intégrés. Pour tester la robustesse de l'approche, les auteurs ont utilisé ces sphéroïdes pour le criblage de la banque de composés chimiques LOPAC dont 8,7% des molécules testées ont impacté l'activité du réseau neuronal. Ainsi, l'amélioration de l'activité spontanée de tels organoïdes DM1 lors d'un criblage de composés chimiques pourrait révéler de l'effet d'un composé ayant un impact global sur les différentes atteintes de la DM1 dans les cellules neuronales.

Références

- Al Tanoury, Z., Rao, J., Tassy, O., Gobert, B., Gapon, S., Garnier, J. M., . . . Pourquie, O. (2020). Differentiation of the human PAX7-positive myogenic precursors/satellite cell lineage in vitro. *Development*, *147*(12). doi: 10.1242/dev.187344
- Alwazzan, M., Newman, E., Hamshere, M. G., & Brook, J. D. (1999). Myotonic dystrophy is associated with a reduced level of RNA from the DMWD allele adjacent to the expanded repeat. *Hum Mol Genet*, *8*(8), 1491-1497. doi: 10.1093/hmg/8.8.1491
- Amin, N. D., & Pasca, S. P. (2018). Building Models of Brain Disorders with Three-Dimensional Organoids. *Neuron*, *100*(2), 389-405. doi: 10.1016/j.neuron.2018.10.007
- Amit, M., Shariki, C., Margulets, V., & Itskovitz-Eldor, J. (2004). Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biol Reprod*, *70*(3), 837-845. doi: 10.1095/biolreprod.103.021147
- Andersen, J., Revah, O., Miura, Y., Thom, N., Amin, N. D., Kelley, K. W., . . . Pasca, S. P. (2020). Generation of Functional Human 3D Cortico-Motor Assembloids. *Cell*, *183*(7), 1913-1929 e1926. doi: 10.1016/j.cell.2020.11.017
- Annane, D., Fiorelli, M., Mazoyer, B., Pappata, S., Eymard, B., Radvanyi, H., . . . Duboc, D. (1998). Impaired cerebral glucose metabolism in myotonic dystrophy: a triplet-size dependent phenomenon. *Neuromuscul Disord*, *8*(1), 39-45. doi: 10.1016/s0960-8966(97)00144-2
- Arai, T., Nonaka, T., Hasegawa, M., Akiyama, H., Yoshida, M., Hashizume, Y., . . . Ikeda, K. (2003). Neuronal and glial inclusions in frontotemporal dementia with or without motor neuron disease are immunopositive for p62. *Neurosci Lett*, *342*(1-2), 41-44. doi: 10.1016/s0304-3940(03)00216-7
- Arandel, L., Polay Espinoza, M., Matloka, M., Bazinet, A., De Dea Diniz, D., Naouar, N., . . . Furling, D. (2017). Immortalized human myotonic dystrophy muscle cell lines to assess therapeutic compounds. *Dis Model Mech*, *10*(4), 487-497. doi: 10.1242/dmm.027367
- Ashizawa, T., Dubel, J. R., & Harati, Y. (1993). Somatic instability of CTG repeat in myotonic dystrophy. *Neurology*, *43*(12), 2674-2678. doi: 10.1212/wnl.43.12.2674
- Avilion, A. A., Nicolis, S. K., Pevny, L. H., Perez, L., Vivian, N., & Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev*, *17*(1), 126-140. doi: 10.1101/gad.224503
- Avior, Y., Sagi, I., & Benvenisty, N. (2016). Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *17*(3), 170-182. doi: 10.1038/nrm.2015.27
- Baghdoyan, S., Dubreuil, P., Eberle, F., & Gomez, S. (2000). Capture of cytokine-responsive genes (NACA and RBM3) using a gene trap approach. *Blood*, *95*(12), 3750-3757.
- Baghdoyan, S., Lamartine, J., Castel, D., Pitaval, A., Roupioz, Y., Franco, N., . . . Gidrol, X. (2005). Id2 reverses cell cycle arrest induced by γ -irradiation in human HaCaT keratinocytes. *J Biol Chem*, *280*(16), 15836-15841. doi: 10.1074/jbc.M414216200
- Baghdoyan, S., Roupioz, Y., Pitaval, A., Castel, D., Khomyakova, E., Papine, A., . . . Gidrol, X. (2004). Quantitative analysis of highly parallel transfection in cell microarrays. *Nucleic Acids Res*, *32*(9), e77. doi: 10.1093/nar/gnh074
- Baldanzi, S., Cecchi, P., Fabbri, S., Pesaresi, I., Simoncini, C., Angelini, C., . . . Siciliano, G. (2016). Relationship between neuropsychological impairment and grey and white matter changes in adult-onset myotonic dystrophy type 1. *Neuroimage Clin*, *12*, 190-197. doi: 10.1016/j.nicl.2016.06.011
- Ballester-Lopez, A., Koehorst, E., Linares-Pardo, I., Nunez-Manchon, J., Almendrote, M., Lucente, G., . . . Nogales-Gadea, G. (2020). Preliminary Findings on CTG Expansion Determination in Different Tissues from Patients with Myotonic Dystrophy Type 1. *Genes (Basel)*, *11*(11). doi: 10.3390/genes11111321

- Barrault, L., Gide, J., Qing, T., Lesueur, L., Tost, J., Denis, J. A., . . . Baghdoyan, S. (2019). Expression of miRNAs from the Imprinted DLK1/DIO3 Locus Signals the Osteogenic Potential of Human Pluripotent Stem Cells. *Cells*, *8*(12). doi: 10.3390/cells8121523
- Bartolome, F., Esteras, N., Martin-Requero, A., Boutoleau-Bretonniere, C., Vercelletto, M., Gabelle, A., . . . Abramov, A. Y. (2017). Pathogenic p62/SQSTM1 mutations impair energy metabolism through limitation of mitochondrial substrates. *Sci Rep*, *7*(1), 1666. doi: 10.1038/s41598-017-01678-4
- Bassez, G., Audureau, E., Hogrel, J. Y., Arrouasse, R., Baghdoyan, S., Bhugaloo, H., . . . Peschanski, M. (2018). Improved mobility with metformin in patients with myotonic dystrophy type 1: a randomized controlled trial. *Brain*, *141*(10), 2855-2865. doi: 10.1093/brain/awy231
- Batra, R., Nelles, D. A., Pirie, E., Blue, S. M., Marina, R. J., Wang, H., . . . Yeo, G. W. (2017). Elimination of Toxic Microsatellite Repeat Expansion RNA by RNA-Targeting Cas9. *Cell*, *170*(5), 899-912 e810. doi: 10.1016/j.cell.2017.07.010
- Batra, R., Nelles, D. A., Roth, D. M., Krach, F., Nutter, C. A., Tadokoro, T., . . . Yeo, G. W. (2021). The sustained expression of Cas9 targeting toxic RNAs reverses disease phenotypes in mouse models of myotonic dystrophy type 1. *Nat Biomed Eng*, *5*(2), 157-168. doi: 10.1038/s41551-020-00607-7
- Bellin, M., Marchetto, M. C., Gage, F. H., & Mummery, C. L. (2012). Induced pluripotent stem cells: the new patient? *Nat Rev Mol Cell Biol*, *13*(11), 713-726. doi: 10.1038/nrm3448
- Bershteyn, M., Hayashi, Y., Desachy, G., Hsiao, E. C., Sami, S., Tsang, K. M., . . . Wynshaw-Boris, A. (2014). Cell-autonomous correction of ring chromosomes in human induced pluripotent stem cells. *Nature*, *507*(7490), 99-103. doi: 10.1038/nature12923
- Berul, C. I., Maguire, C. T., Aronovitz, M. J., Greenwood, J., Miller, C., Gehrman, J., . . . Reddy, S. (1999). DMPK dosage alterations result in atrioventricular conduction abnormalities in a mouse myotonic dystrophy model. *J Clin Invest*, *103*(4), R1-7. doi: 10.1172/JCI5346
- Birey, F., Andersen, J., Makinson, C. D., Islam, S., Wei, W., Huber, N., . . . Pasca, S. P. (2017). Assembly of functionally integrated human forebrain spheroids. *Nature*, *545*(7652), 54-59. doi: 10.1038/nature22330
- Brady, O. A., Meng, P., Zheng, Y., Mao, Y., & Hu, F. (2011). Regulation of TDP-43 aggregation by phosphorylation and p62/SQSTM1. *J Neurochem*, *116*(2), 248-259. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.07098.x
- Braz, S. O., Acquire, J., Gourdon, G., & Gomes-Pereira, M. (2018). Of Mice and Men: Advances in the Understanding of Neuromuscular Aspects of Myotonic Dystrophy. *Front Neurol*, *9*, 519. doi: 10.3389/fneur.2018.00519
- Briggs, R., & King, T. J. (1952). Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *38*(5), 455-463. doi: 10.1073/pnas.38.5.455
- Brockhoff, M., Rion, N., Chojnowska, K., Wiktorowicz, T., Eickhorst, C., Erne, B., . . . Castets, P. (2017). Targeting deregulated AMPK/mTORC1 pathways improves muscle function in myotonic dystrophy type I. *J Clin Invest*, *127*(2), 549-563. doi: 10.1172/JCI89616
- Brook, J. D., McCurrach, M. E., Harley, H. G., Buckler, A. J., Church, D., Aburatani, H., . . . 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*, *68*(4), 799-808. doi: 10.1016/0092-8674(92)90154-5
- Broussalis, E., Grinzinger, S., Kunz, A. B., Killer-Oberpfalzer, M., Haschke-Becher, E., Hartung, H. P., & Kraus, J. (2018). Late age onset of amyotrophic lateral sclerosis is often not considered in elderly people. *Acta Neurol Scand*, *137*(3), 329-334. doi: 10.1111/ane.12869
- Buckley, L., Lacey, M., & Ehrlich, M. (2016). Epigenetics of the myotonic dystrophy-associated DMPK gene neighborhood. *Epigenomics*, *8*(1), 13-31. doi: 10.2217/epi.15.104
- Burkhardt, M. F., Martinez, F. J., Wright, S., Ramos, C., Volfson, D., Mason, M., . . . Javaherian, A. (2013). A cellular model for sporadic ALS using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Mol Cell Neurosci*, *56*, 355-364. doi: 10.1016/j.mcn.2013.07.007

- Burnett, L. C., LeDuc, C. A., Sulsona, C. R., Paull, D., Eddiry, S., Levy, B., . . . Leibel, R. L. (2016). Induced pluripotent stem cells (iPSC) created from skin fibroblasts of patients with Prader-Willi syndrome (PWS) retain the molecular signature of PWS. *Stem Cell Res*, *17*(3), 526-530. doi: 10.1016/j.scr.2016.08.008
- Carbognin, E., Betto, R. M., Soriano, M. E., Smith, A. G., & Martello, G. (2016). Stat3 promotes mitochondrial transcription and oxidative respiration during maintenance and induction of naive pluripotency. *EMBO J*, *35*(6), 618-634. doi: 10.15252/embj.201592629
- Carrell, S. T., Carrell, E. M., Auerbach, D., Pandey, S. K., Bennett, C. F., Dirksen, R. T., & Thornton, C. A. (2016). Dmpk gene deletion or antisense knockdown does not compromise cardiac or skeletal muscle function in mice. *Hum Mol Genet*, *25*(19), 4328-4338. doi: 10.1093/hmg/ddw266
- Cattanach, B. M., & Kirk, M. (1985). Differential activity of maternally and paternally derived chromosome regions in mice. *Nature*, *315*(6019), 496-498. doi: 10.1038/315496a0
- Chakraborty, M., Sellier, C., Ney, M., Pascal, V., Charlet-Berguerand, N., Artero, R., & Llamusi, B. (2018). Daunorubicin reduces MBNL1 sequestration caused by CUG-repeat expansion and rescues cardiac dysfunctions in a Drosophila model of myotonic dystrophy. *Dis Model Mech*, *11*(4). doi: 10.1242/dmm.032557
- Chal, J., Al Tanoury, Z., Oginuma, M., Moncuquet, P., Gobert, B., Miyanari, A., . . . Pourquie, O. (2018). Recapitulating early development of mouse musculoskeletal precursors of the paraxial mesoderm in vitro. *Development*, *145*(6). doi: 10.1242/dev.157339
- Chamberlain, S. J., Chen, P. F., Ng, K. Y., Bourgois-Rocha, F., Lemtiri-Chlieh, F., Levine, E. S., & Lalande, M. (2010). Induced pluripotent stem cell models of the genomic imprinting disorders Angelman and Prader-Willi syndromes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(41), 17668-17673. doi: 10.1073/pnas.1004487107
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., & Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, *113*(5), 643-655. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00392-1
- Charlet, B. N., Savkur, R. S., Singh, G., Philips, A. V., Grice, E. A., & Cooper, T. A. (2002). Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol Cell*, *10*(1), 45-53. doi: 10.1016/s1097-2765(02)00572-5
- Chen, G., Masuda, A., Konishi, H., Ohkawara, B., Ito, M., Kinoshita, M., . . . Ohno, K. (2016). Phenylbutazone induces expression of MBNL1 and suppresses formation of MBNL1-CUG RNA foci in a mouse model of myotonic dystrophy. *Sci Rep*, *6*, 25317. doi: 10.1038/srep25317
- Chen, S., Jia, L., Zhang, S., Zheng, Y., & Zhou, Y. (2018). DEPTOR regulates osteogenic differentiation via inhibiting MEG3-mediated activation of BMP4 signaling and is involved in osteoporosis. *Stem Cell Res Ther*, *9*(1), 185. doi: 10.1186/s13287-018-0935-9
- da Rocha, S. T., Tevendale, M., Knowles, E., Takada, S., Watkins, M., & Ferguson-Smith, A. C. (2007). Restricted co-expression of Dlk1 and the reciprocally imprinted non-coding RNA, Gtl2: implications for cis-acting control. *Dev Biol*, *306*(2), 810-823. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.02.043
- Dansithong, W., Paul, S., Comai, L., & Reddy, S. (2005). MBNL1 is the primary determinant of focus formation and aberrant insulin receptor splicing in DM1. *J Biol Chem*, *280*(7), 5773-5780. doi: 10.1074/jbc.M410781200
- Davis, R. L., Weintraub, H., & Lassar, A. B. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*, *51*(6), 987-1000. doi: 10.1016/0092-8674(87)90585-x
- De Temmerman, N., Seneca, S., Van Steirteghem, A., Haentjens, P., Van der Elst, J., Liebaers, I., & Sermon, K. D. (2008). CTG repeat instability in a human embryonic stem cell line carrying the myotonic dystrophy type 1 mutation. *Mol Hum Reprod*, *14*(7), 405-412. doi: 10.1093/molehr/gan034
- Deng, Z., Lim, J., Wang, Q., Purtell, K., Wu, S., Palomo, G. M., . . . Yue, Z. (2020). ALS-FTLD-linked mutations of SQSTM1/p62 disrupt selective autophagy and NFE2L2/NRF2 anti-oxidative stress pathway. *Autophagy*, *16*(5), 917-931. doi: 10.1080/15548627.2019.1644076

- Denis, J. A., Gauthier, M., Rachdi, L., Aubert, S., Giraud-Triboulet, K., Poydenot, P., . . . Martinat, C. (2013). mTOR-dependent proliferation defect in human ES-derived neural stem cells affected by myotonic dystrophy type 1. *J Cell Sci*, *126*(Pt 8), 1763-1772. doi: 10.1242/jcs.116285
- DeRosa, B. A., Van Baaren, J. M., Dubey, G. K., Lee, J. M., Cuccaro, M. L., Vance, J. M., . . . Dykxhoorn, D. M. (2012). Derivation of autism spectrum disorder-specific induced pluripotent stem cells from peripheral blood mononuclear cells. *Neurosci Lett*, *516*(1), 9-14. doi: 10.1016/j.neulet.2012.02.086
- Dhaenens, C. M., Tran, H., Frandemiche, M. L., Carpentier, C., Schraen-Maschke, S., Sistiaga, A., . . . Sergeant, N. (2011). Mis-splicing of Tau exon 10 in myotonic dystrophy type 1 is reproduced by overexpression of CELF2 but not by MBNL1 silencing. *Biochim Biophys Acta*, *1812*(7), 732-742. doi: 10.1016/j.bbadis.2011.03.010
- Dick, E., Kalra, S., Anderson, D., George, V., Ritson, M., Laval, S., . . . Denning, C. (2013). Exon skipping and gene transfer restore dystrophin expression in hiPSC-cardiomyocytes harbouring DMD mutations. *Stem Cells Dev*. doi: 10.1089/2013.0135
- Doi, H., Adachi, H., Katsuno, M., Minamiyama, M., Matsumoto, S., Kondo, N., . . . Sobue, G. (2013). p62/SQSTM1 differentially removes the toxic mutant androgen receptor via autophagy and inclusion formation in a spinal and bulbar muscular atrophy mouse model. *J Neurosci*, *33*(18), 7710-7727. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3021-12.2013
- Draper, J. S., Moore, H. D., Ruban, L. N., Gokhale, P. J., & Andrews, P. W. (2004). Culture and characterization of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*, *13*(4), 325-336. doi: 10.1089/scd.2004.13.325
- Draper, J. S., Smith, K., Gokhale, P., Moore, H. D., Maltby, E., Johnson, J., . . . Andrews, P. W. (2004). Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, *22*(1), 53-54. doi: 10.1038/nbt922
- Du, J., Campau, E., Soragni, E., Jespersen, C., & Gottesfeld, J. M. (2013). Length-dependent CTG.CAG triplet-repeat expansion in myotonic dystrophy patient-derived induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet*, *22*(25), 5276-5287. doi: 10.1093/hmg/ddt386
- Dvir, T., Timko, B. P., Brigham, M. D., Naik, S. R., Karajanagi, S. S., Levy, O., . . . Kohane, D. S. (2011). Nanowired three-dimensional cardiac patches. *Nat Nanotechnol*, *6*(11), 720-725. doi: 10.1038/nnano.2011.160
- Dvorak, P., Dvorakova, D., Koskova, S., Vodinska, M., Najvirtova, M., Krekac, D., & Hampl, A. (2005). Expression and potential role of fibroblast growth factor 2 and its receptors in human embryonic stem cells. *Stem Cells*, *23*(8), 1200-1211. doi: 10.1634/stemcells.2004-0303
- Ebert, A. D., Yu, J., Rose, F. F., Jr., Mattis, V. B., Lorson, C. L., Thomson, J. A., & Svendsen, C. N. (2009). Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*, *457*(7227), 277-280. doi: 10.1038/nature07677
- Edwards, C. A., & Ferguson-Smith, A. C. (2007). Mechanisms regulating imprinted genes in clusters. *Curr Opin Cell Biol*, *19*(3), 281-289. doi: 10.1016/j.ceb.2007.04.013
- Eiges, R., Urbach, A., Malcov, M., Frumkin, T., Schwartz, T., Amit, A., . . . Ben-Yosef, D. (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. doi: 10.1016/j.stem.2007.09.001
- Eiraku, M., Takata, N., Ishibashi, H., Kawada, M., Sakakura, E., Okuda, S., . . . Sasai, Y. (2011). Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature*, *472*(7341), 51-56. doi: 10.1038/nature09941
- Evans, M. J., & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, *292*(5819), 154-156. doi: 10.1038/292154a0
- Fardaei, M., Larkin, K., Brook, J. D., & Hamshere, M. G. (2001). In vivo co-localisation of MBNL protein with DMPK expanded-repeat transcripts. *Nucleic Acids Res*, *29*(13), 2766-2771. doi: 10.1093/nar/29.13.2766
- Fardaei, M., Rogers, M. T., Thorpe, H. M., Larkin, K., Hamshere, M. G., Harper, P. S., & Brook, J. D. (2002). Three proteins, MBNL, MBLL and MBXL, co-localize in vivo with nuclear foci of

- expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells. *Hum Mol Genet*, 11(7), 805-814. doi: 10.1093/hmg/11.7.805
- Fecto, F., Yan, J., Vemula, S. P., Liu, E., Yang, Y., Chen, W., . . . Siddique, T. (2011). SQSTM1 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol*, 68(11), 1440-1446. doi: 10.1001/archneurol.2011.250
- Foff, E. P., & Mahadevan, M. S. (2011). Therapeutics development in myotonic dystrophy type 1. *Muscle Nerve*, 44(2), 160-169. doi: 10.1002/mus.22090
- Foiry, L., Dong, L., Savouret, C., Hubert, L., te Riele, H., Junien, C., & Gourdon, G. (2006). Msh3 is a limiting factor in the formation of intergenerational CTG expansions in DM1 transgenic mice. *Hum Genet*, 119(5), 520-526. doi: 10.1007/s00439-006-0164-7
- Foster, A. D., Downing, P., Figredo, E., Polain, N., Stott, A., Layfield, R., & Rea, S. L. (2020). ALS-associated TBK1 variant p.G175S is defective in phosphorylation of p62 and impacts TBK1-mediated signalling and TDP-43 autophagic degradation. *Mol Cell Neurosci*, 108, 103539. doi: 10.1016/j.mcn.2020.103539
- Freyermuth, F., Rau, F., Kokunai, Y., Linke, T., Sellier, C., Nakamori, M., . . . Charlet-Berguerand, N. (2016). Splicing misregulation of SCN5A contributes to cardiac-conduction delay and heart arrhythmia in myotonic dystrophy. *Nat Commun*, 7, 11067. doi: 10.1038/ncomms11067
- Frost, J. M., & Moore, G. E. (2010). The importance of imprinting in the human placenta. *PLoS Genet*, 6(7), e1001015. doi: 10.1371/journal.pgen.1001015
- Fu, Y. H., Friedman, D. L., Richards, S., Pearlman, J. A., Gibbs, R. A., Pizzuti, A., . . . et al. (1993). Decreased expression of myotonin-protein kinase messenger RNA and protein in adult form of myotonic dystrophy. *Science*, 260(5105), 235-238. doi: 10.1126/science.8469976
- Fugier, C., Klein, A. F., Hammer, C., Vassilopoulos, S., Ivarsson, Y., Toussaint, A., . . . Charlet-Berguerand, N. (2011). Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy. *Nat Med*, 17(6), 720-725. doi: 10.1038/nm.2374
- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., & Hasegawa, M. (2009). 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. doi: 10.2183/pjab.85.348
- Gafni, O., Weinberger, L., Mansour, A. A., Manor, Y. S., Chomsky, E., Ben-Yosef, D., . . . Hanna, J. H. (2013). Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature*, 504(7479), 282-286. doi: 10.1038/nature12745
- Gal, J., Strom, A. L., Kwinter, D. M., Kilty, R., Zhang, J., Shi, P., . . . Zhu, H. (2009). Sequestosome 1/p62 links familial ALS mutant SOD1 to LC3 via an ubiquitin-independent mechanism. *J Neurochem*, 111(4), 1062-1073. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06388.x
- Gallais, B., Gagnon, C., Mathieu, J., & Richer, L. (2017). Cognitive decline over time in adults with myotonic dystrophy type 1: A 9-year longitudinal study. *Neuromuscul Disord*, 27(1), 61-72. doi: 10.1016/j.nmd.2016.10.003
- Gao, Y., Guo, X., Santostefano, K., Wang, Y., Reid, T., Zeng, D., . . . Xia, G. (2016). Genome Therapy of Myotonic Dystrophy Type 1 iPS Cells for Development of Autologous Stem Cell Therapy. *Mol Ther*, 24(8), 1378-1387. doi: 10.1038/mt.2016.97
- Garcia-Puga, M., Saenz-Antonanzas, A., Fernandez-Torron, R., Munain, A. L., & Matheu, A. (2020). Myotonic Dystrophy type 1 cells display impaired metabolism and mitochondrial dysfunction that are reversed by metformin. *Aging (Albany NY)*, 12(7), 6260-6275. doi: 10.18632/aging.103022
- Gardner, D. K., & Lane, M. (1998). Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. *Hum Reprod*, 13 Suppl 3, 148-159; discussion 160. doi: 10.1093/humrep/13.suppl_3.148
- Gennarelli, M., Lucarelli, M., Zelano, G., Pizzuti, A., Novelli, G., & Dallapiccola, B. (1995). Different expression of the myotonin protein kinase gene in discrete areas of human brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 216(2), 489-494. doi: 10.1006/bbrc.1995.2649

- Geuens, T., Bouhy, D., & Timmerman, V. (2016). The hnRNP family: insights into their role in health and disease. *Hum Genet*, *135*(8), 851-867. doi: 10.1007/s00439-016-1683-5
- Gomes-Pereira, M., Cooper, T. A., & Gourdon, G. (2011). Myotonic dystrophy mouse models: towards rational therapy development. *Trends Mol Med*, *17*(9), 506-517. doi: 10.1016/j.molmed.2011.05.004
- Goode, A., Butler, K., Long, J., Cavey, J., Scott, D., Shaw, B., . . . Layfield, R. (2016). Defective recognition of LC3B by mutant SQSTM1/p62 implicates impairment of autophagy as a pathogenic mechanism in ALS-FTLD. *Autophagy*, *12*(7), 1094-1104. doi: 10.1080/15548627.2016.1170257
- Goodwin, M., Mohan, A., Batra, R., Lee, K. Y., Charizanis, K., Fernandez Gomez, F. J., . . . Swanson, M. S. (2015). MBNL Sequestration by Toxic RNAs and RNA Misplicing in the Myotonic Dystrophy Brain. *Cell Rep*, *12*(7), 1159-1168. doi: 10.1016/j.celrep.2015.07.029
- Gourdon, G., & Meola, G. (2017). Myotonic Dystrophies: State of the Art of New Therapeutic Developments for the CNS. *Front Cell Neurosci*, *11*, 101. doi: 10.3389/fncel.2017.00101
- Gribaudo, S., Tixador, P., Bousset, L., Fenyi, A., Lino, P., Melki, R., . . . Perrier, A. L. (2019). Propagation of alpha-Synuclein Strains within Human Reconstructed Neuronal Network. *Stem Cell Reports*, *12*(2), 230-244. doi: 10.1016/j.stemcr.2018.12.007
- Gurdon, J. B., Laskey, R. A., & Reeves, O. R. (1975). The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized skin cells of adult frogs. *J Embryol Exp Morphol*, *34*(1), 93-112.
- Habib, O., Habib, G., Moon, S. H., Hong, K. S., Do, J. T., Choi, Y., . . . Chung, H. M. (2014). Ground-state conditions promote robust Prdm14 reactivation and maintain an active Dlk1-Dio3 region during reprogramming. *Mol Cells*, *37*(1), 31-35. doi: 10.14348/molcells.2014.2212
- Hadano, S., Mitsui, S., Pan, L., Otomo, A., Kubo, M., Sato, K., . . . Yoshii, F. (2016). Functional links between SQSTM1 and ALS2 in the pathogenesis of ALS: cumulative impact on the protection against mutant SOD1-mediated motor dysfunction in mice. *Hum Mol Genet*, *25*(15), 3321-3340. doi: 10.1093/hmg/ddw180
- Hanna, J., Cheng, A. W., Saha, K., Kim, J., Lengner, C. J., Soldner, F., . . . Jaenisch, R. (2010). Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(20), 9222-9227. doi: 10.1073/pnas.1004584107
- Heatwole, C., Luebke, E., Rosero, S., Eichinger, K., Martens, W., Hilbert, J., . . . Moxley, R., 3rd. (2021). Mexiletine in Myotonic Dystrophy Type 1: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Neurology*, *96*(2), e228-e240. doi: 10.1212/WNL.00000000000011002
- Hernandez-Hernandez, O., Guiraud-Dogan, C., Sicot, G., Huguet, A., Luillier, S., Steidl, E., . . . Gomes-Pereira, M. (2013). Myotonic dystrophy CTG expansion affects synaptic vesicle proteins, neurotransmission and mouse behaviour. *Brain*, *136*(Pt 3), 957-970. doi: 10.1093/brain/aws367
- Hino, S., Kondo, S., Sekiya, H., Saito, A., Kanemoto, S., Murakami, T., . . . Imaizumi, K. (2007). Molecular mechanisms responsible for aberrant splicing of SERCA1 in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet*, *16*(23), 2834-2843. doi: 10.1093/hmg/ddm239
- Hirano, M., Nakamura, Y., Saigoh, K., Sakamoto, H., Ueno, S., Isono, C., . . . Kusunoki, S. (2013). Mutations in the gene encoding p62 in Japanese patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, *80*(5), 458-463. doi: 10.1212/WNL.0b013e31827f0fe5
- Ho, T. H., Bundman, D., Armstrong, D. L., & Cooper, T. A. (2005). Transgenic mice expressing CUG-BP1 reproduce splicing mis-regulation observed in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet*, *14*(11), 1539-1547. doi: 10.1093/hmg/ddi162
- Ho, T. H., Charlet, B. N., Poulos, M. G., Singh, G., Swanson, M. S., & Cooper, T. A. (2004). Muscleblind proteins regulate alternative splicing. *EMBO J*, *23*(15), 3103-3112. doi: 10.1038/sj.emboj.7600300
- Hore, T. A., Rapkins, R. W., & Graves, J. A. (2007). Construction and evolution of imprinted loci in mammals. *Trends Genet*, *23*(9), 440-448. doi: 10.1016/j.tig.2007.07.003
- Horrigan, J., Gomes, T. B., Snape, M., Nikolenko, N., McMorn, A., Evans, S., . . . Lochmuller, H. (2020). A Phase 2 Study of AMO-02 (Tideglusib) in Congenital and Childhood-Onset Myotonic Dystrophy Type 1 (DM1). *Pediatr Neurol*, *112*, 84-93. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2020.08.001

- Hoskins, J. W., Ofori, L. O., Chen, C. Z., Kumar, A., Sobczak, K., Nakamori, M., . . . Thornton, C. A. (2014). Lomofungin and dilomofungin: inhibitors of MBNL1-CUG RNA binding with distinct cellular effects. *Nucleic Acids Res*, *42*(10), 6591-6602. doi: 10.1093/nar/gku275
- Howeler, C. J., Busch, H. F., Geraedts, J. P., Niermeijer, M. F., & Staal, A. (1989). Anticipation in myotonic dystrophy: fact or fiction? *Brain*, *112* (Pt 3), 779-797. doi: 10.1093/brain/112.3.779
- Hubert, L., Jr., Lin, Y., Dion, V., & Wilson, J. H. (2011). Topoisomerase 1 and single-strand break repair modulate transcription-induced CAG repeat contraction in human cells. *Mol Cell Biol*, *31*(15), 3105-3112. doi: 10.1128/MCB.05158-11
- Huguet, A., Medja, F., Nicole, A., Vignaud, A., Guiraud-Dogan, C., Ferry, A., . . . Gourdon, G. (2012). Molecular, physiological, and motor performance defects in DMSXL mice carrying >1,000 CTG repeats from the human DM1 locus. *PLoS Genet*, *8*(11), e1003043. doi: 10.1371/journal.pgen.1003043
- Huichalaf, C., Sakai, K., Jin, B., Jones, K., Wang, G. L., Schoser, B., . . . Timchenko, L. (2010). Expansion of CUG RNA repeats causes stress and inhibition of translation in myotonic dystrophy 1 (DM1) cells. *FASEB J*, *24*(10), 3706-3719. doi: 10.1096/fj.09-151159
- Iefremova, V., Manikakis, G., Krefft, O., Jabali, A., Weynans, K., Wilkens, R., . . . Ladewig, J. (2017). An Organoid-Based Model of Cortical Development Identifies Non-Cell-Autonomous Defects in Wnt Signaling Contributing to Miller-Dieker Syndrome. *Cell Rep*, *19*(1), 50-59. doi: 10.1016/j.celrep.2017.03.047
- Itskovitz-Eldor, J., Schuldiner, M., Karsenti, D., Eden, A., Yanuka, O., Amit, M., . . . Benvenisty, N. (2000). Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med*, *6*(2), 88-95.
- Izquierdo, J. M. (2010). Heterogeneous ribonucleoprotein C displays a repressor activity mediated by T-cell intracellular antigen-1-related/like protein to modulate Fas exon 6 splicing through a mechanism involving Hu antigen R. *Nucleic Acids Res*, *38*(22), 8001-8014. doi: 10.1093/nar/gkq698
- Jauvin, D., Chretien, J., Pandey, S. K., Martineau, L., Revillod, L., Bassez, G., . . . Puymirat, J. (2017). Targeting DMPK with Antisense Oligonucleotide Improves Muscle Strength in Myotonic Dystrophy Type 1 Mice. *Mol Ther Nucleic Acids*, *7*, 465-474. doi: 10.1016/j.omtn.2017.05.007
- Jiang, H., Mankodi, A., Swanson, M. S., Moxley, R. T., & Thornton, C. A. (2004). Myotonic dystrophy type 1 is associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of muscleblind proteins and deregulated alternative splicing in neurons. *Hum Mol Genet*, *13*(24), 3079-3088. doi: 10.1093/hmg/ddh327
- Jiwlawat, N., Lynch, E. M., Napiwocki, B. N., Stempien, A., Ashton, R. S., Kamp, T. J., . . . Suzuki, M. (2019). Micropatterned substrates with physiological stiffness promote cell maturation and Pompe disease phenotype in human induced pluripotent stem cell-derived skeletal myocytes. *Biotechnol Bioeng*, *116*(9), 2377-2392. doi: 10.1002/bit.27075
- Jones, K., Wei, C., Iakova, P., Bugiardini, E., Schneider-Gold, C., Meola, G., . . . Timchenko, L. T. (2012). GSK3beta mediates muscle pathology in myotonic dystrophy. *J Clin Invest*, *122*(12), 4461-4472. doi: 10.1172/JCI64081
- Kagami, M., Sekita, Y., Nishimura, G., Irie, M., Kato, F., Okada, M., . . . Ogata, T. (2008). Deletions and epimutations affecting the human 14q32.2 imprinted region in individuals with paternal and maternal upd(14)-like phenotypes. *Nat Genet*, *40*(2), 237-242. doi: 10.1038/ng.2007.56
- Kaliman, P., Catalucci, D., Lam, J. T., Kondo, R., Gutierrez, J. C., Reddy, S., . . . Ruiz-Lozano, P. (2005). Myotonic dystrophy protein kinase phosphorylates phospholamban and regulates calcium uptake in cardiomyocyte sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, *280*(9), 8016-8021. doi: 10.1074/jbc.M412845200
- Kanadia, R. N., Shin, J., Yuan, Y., Beattie, S. G., Wheeler, T. M., Thornton, C. A., & Swanson, M. S. (2006). Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscleblind overexpression in a mouse poly(CUG) model for myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(31), 11748-11753. doi: 10.1073/pnas.0604970103

- Karagiannis, P., Takahashi, K., Saito, M., Yoshida, Y., Okita, K., Watanabe, A., . . . Osafune, K. (2019). Induced Pluripotent Stem Cells and Their Use in Human Models of Disease and Development. *Physiol Rev*, *99*(1), 79-114. doi: 10.1152/physrev.00039.2017
- Kawasaki, H., Mizuseki, K., Nishikawa, S., Kaneko, S., Kuwana, Y., Nakanishi, S., . . . Sasai, Y. (2000). Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron*, *28*(1), 31-40. doi: 10.1016/s0896-6273(00)00083-0
- Kelava, I., & Lancaster, M. A. (2016). Stem Cell Models of Human Brain Development. *Cell Stem Cell*, *18*(6), 736-748. doi: 10.1016/j.stem.2016.05.022
- Ketley, A., Chen, C. Z., Li, X., Arya, S., Robinson, T. E., Granados-Riveron, J., . . . Brook, J. D. (2014). High-content screening identifies small molecules that remove nuclear foci, affect MBNL distribution and CELF1 protein levels via a PKC-independent pathway in myotonic dystrophy cell lines. *Hum Mol Genet*, *23*(6), 1551-1562. doi: 10.1093/hmg/ddt542
- Ketley, A., Wojciechowska, M., Ghidelli-Disse, S., Bamborough, P., Ghosh, T. K., Morato, M. L., . . . Brook, J. D. (2020). CDK12 inhibition reduces abnormalities in cells from patients with myotonic dystrophy and in a mouse model. *Sci Transl Med*, *12*(541). doi: 10.1126/scitranslmed.aaz2415
- Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., . . . Daley, G. Q. (2010). Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*, *467*(7313), 285-290. doi: 10.1038/nature09342
- King, T. J., & Briggs, R. (1955). Changes in the Nuclei of Differentiating Gastrula Cells, as Demonstrated by Nuclear Transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *41*(5), 321-325. doi: 10.1073/pnas.41.5.321
- Kiskinis, E., Sandoe, J., Williams, L. A., Boulting, G. L., Moccia, R., Wainger, B. J., . . . Eggan, K. (2014). Pathways disrupted in human ALS motor neurons identified through genetic correction of mutant SOD1. *Cell Stem Cell*, *14*(6), 781-795. doi: 10.1016/j.stem.2014.03.004
- Klein, A. F., Varela, M. A., Arandel, L., Holland, A., Naouar, N., Arzumanov, A., . . . Wood, M. J. (2019). Peptide-conjugated oligonucleotides evoke long-lasting myotonic dystrophy correction in patient-derived cells and mice. *J Clin Invest*, *129*(11), 4739-4744. doi: 10.1172/JCI128205
- Klesert, T. R., Otten, A. D., Bird, T. D., & Tapscott, S. J. (1997). Trinucleotide repeat expansion at the myotonic dystrophy locus reduces expression of DMAHP. *Nat Genet*, *16*(4), 402-406. doi: 10.1038/ng0897-402
- Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Taguchi, K., Kobayashi, A., Ichimura, Y., . . . Yamamoto, M. (2010). The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol*, *12*(3), 213-223. doi: 10.1038/ncb2021
- Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y. S., Ueno, T., Hara, T., . . . Tanaka, K. (2007). Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell*, *131*(6), 1149-1163. doi: 10.1016/j.cell.2007.10.035
- Kouki, T., Takasu, N., Nakachi, A., Tamanaha, T., Komiya, I., & Tawata, M. (2005). Low-dose metformin improves hyperglycaemia related to myotonic dystrophy. *Diabet Med*, *22*(3), 346-347. doi: 10.1111/j.1464-5491.2005.01432.x
- Kuyumcu-Martinez, N. M., Wang, G. S., & Cooper, T. A. (2007). Increased steady-state levels of CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation. *Mol Cell*, *28*(1), 68-78. doi: 10.1016/j.molcel.2007.07.027
- Kwon, J., Han, E., Bui, C. B., Shin, W., Lee, J., Lee, S., . . . Shin, J. (2012). Assurance of mitochondrial integrity and mammalian longevity by the p62-Keap1-Nrf2-Nqo1 cascade. *EMBO Rep*, *13*(2), 150-156. doi: 10.1038/embor.2011.246
- Laaksovirta, H., Peuralinna, T., Schymick, J. C., Scholz, S. W., Lai, S. L., Myllykangas, L., . . . Traynor, B. J. (2010). Chromosome 9p21 in amyotrophic lateral sclerosis in Finland: a genome-wide association study. *Lancet Neurol*, *9*(10), 978-985. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70184-8
- Laflamme, M. A., Chen, K. Y., Naumova, A. V., Muskheli, V., Fugate, J. A., Dupras, S. K., . . . Murry, C. E. (2007). Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol*, *25*(9), 1015-1024. doi: 10.1038/nbt1327

- Lamb, J., Crawford, E. D., Peck, D., Modell, J. W., Blat, I. C., Wrobel, M. J., . . . Golub, T. R. (2006). The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. *Science*, *313*(5795), 1929-1935. doi: 10.1126/science.1132939
- Lancaster, M. A., Renner, M., Martin, C. A., Wenzel, D., Bicknell, L. S., Hurles, M. E., . . . Knoblich, J. A. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*, *501*(7467), 373-379. doi: 10.1038/nature12517
- Langlois, M. A., Lee, N. S., Rossi, J. J., & Puymirat, J. (2003). Hammerhead ribozyme-mediated destruction of nuclear foci in myotonic dystrophy myoblasts. *Mol Ther*, *7*(5 Pt 1), 670-680. doi: 10.1016/s1525-0016(03)00068-6
- Lattante, S., de Calbiac, H., Le Ber, I., Brice, A., Ciura, S., & Kabashi, E. (2015). Sqstm1 knock-down causes a locomotor phenotype ameliorated by rapamycin in a zebrafish model of ALS/FTLD. *Hum Mol Genet*, *24*(6), 1682-1690. doi: 10.1093/hmg/ddu580
- Laurent, L. C., Ulitsky, I., Slavin, I., Tran, H., Schork, A., Morey, R., . . . Loring, J. F. (2011). Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. *Cell Stem Cell*, *8*(1), 106-118. doi: 10.1016/j.stem.2010.12.003
- Laustriat, D., Gide, J., Barrault, L., Chautard, E., Benoit, C., Auboeuf, D., . . . Baghdoyan, S. (2015). In Vitro and In Vivo Modulation of Alternative Splicing by the Biguanide Metformin. *Mol Ther Nucleic Acids*, *4*, e262. doi: 10.1038/mtna.2015.35
- Le Ber, I., Camuzat, A., Guerreiro, R., Bouya-Ahmed, K., Bras, J., Nicolas, G., . . . Genetic Research Network on, F. F.-A. (2013). SQSTM1 mutations in French patients with frontotemporal dementia or frontotemporal dementia with amyotrophic lateral sclerosis. *JAMA Neurol*, *70*(11), 1403-1410. doi: 10.1001/jamaneurol.2013.3849
- Le Gall, L., Anakor, E., Connolly, O., Vijayakumar, U. G., Duddy, W. J., & Duguez, S. (2020). Molecular and Cellular Mechanisms Affected in ALS. *J Pers Med*, *10*(3). doi: 10.3390/jpm10030101
- Lee, G., Papapetrou, E. P., Kim, H., Chambers, S. M., Tomishima, M. J., Fasano, C. A., . . . Studer, L. (2009). Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature*, *461*(7262), 402-406. doi: 10.1038/nature08320
- Lee, J., Bai, Y., Chembazhi, U. V., Peng, S., Yum, K., Luu, L. M., . . . Zimmerman, S. C. (2019). Intrinsically cell-penetrating multivalent and multitargeting ligands for myotonic dystrophy type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *116*(18), 8709-8714. doi: 10.1073/pnas.1820827116
- Lee, J. E., Bennett, C. F., & Cooper, T. A. (2012). RNase H-mediated degradation of toxic RNA in myotonic dystrophy type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(11), 4221-4226. doi: 10.1073/pnas.1117019109
- Lefort, N., Feyeux, M., Bas, C., Feraud, O., Bennaceur-Griscelli, A., Tachdjian, G., . . . Perrier, A. L. (2008). Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21. *Nat Biotechnol*, *26*(12), 1364-1366. doi: 10.1038/nbt.1509
- Leroy, O., Wang, J., Maurage, C. A., Parent, M., Cooper, T., Buee, L., . . . Caillet-Boudin, M. L. (2006). Brain-specific change in alternative splicing of Tau exon 6 in myotonic dystrophy type 1. *Biochim Biophys Acta*, *1762*(4), 460-467. doi: 10.1016/j.bbadis.2005.12.003
- Ling, S. C., Polymenidou, M., & Cleveland, D. W. (2013). Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron*, *79*(3), 416-438. doi: 10.1016/j.neuron.2013.07.033
- Liu, L., Luo, G. Z., Yang, W., Zhao, X., Zheng, Q., Lv, Z., . . . Zhou, Q. (2010). Activation of the imprinted Dlk1-Dio3 region correlates with pluripotency levels of mouse stem cells. *J Biol Chem*, *285*(25), 19483-19490. doi: 10.1074/jbc.M110.131995
- Liu, Z., Chen, P., Gao, H., Gu, Y., Yang, J., Peng, H., . . . Hu, R. (2014). Ubiquitylation of autophagy receptor Optineurin by HACE1 activates selective autophagy for tumor suppression. *Cancer Cell*, *26*(1), 106-120. doi: 10.1016/j.ccr.2014.05.015
- Lo Scudato, M., Poulard, K., Sourd, C., Tome, S., Klein, A. F., Corre, G., . . . Buj-Bello, A. (2019). Genome Editing of Expanded CTG Repeats within the Human DMPK Gene Reduces Nuclear RNA Foci in the Muscle of DM1 Mice. *Mol Ther*, *27*(8), 1372-1388. doi: 10.1016/j.ymthe.2019.05.021

- Logigian, E. L., Martens, W. B., Moxley, R. T. t., McDermott, M. P., Dilek, N., Wiegner, A. W., . . . Moxley, R. T., 3rd. (2010). Mexiletine is an effective antimyotonia treatment in myotonic dystrophy type 1. *Neurology*, *74*(18), 1441-1448. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181dc1a3a
- Lopez Castel, A., Nakamori, M., Tome, S., Chitayat, D., Gourdon, G., Thornton, C. A., & Pearson, C. E. (2011). Expanded CTG repeat demarcates a boundary for abnormal CpG methylation in myotonic dystrophy patient tissues. *Hum Mol Genet*, *20*(1), 1-15. doi: 10.1093/hmg/ddq427
- Lopez, S., Stuhl, L., Fichelson, S., Dubart-Kupperschmitt, A., St Arnaud, R., Galindo, J. R., . . . Gomez, S. (2005). NACA is a positive regulator of human erythroid-cell differentiation. *J Cell Sci*, *118*(Pt 8), 1595-1605. doi: 10.1242/jcs.02295
- Mahadevan, M. S., Yadava, R. S., Yu, Q., Balijepalli, S., Frenzel-McCardell, C. D., Bourne, T. D., & Phillips, L. H. (2006). Reversible model of RNA toxicity and cardiac conduction defects in myotonic dystrophy. *Nat Genet*, *38*(9), 1066-1070. doi: 10.1038/ng1857
- Mamchaoui, K., Trollet, C., Bigot, A., Negroni, E., Chaouch, S., Wolff, A., . . . Mouly, V. (2011). Immortalized pathological human myoblasts: towards a universal tool for the study of neuromuscular disorders. *Skelet Muscle*, *1*, 34. doi: 10.1186/2044-5040-1-34
- Mankodi, A., Takahashi, M. P., Jiang, H., Beck, C. L., Bowers, W. J., Moxley, R. T., . . . Thornton, C. A. (2002). Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of CIC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. *Mol Cell*, *10*(1), 35-44. doi: 10.1016/s1097-2765(02)00563-4
- Marchetto, M. C., Carrameu, C., Acab, A., Yu, D., Yeo, G. W., Mu, Y., . . . Muotri, A. R. (2010). A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell*, *143*(4), 527-539. doi: 10.1016/j.cell.2010.10.016
- Marteyn, A., Maury, Y., Gauthier, M. M., Lecuyer, C., Vernet, R., Denis, J. A., . . . Martinat, C. (2011). Mutant human embryonic stem cells reveal neurite and synapse formation defects in type 1 myotonic dystrophy. *Cell Stem Cell*, *8*(4), 434-444. doi: 10.1016/j.stem.2011.02.004
- 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. doi: 10.1073/pnas.78.12.7634
- Marton, R. M., Miura, Y., Sloan, S. A., Li, Q., Revah, O., Levy, R. J., . . . Pasca, S. P. (2019). Differentiation and maturation of oligodendrocytes in human three-dimensional neural cultures. *Nat Neurosci*, *22*(3), 484-491. doi: 10.1038/s41593-018-0316-9
- Mateizel, I., De Becker, A., Van de Velde, H., De Rycke, M., Van Steirteghem, A., Cornelissen, R., . . . Sermon, K. (2008). Efficient differentiation of human embryonic stem cells into a homogeneous population of osteoprogenitor-like cells. *Reprod Biomed Online*, *16*(5), 741-753. doi: 10.1016/s1472-6483(10)60490-7
- Mateizel, I., De Temmerman, N., Ullmann, U., Cauffman, G., Sermon, K., Van de Velde, H., . . . 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*(2), 503-511. doi: 10.1093/humrep/dei345
- Matsumoto, G., Shimogori, T., Hattori, N., & Nukina, N. (2015). TBK1 controls autophagosomal engulfment of polyubiquitinated mitochondria through p62/SQSTM1 phosphorylation. *Hum Mol Genet*, *24*(15), 4429-4442. doi: 10.1093/hmg/ddv179
- Matsumoto, G., Wada, K., Okuno, M., Kurosawa, M., & Nukina, N. (2011). Serine 403 phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated proteins. *Mol Cell*, *44*(2), 279-289. doi: 10.1016/j.molcel.2011.07.039
- Maury, Y., Come, J., Piskorowski, R. A., Salah-Mohellibi, N., Chevaleyre, V., Peschanski, M., . . . Nedelec, S. (2015). Combinatorial analysis of developmental cues efficiently converts human pluripotent stem cells into multiple neuronal subtypes. *Nat Biotechnol*, *33*(1), 89-96. doi: 10.1038/nbt.3049
- Maury, Y., Poydenot, P., Brinon, B., Lesueur, L., Gide, J., Roqueviere, S., . . . Martinat, C. (2019). Pluripotent Stem Cell-Based Drug Screening Reveals Cardiac Glycosides as Modulators of Myotonic Dystrophy Type 1. *iScience*, *11*, 258-271. doi: 10.1016/j.isci.2018.12.019

- McGrath, J., & Solter, D. (1984). Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell*, *37*(1), 179-183. doi: 10.1016/0092-8674(84)90313-1
- Meola, G., Sansone, V., Perani, D., Colleluori, A., Cappa, S., Cotelli, M., . . . Moxley, R. T. (1999). Reduced cerebral blood flow and impaired visual-spatial function in proximal myotonic myopathy. *Neurology*, *53*(5), 1042-1050. doi: 10.1212/wnl.53.5.1042
- Mielke, R., Herholz, K., Fink, G., Ritter, D., & Heiss, W. D. (1993). Positron emission tomography in myotonic dystrophy. *Psychiatry Res*, *50*(2), 93-99. doi: 10.1016/0925-4927(93)90014-9
- Miller, J. D., Ganat, Y. M., Kishinevsky, S., Bowman, R. L., Liu, B., Tu, E. Y., . . . Studer, L. (2013). Human iPSC-based modeling of late-onset disease via progerin-induced aging. *Cell Stem Cell*, *13*(6), 691-705. doi: 10.1016/j.stem.2013.11.006
- Miller, J. W., Urbinati, C. R., Teng-Umuay, P., Stenberg, M. G., Byrne, B. J., Thornton, C. A., & Swanson, M. S. (2000). Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy. *EMBO J*, *19*(17), 4439-4448. doi: 10.1093/emboj/19.17.4439
- Minnerop, M., Weber, B., Schoene-Bake, J. C., Roeske, S., Mirbach, S., Anspach, C., . . . Kornblum, C. (2011). The brain in myotonic dystrophy 1 and 2: evidence for a predominant white matter disease. *Brain*, *134*(Pt 12), 3530-3546. doi: 10.1093/brain/awr299
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., . . . Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, *113*(5), 631-642. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00393-3
- Mitsui, S., Otomo, A., Nozaki, M., Ono, S., Sato, K., Shirakawa, R., . . . Hadano, S. (2018). Systemic overexpression of SQSTM1/p62 accelerates disease onset in a SOD1(H46R)-expressing ALS mouse model. *Mol Brain*, *11*(1), 30. doi: 10.1186/s13041-018-0373-8
- Monk, D., Mackay, D. J. G., Eggermann, T., Maher, E. R., & Riccio, A. (2019). Genomic imprinting disorders: lessons on how genome, epigenome and environment interact. *Nat Rev Genet*, *20*(4), 235-248. doi: 10.1038/s41576-018-0092-0
- Mouilleau, V., Vaslin, C., Robert, R., Gribaudo, S., Nicolas, N., Jarrige, M., . . . Nedelec, S. (2021). Dynamic extrinsic pacing of the HOX clock in human axial progenitors controls motor neuron subtype specification. *Development*, *148*(6). doi: 10.1242/dev.194514
- Myring, J., Meredith, A. L., Harley, H. G., Kohn, G., Norbury, G., Harper, P. S., & Shaw, D. J. (1992). Specific molecular prenatal diagnosis for the CTG mutation in myotonic dystrophy. *J Med Genet*, *29*(11), 785-788. doi: 10.1136/jmg.29.11.785
- Nakamori, M., Taylor, K., Mochizuki, H., Sobczak, K., & Takahashi, M. P. (2016). Oral administration of erythromycin decreases RNA toxicity in myotonic dystrophy. *Ann Clin Transl Neurol*, *3*(1), 42-54. doi: 10.1002/acn3.271
- Nakamura, T., Okamoto, I., Sasaki, K., Yabuta, Y., Iwatani, C., Tsuchiya, H., . . . Saitou, M. (2016). A developmental coordinate of pluripotency among mice, monkeys and humans. *Nature*, *537*(7618), 57-62. doi: 10.1038/nature19096
- Naryshkin, N. A., Weetall, M., Dakka, A., Narasimhan, J., Zhao, X., Feng, Z., . . . Metzger, F. (2014). Motor neuron disease. SMN2 splicing modifiers improve motor function and longevity in mice with spinal muscular atrophy. *Science*, *345*(6197), 688-693. doi: 10.1126/science.1250127
- Nguyen, H. P., Van Broeckhoven, C., & van der Zee, J. (2018). ALS Genes in the Genomic Era and their Implications for FTD. *Trends Genet*, *34*(6), 404-423. doi: 10.1016/j.tig.2018.03.001
- Nichols, J., & Smith, A. (2009). Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell*, *4*(6), 487-492. doi: 10.1016/j.stem.2009.05.015
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., . . . Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, *95*(3), 379-391. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81769-9
- Nishi, M., Kimura, T., Igeta, M., Furuta, M., Suenaga, K., Matsumura, T., . . . Yoshikawa, H. (2020). Differences in splicing defects between the grey and white matter in myotonic dystrophy type 1 patients. *PLoS One*, *15*(5), e0224912. doi: 10.1371/journal.pone.0224912
- Niwa, H., Miyazaki, J., & Smith, A. G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*, *24*(4), 372-376. doi: 10.1038/74199

- O'Leary, D. A., Vargas, L., Sharif, O., Garcia, M. E., Sigal, Y. J., Chow, S. K., . . . Engels, I. H. (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. doi: 10.2174/1875397301004010009
- Oana, K., Oma, Y., Suo, S., Takahashi, M. P., Nishino, I., Takeda, S., & Ishiura, S. (2013). Manumycin A corrects aberrant splicing of Clcn1 in myotonic dystrophy type 1 (DM1) mice. *Sci Rep*, 3, 2142. doi: 10.1038/srep02142
- Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A., & Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99(3), 247-257. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81656-6
- Okkersen, K., Jimenez-Moreno, C., Wenninger, S., Daidj, F., Glennon, J., Cumming, S., . . . consortium, O. (2018). Cognitive behavioural therapy with optional graded exercise therapy in patients with severe fatigue with myotonic dystrophy type 1: a multicentre, single-blind, randomised trial. *Lancet Neurol*, 17(8), 671-680. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30203-5
- Orengo, J. P., Chambon, P., Metzger, D., Mosier, D. R., Snipes, G. J., & Cooper, T. A. (2008). Expanded CTG repeats within the DMPK 3' UTR causes severe skeletal muscle wasting in an inducible mouse model for myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(7), 2646-2651. doi: 10.1073/pnas.0708519105
- Otten, A. D., & Tapscott, S. J. (1995). Triplet repeat expansion in myotonic dystrophy alters the adjacent chromatin structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(12), 5465-5469. doi: 10.1073/pnas.92.12.5465
- Pandey, S. K., Wheeler, T. M., Justice, S. L., Kim, A., Younis, H. S., Gattis, D., . . . MacLeod, A. R. (2015). Identification and characterization of modified antisense oligonucleotides targeting DMPK in mice and nonhuman primates for the treatment of myotonic dystrophy type 1. *J Pharmacol Exp Ther*, 355(2), 329-340. doi: 10.1124/jpet.115.226969
- Pasca, A. M., Sloan, S. A., Clarke, L. E., Tian, Y., Makinson, C. D., Huber, N., . . . Pasca, S. P. (2015). Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent stem cells in 3D culture. *Nat Methods*, 12(7), 671-678. doi: 10.1038/nmeth.3415
- Pasca, S. P. (2019). Assembling human brain organoids. *Science*, 363(6423), 126-127. doi: 10.1126/science.aau5729
- Pascual-Gilabert, M., Lopez-Castel, A., & Artero, R. (2021). Myotonic dystrophy type 1 drug development: A pipeline toward the market. *Drug Discov Today*. doi: 10.1016/j.drudis.2021.03.024
- Peters, J. (2014). The role of genomic imprinting in biology and disease: an expanding view. *Nat Rev Genet*, 15(8), 517-530. doi: 10.1038/nrg3766
- Philips, A. V., Timchenko, L. T., & Cooper, T. A. (1998). Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science*, 280(5364), 737-741. doi: 10.1126/science.280.5364.737
- Piedrahita, J. A. (2011). The role of imprinted genes in fetal growth abnormalities. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 91(8), 682-692. doi: 10.1002/bdra.20795
- Pinto, B. S., Saxena, T., Oliveira, R., Mendez-Gomez, H. R., Cleary, J. D., Denes, L. T., . . . Wang, E. T. (2017). Impeding Transcription of Expanded Microsatellite Repeats by Deactivated Cas9. *Mol Cell*, 68(3), 479-490 e475. doi: 10.1016/j.molcel.2017.09.033
- Poulin, H., Mercier, A., Djemai, M., Pouliot, V., Deschenes, I., Boutjdir, M., . . . Chahine, M. (2021). iPSC-derived cardiomyocytes from patients with myotonic dystrophy type 1 have abnormal ion channel functions and slower conduction velocities. *Sci Rep*, 11(1), 2500. doi: 10.1038/s41598-021-82007-8
- Raaijmakers, R. H. L., Ripken, L., Ausems, C. R. M., & Wansink, D. G. (2019). CRISPR/Cas Applications in Myotonic Dystrophy: Expanding Opportunities. *Int J Mol Sci*, 20(15). doi: 10.3390/ijms20153689
- Ralston, S. H., & Albagha, O. M. (2014). Genetics of Paget's disease of bone. *Curr Osteoporos Rep*, 12(3), 263-271. doi: 10.1007/s11914-014-0219-y

- Ramesh Babu, J., Lamar Seibenhener, M., Peng, J., Strom, A. L., Kemppainen, R., Cox, N., . . . Wooten, M. W. (2008). Genetic inactivation of p62 leads to accumulation of hyperphosphorylated tau and neurodegeneration. *J Neurochem*, *106*(1), 107-120. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05340.x
- Rau, F., Laine, J., Ramanoudjame, L., Ferry, A., Arandel, L., Delalande, O., . . . Furling, D. (2015). Abnormal splicing switch of DMD's penultimate exon compromises muscle fibre maintenance in myotonic dystrophy. *Nat Commun*, *6*, 7205. doi: 10.1038/ncomms8205
- Ravel-Chapuis, A., Al-Rewashdy, A., Belanger, G., & Jasmin, B. J. (2018). Pharmacological and physiological activation of AMPK improves the spliceopathy in DM1 mouse muscles. *Hum Mol Genet*, *27*(19), 3361-3376. doi: 10.1093/hmg/ddy245
- Ravel-Chapuis, A., Belanger, G., Yadava, R. S., Mahadevan, M. S., DesGroseillers, L., Cote, J., & Jasmin, B. J. (2012). The RNA-binding protein Stauf1 is increased in DM1 skeletal muscle and promotes alternative pre-mRNA splicing. *J Cell Biol*, *196*(6), 699-712. doi: 10.1083/jcb.201108113
- Rea, S. L., Majcher, V., Searle, M. S., & Layfield, R. (2014). SQSTM1 mutations--bridging Paget disease of bone and ALS/FTLD. *Exp Cell Res*, *325*(1), 27-37. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.01.020
- Reddy, S., Smith, D. B., Rich, M. M., Leferovich, J. M., Reilly, P., Davis, B. M., . . . Housman, D. (1996). Mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase develop a late onset progressive myopathy. *Nat Genet*, *13*(3), 325-335. doi: 10.1038/ng0796-325
- Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Fong, C. Y., Trounson, A., & Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol*, *18*(4), 399-404. doi: 10.1038/74447
- Romeo, V., Pegoraro, E., Squarzanti, F., Soraru, G., Ferrati, C., Ermani, M., . . . Angelini, C. (2010). Retrospective study on PET-SPECT imaging in a large cohort of myotonic dystrophy type 1 patients. *Neurol Sci*, *31*(6), 757-763. doi: 10.1007/s10072-010-0406-2
- Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., . . . et al. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, *362*(6415), 59-62. doi: 10.1038/362059a0
- Rugg-Gunn, P. J., Ferguson-Smith, A. C., & Pedersen, R. A. (2005). Epigenetic status of human embryonic stem cells. *Nat Genet*, *37*(6), 585-587. doi: 10.1038/ng1556
- Sato, T., Vries, R. G., Snippert, H. J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D. E., . . . Clevers, H. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, *459*(7244), 262-265. doi: 10.1038/nature07935
- Savkur, R. S., Philips, A. V., & Cooper, T. A. (2001). Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat Genet*, *29*(1), 40-47. doi: 10.1038/ng704
- Savouret, C., Brisson, E., Essers, J., Kanaar, R., Pastink, A., te Riele, H., . . . Gourdon, G. (2003). CTG repeat instability and size variation timing in DNA repair-deficient mice. *EMBO J*, *22*(9), 2264-2273. doi: 10.1093/emboj/cdg202
- Sergeant, N., Sablonniere, B., Schraen-Maschke, S., Ghestem, A., Maurage, C. A., Wattez, A., . . . Delacourte, A. (2001). Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet*, *10*(19), 2143-2155. doi: 10.1093/hmg/10.19.2143
- Seriola, A., Spits, C., Simard, J. P., Hilven, P., Haentjens, P., Pearson, C. E., & Sermon, K. (2011). Huntington's and myotonic dystrophy hESCs: down-regulated trinucleotide repeat instability and mismatch repair machinery expression upon differentiation. *Hum Mol Genet*, *20*(1), 176-185. doi: 10.1093/hmg/ddq456
- Seznec, H., Lia-Baldini, A. S., Duros, C., Fouquet, C., Lacroix, C., Hofmann-Radvanyi, H., . . . Gourdon, G. (2000). Transgenic mice carrying large human genomic sequences with expanded CTG repeat mimic closely the DM CTG repeat intergenerational and somatic instability. *Hum Mol Genet*, *9*(8), 1185-1194. doi: 10.1093/hmg/9.8.1185

- Shi, Y., Inoue, H., Wu, J. C., & Yamanaka, S. (2017). Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nat Rev Drug Discov*, *16*(2), 115-130. doi: 10.1038/nrd.2016.245
- Sicot, G., Servais, L., Dinca, D. M., Leroy, A., Prigogine, C., Medja, F., . . . Gomes-Pereira, M. (2017). Downregulation of the Glial GLT1 Glutamate Transporter and Purkinje Cell Dysfunction in a Mouse Model of Myotonic Dystrophy. *Cell Rep*, *19*(13), 2718-2729. doi: 10.1016/j.celrep.2017.06.006
- Song, K. Y., Guo, X. M., Wang, H. Q., Zhang, L., Huang, S. Y., Huo, Y. C., . . . Qin, X. Y. (2020). MBNL1 reverses the proliferation defect of skeletal muscle satellite cells in myotonic dystrophy type 1 by inhibiting autophagy via the mTOR pathway. *Cell Death Dis*, *11*(7), 545. doi: 10.1038/s41419-020-02756-8
- Spits, C., Mateizel, I., Geens, M., Mertzaniidou, A., Staessen, C., Vandesselde, Y., . . . Sermon, K. (2008). Recurrent chromosomal abnormalities in human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, *26*(12), 1361-1363. doi: 10.1038/nbt.1510
- Sridharan, R., Tchieu, J., Mason, M. J., Yachechko, R., Kuoy, E., Horvath, S., . . . Plath, K. (2009). Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency. *Cell*, *136*(2), 364-377. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.001
- Stadtfeld, M., Apostolou, E., Akutsu, H., Fukuda, A., Follett, P., Natesan, S., . . . Hochedlinger, K. (2010). Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. *Nature*, *465*(7295), 175-181. doi: 10.1038/nature09017
- Stadtfeld, M., Apostolou, E., Ferrari, F., Choi, J., Walsh, R. M., Chen, T., . . . Hochedlinger, K. (2012). Ascorbic acid prevents loss of Dlk1-Dio3 imprinting and facilitates generation of all-iPS cell mice from terminally differentiated B cells. *Nat Genet*, *44*(4), 398-405, S391-392. doi: 10.1038/ng.1110
- Steinbach, P., Glaser, D., Vogel, W., Wolf, M., & Schwemmler, S. (1998). The DMPK gene of severely affected myotonic dystrophy patients is hypermethylated proximal to the largely expanded CTG repeat. *Am J Hum Genet*, *62*(2), 278-285. doi: 10.1086/301711
- Suenaga, K., Lee, K. Y., Nakamori, M., Tatsumi, Y., Takahashi, M. P., Fujimura, H., . . . Kimura, T. (2012). Muscleblind-like 1 knockout mice reveal novel splicing defects in the myotonic dystrophy brain. *PLoS One*, *7*(3), e33218. doi: 10.1371/journal.pone.0033218
- Surani, M. A., Barton, S. C., & Norris, M. L. (1984). Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature*, *308*(5959), 548-550. doi: 10.1038/308548a0
- Sutton, V. R., & Shaffer, L. G. (2000). Search for imprinted regions on chromosome 14: comparison of maternal and paternal UPD cases with cases of chromosome 14 deletion. *Am J Med Genet*, *93*(5), 381-387. doi: 10.1002/1096-8628(20000828)93:5<381::aid-ajmg7>3.0.co;2-9
- Suzuki, T., Bridges, D., Nakada, D., Skiniotis, G., Morrison, S. J., Lin, J. D., . . . Inoki, K. (2013). Inhibition of AMPK catabolic action by GSK3. *Mol Cell*, *50*(3), 407-419. doi: 10.1016/j.molcel.2013.03.022
- Taapken, S. M., Nisler, B. S., Newton, M. A., Sampsel-Barron, T. L., Leonhard, K. A., McIntire, E. M., & Montgomery, K. D. (2011). Karyotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, *29*(4), 313-314. doi: 10.1038/nbt.1835
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, *131*(5), 861-872. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, *126*(4), 663-676. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024
- Takahashi, M. P., & Cannon, S. C. (2001). Mexiletine block of disease-associated mutations in S6 segments of the human skeletal muscle Na(+) channel. *J Physiol*, *537*(Pt 3), 701-714. doi: 10.1111/j.1469-7793.2001.00701.x
- Talukdar, I., Sen, S., Urbano, R., Thompson, J., Yates, J. R., 3rd, & Webster, N. J. (2011). hnRNP A1 and hnRNP F modulate the alternative splicing of exon 11 of the insulin receptor gene. *PLoS One*, *6*(11), e27869. doi: 10.1371/journal.pone.0027869

- Taneja, K. L., McCurrach, M., Schalling, M., Housman, D., & Singer, R. H. (1995). Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues. *J Cell Biol*, *128*(6), 995-1002. doi: 10.1083/jcb.128.6.995
- Tang, Z. Z., Yarotsky, V., Wei, L., Sobczak, K., Nakamori, M., Eichinger, K., . . . Thornton, C. A. (2012). Muscle weakness in myotonic dystrophy associated with misregulated splicing and altered gating of Ca(V)1.1 calcium channel. *Hum Mol Genet*, *21*(6), 1312-1324. doi: 10.1093/hmg/ddr568
- Teysou, E., Takeda, T., Lebon, V., Boillee, S., Doukoure, B., Bataillon, G., . . . Millecamps, S. (2013). Mutations in SQSTM1 encoding p62 in amyotrophic lateral sclerosis: genetics and neuropathology. *Acta Neuropathol*, *125*(4), 511-522. doi: 10.1007/s00401-013-1090-0
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, *282*(5391), 1145-1147. doi: 10.1126/science.282.5391.1145
- Thomson, J. A., Kalishman, J., Golos, T. G., Durning, M., Harris, C. P., Becker, R. A., & Hearn, J. P. (1995). Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *92*(17), 7844-7848. doi: 10.1073/pnas.92.17.7844
- Thornton, C. A., Wymer, J. P., Simmons, Z., McClain, C., & Moxley, R. T., 3rd. (1997). Expansion of the myotonic dystrophy CTG repeat reduces expression of the flanking DMAHP gene. *Nat Genet*, *16*(4), 407-409. doi: 10.1038/ng0897-407
- Timchenko, L. T., Timchenko, N. A., Caskey, C. T., & Roberts, R. (1996). Novel proteins with binding specificity for DNA CTG repeats and RNA CUG repeats: implications for myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet*, *5*(1), 115-121. doi: 10.1093/hmg/5.1.115
- Timchenko, N. A., Cai, Z. J., Welm, A. L., Reddy, S., Ashizawa, T., & Timchenko, L. T. (2001). RNA CUG repeats sequester CUGBP1 and alter protein levels and activity of CUGBP1. *J Biol Chem*, *276*(11), 7820-7826. doi: 10.1074/jbc.M005960200
- Timchenko, N. A., Patel, R., Iakova, P., Cai, Z. J., Quan, L., & Timchenko, L. T. (2004). Overexpression of CUG triplet repeat-binding protein, CUGBP1, in mice inhibits myogenesis. *J Biol Chem*, *279*(13), 13129-13139. doi: 10.1074/jbc.M312923200
- Tome, S., & Gourdon, G. (2020). DM1 Phenotype Variability and Triplet Repeat Instability: Challenges in the Development of New Therapies. *Int J Mol Sci*, *21*(2). doi: 10.3390/ijms21020457
- Tsilfidis, C., MacKenzie, A. E., Mettler, G., Barcelo, J., & Korneluk, R. G. (1992). Correlation between CTG trinucleotide repeat length and frequency of severe congenital myotonic dystrophy. *Nat Genet*, *1*(3), 192-195. doi: 10.1038/ng0692-192
- Turner, M. R., Al-Chalabi, A., Chio, A., Hardiman, O., Kiernan, M. C., Rohrer, J. D., . . . Talbot, K. (2017). Genetic screening in sporadic ALS and FTD. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *88*(12), 1042-1044. doi: 10.1136/jnnp-2017-315995
- Ueki, J., Nakamori, M., Nakamura, M., Nishikawa, M., Yoshida, Y., Tanaka, A., . . . Sakurai, H. (2017). Myotonic dystrophy type 1 patient-derived iPSCs for the investigation of CTG repeat instability. *Sci Rep*, *7*, 42522. doi: 10.1038/srep42522
- Urbach, A., Schuldiner, M., & Benvenisty, N. (2004). Modeling for Lesch-Nyhan disease by gene targeting in human embryonic stem cells. *Stem Cells*, *22*(4), 635-641. doi: 10.1634/stemcells.22-4-635
- Ustinova, M., Anson, L., Silamikelis, I., Rovite, V., Elbere, I., Silamikele, L., . . . Klovinis, J. (2020). Whole-blood transcriptome profiling reveals signatures of metformin and its therapeutic response. *PLoS One*, *15*(8), e0237400. doi: 10.1371/journal.pone.0237400
- Uyar, A., & Seli, E. (2014). The impact of assisted reproductive technologies on genomic imprinting and imprinting disorders. *Curr Opin Obstet Gynecol*, *26*(3), 210-221. doi: 10.1097/GCO.0000000000000071
- Vahdatpour, C., Dyer, A. H., & Tropea, D. (2016). Insulin-Like Growth Factor 1 and Related Compounds in the Treatment of Childhood-Onset Neurodevelopmental Disorders. *Front Neurosci*, *10*, 450. doi: 10.3389/fnins.2016.00450

- Vallier, L., Alexander, M., & Pedersen, R. A. (2005). Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J Cell Sci*, *118*(Pt 19), 4495-4509. doi: 10.1242/jcs.02553
- van Agtmaal, E. L., Andre, L. M., Willemse, M., Cumming, S. A., van Kessel, I. D. G., van den Broek, W., . . . Wieringa, B. (2017). CRISPR/Cas9-Induced (CTGCAG)_n Repeat Instability in the Myotonic Dystrophy Type 1 Locus: Implications for Therapeutic Genome Editing. *Mol Ther*, *25*(1), 24-43. doi: 10.1016/j.ymthe.2016.10.014
- Van Damme, P., Robberecht, W., & Van Den Bosch, L. (2017). Modelling amyotrophic lateral sclerosis: progress and possibilities. *Dis Model Mech*, *10*(5), 537-549. doi: 10.1242/dmm.029058
- Volk, A. E., Weishaupt, J. H., Andersen, P. M., Ludolph, A. C., & Kubisch, C. (2018). Current knowledge and recent insights into the genetic basis of amyotrophic lateral sclerosis. *Med Genet*, *30*(2), 252-258. doi: 10.1007/s11825-018-0185-3
- Wahlster, L., & Daley, G. Q. (2016). Progress towards generation of human haematopoietic stem cells. *Nat Cell Biol*, *18*(11), 1111-1117. doi: 10.1038/ncb3419
- Wainger, B. J., Macklin, E. A., Vucic, S., McIllduff, C. E., Paganoni, S., Maragakis, N. J., . . . Cudkovic, M. E. (2021). Effect of Ezogabine on Cortical and Spinal Motor Neuron Excitability in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol*, *78*(2), 186-196. doi: 10.1001/jamaneurol.2020.4300
- Wakayama, T., Tabar, V., Rodriguez, I., Perry, A. C., Studer, L., & Mombaerts, P. (2001). Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science*, *292*(5517), 740-743. doi: 10.1126/science.1059399
- Wang, G. S., Kearney, D. L., De Biasi, M., Taffet, G., & Cooper, T. A. (2007). Elevation of RNA-binding protein CUGBP1 is an early event in an inducible heart-specific mouse model of myotonic dystrophy. *J Clin Invest*, *117*(10), 2802-2811. doi: 10.1172/JCI32308
- Wang, G. S., Kuyumcu-Martinez, M. N., Sarma, S., Mathur, N., Wehrens, X. H., & Cooper, T. A. (2009). PKC inhibition ameliorates the cardiac phenotype in a mouse model of myotonic dystrophy type 1. *J Clin Invest*, *119*(12), 3797-3806. doi: 10.1172/JCI37976
- Wang, M., Weng, W. C., Stock, L., Lindquist, D., Martinez, A., Gourdon, G., . . . Timchenko, L. (2019). Correction of Glycogen Synthase Kinase 3beta in Myotonic Dystrophy 1 Reduces the Mutant RNA and Improves Postnatal Survival of DMSXL Mice. *Mol Cell Biol*, *39*(21). doi: 10.1128/MCB.00155-19
- Wang, P. Y., Lin, Y. M., Wang, L. H., Kuo, T. Y., Cheng, S. J., & Wang, G. S. (2017). Reduced cytoplasmic MBNL1 is an early event in a brain-specific mouse model of myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet*, *26*(12), 2247-2257. doi: 10.1093/hmg/ddx115
- Wang, W., Fan, J., Yang, X., Furer-Galban, S., Lopez de Silanes, I., von Kobbe, C., . . . Gorospe, M. (2002). AMP-activated kinase regulates cytoplasmic HuR. *Mol Cell Biol*, *22*(10), 3425-3436. doi: 10.1128/mcb.22.10.3425-3436.2002
- Wang, Y., Hao, L., Wang, H., Santostefano, K., Thapa, A., Cleary, J., . . . Xia, G. (2018). Therapeutic Genome Editing for Myotonic Dystrophy Type 1 Using CRISPR/Cas9. *Mol Ther*, *26*(11), 2617-2630. doi: 10.1016/j.ymthe.2018.09.003
- Warren, L., Manos, P. D., Ahfeldt, T., Loh, Y. H., Li, H., Lau, F., . . . Rossi, D. J. (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*, *7*(5), 618-630. doi: 10.1016/j.stem.2010.08.012
- Watanabe, K., Ueno, M., Kamiya, D., Nishiyama, A., Matsumura, M., Wataya, T., . . . Sasai, Y. (2007). A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, *25*(6), 681-686. doi: 10.1038/nbt1310
- Wei, C., Jones, K., Timchenko, N. A., & Timchenko, L. (2013). GSK3beta is a new therapeutic target for myotonic dystrophy type 1. *Rare Dis*, *1*, e26555. doi: 10.4161/rdis.26555
- Wheeler, T. M., Leger, A. J., Pandey, S. K., MacLeod, A. R., Nakamori, M., Cheng, S. H., . . . Thornton, C. A. (2012). Targeting nuclear RNA for in vivo correction of myotonic dystrophy. *Nature*, *488*(7409), 111-115. doi: 10.1038/nature11362

- Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., & Campbell, K. H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, *385*(6619), 810-813. doi: 10.1038/385810a0
- Woodruff, G., Phillips, N., Carromeu, C., Guicherit, O., White, A., Johnson, M., . . . Harrington, A. W. (2020). Screening for modulators of neural network activity in 3D human iPSC-derived cortical spheroids. *PLoS One*, *15*(10), e0240991. doi: 10.1371/journal.pone.0240991
- Wooten, M. W., Geetha, T., Babu, J. R., Seibenhener, M. L., Peng, J., Cox, N., . . . Moscat, J. (2008). Essential role of sequestosome 1/p62 in regulating accumulation of Lys63-ubiquitinated proteins. *J Biol Chem*, *283*(11), 6783-6789. doi: 10.1074/jbc.M709496200
- Wooten, M. W., Geetha, T., Seibenhener, M. L., Babu, J. R., Diaz-Meco, M. T., & Moscat, J. (2005). The p62 scaffold regulates nerve growth factor-induced NF-kappaB activation by influencing TRAF6 polyubiquitination. *J Biol Chem*, *280*(42), 35625-35629. doi: 10.1074/jbc.C500237200
- Xia, G., Gao, Y., Jin, S., Subramony, S. H., Terada, N., Ranum, L. P., . . . Ashizawa, T. (2015). Genome modification leads to phenotype reversal in human myotonic dystrophy type 1 induced pluripotent stem cell-derived neural stem cells. *Stem Cells*, *33*(6), 1829-1838. doi: 10.1002/stem.1970
- Xia, G., Santostefano, K. E., Goodwin, M., Liu, J., Subramony, S. H., Swanson, M. S., . . . Ashizawa, T. (2013). Generation of neural cells from DM1 induced pluripotent stem cells as cellular model for the study of central nervous system neuropathogenesis. *Cell Reprogram*, *15*(2), 166-177. doi: 10.1089/cell.2012.0086
- Xu, C., Inokuma, M. S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Gold, J. D., & Carpenter, M. K. (2001). Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, *19*(10), 971-974. doi: 10.1038/nbt1001-971
- Yadava, R. S., Kim, Y. K., Mandal, M., Mahadevan, K., Gladman, J. T., Yu, Q., & Mahadevan, M. S. (2019). MBNL1 overexpression is not sufficient to rescue the phenotypes in a mouse model of RNA toxicity. *Hum Mol Genet*, *28*(14), 2330-2338. doi: 10.1093/hmg/ddz065
- Yin, Q., Wang, H., Li, N., Ding, Y., Xie, Z., Jin, L., . . . Li, J. (2020). Dosage effect of multiple genes accounts for multisystem disorder of myotonic dystrophy type 1. *Cell Res*, *30*(2), 133-145. doi: 10.1038/s41422-019-0264-2
- Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, II, & Thomson, J. A. (2009). Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*, *324*(5928), 797-801. doi: 10.1126/science.1172482
- Zeesman, S., Carson, N., & Whelan, D. T. (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. doi: 10.1002/ajmg.10141
- Zhang, F., Bodycombe, N. E., Haskell, K. M., Sun, Y. L., Wang, E. T., Morris, C. A., . . . Pletcher, M. T. (2017). A flow cytometry-based screen identifies MBNL1 modulators that rescue splicing defects in myotonic dystrophy type I. *Hum Mol Genet*, *26*(16), 3056-3068. doi: 10.1093/hmg/ddx190
- Zu, T., Gibbens, B., Doty, N. S., Gomes-Pereira, M., Huguet, A., Stone, M. D., . . . Ranum, L. P. (2011). Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(1), 260-265. doi: 10.1073/pnas.1013343108
- Zu, T., Guo, S., Bardhi, O., Ryskamp, D. A., Li, J., Khoramian Tusi, S., . . . Ranum, L. P. W. (2020). Metformin inhibits RAN translation through PKR pathway and mitigates disease in C9orf72 ALS/FTD mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *117*(31), 18591-18599. doi: 10.1073/pnas.2005748117