

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

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

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

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

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

LIENS D'INTÉRÊT

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

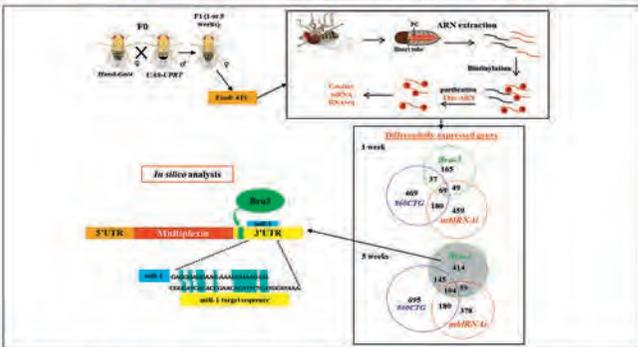
RÉFÉRENCES

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

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

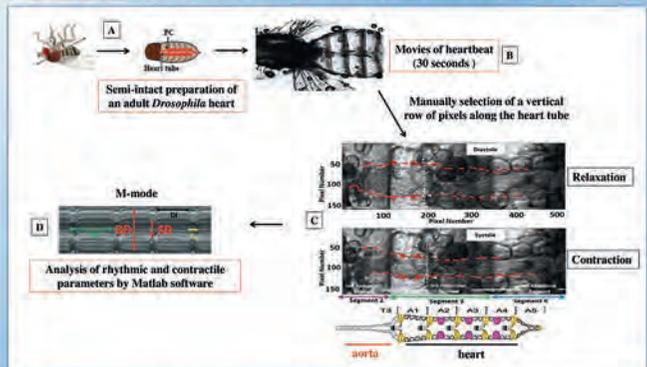
INFOS

Cardiac transcriptome analysis from TU-tagging RNA seq



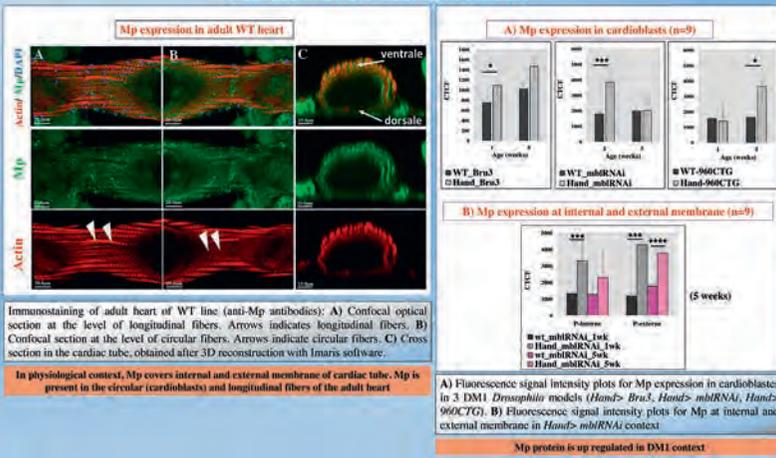
The heart targeting of TU-tagging technique consisted in crossing the *Hand-GAL4* line with *UAS-UPRT*. The UPRT enzyme (Uracil Phosphoribosyl Transferase) will be expressed only in the cardiac tissue of the descendants (F1) according to cardiac driver (*Hand*). After the addition of the modified uracil (4-TU) in the food, the cardiac RNAs are modified by the incorporation of this modified uracil base into the neo-synthesized RNA. After extraction of the total RNAs, the modified RNAs are purified and then sequenced. Cardiac transcriptome analysis of *Drosophila* DMI models (*Hand>Bru3/CELF1*, *Hand>miR RNA/MBNL1*, *Hand>960CTG*) identified genes differentially expressed at one and five weeks of age. The *Multiplexin* "Mip" gene is strongly increased in *Hand>Bru3* context at 5 weeks. *In silico* analysis show that *Mip* is a potential target of *miR-1* and *Bru3*.

Cardiac physiology analysis by SOHA (Semi-intact Optical Heartbeat Analysis) approach



After dissection and preparation of semi-intact adult hearts (A), the heartbeats are filmed by a digital camera by zooming the A3 and A4 (B) segments. The cardiac tube membrane during maximum diastole and systole are defined manually. One pair of marks identifies the diastolic diameter and one pair identifies the systolic diameter (C). From this vertical row of pixels, an M-mode is generated to analyze the contraction and relaxation intervals (D): diastolic (DD), and systolic (SD) diameters, heart period (HP), and systolic (SI) and diastolic (DI) intervals.

Mp protein is up regulated in DMI context



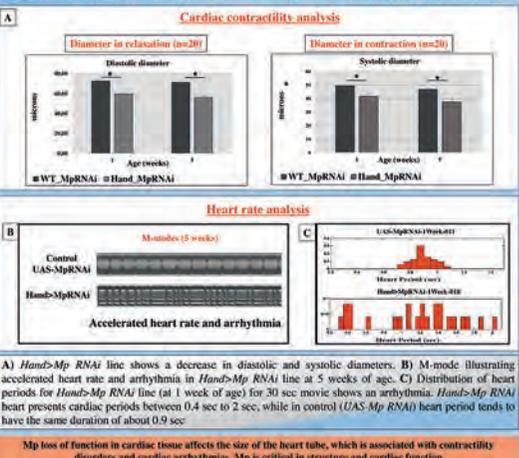
Immunostaining of adult heart of WT line (anti-Mp antibodies): A) Confocal optical section at the level of longitudinal fibers. Arrows indicates longitudinal fibers. B) Confocal section at the level of circular fibers. Arrows indicate circular fibers. C) Cross section in the cardiac tube, obtained after 3D reconstruction with Imaris software.

In physiological context, Mp covers internal and external membrane of cardiac tube. Mp is present in the circular (cardioblasts) and longitudinal fibers of the adult heart

A) Fluorescence signal intensity plots for Mp expression in cardioblasts in 3 DMI *Drosophila* models (*Hand>Bru3*, *Hand>miR RNA*, *Hand>960CTG*). B) Fluorescence signal intensity plots for Mp at internal and external membrane in *Hand>miR RNA* context.

Mp protein is up regulated in DMI context

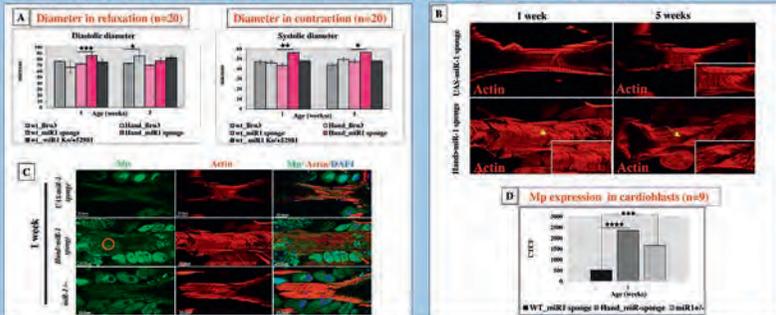
Mp loss of function induces decrease in heart tube size and arrhythmias



A) *Hand>Mp RNAi* line shows a decrease in diastolic and systolic diameters. B) M-mode illustrating accelerated heart rate and arrhythmia in *Hand>Mp RNAi* line at 5 weeks of age. C) Distribution of heart periods for *Hand>Mp RNAi* line (at 1 week of age) for 30 sec movie shows an arrhythmia. *Hand>Mp RNAi* heart presents cardiac periods between 0.4 sec to 2 sec, while in control (*UAS-Mp RNAi*) heart period tends to have the same duration of about 0.9 sec

Mp loss of function in cardiac tissue affects the size of the heart tube, which is associated with contractility disorders and cardiac arrhythmias. Mp is critical in structure and cardiac function

miR-1 loss of function induces dilated cardiomyopathy concomitant with an increase in Mp



A) *miR-1 sponge* line shows increased diastolic and systolic diameters similar to symptoms observed in *Hand>Bru3* model. B) Immunostaining of adult heart for *miR-1 sponge* line (anti-actin antibodies). *miR-1 sponge* line presents disorganization of cardiac muscle fibers in 1 & 5 weeks of age. C) Immunostaining of adult heart of *miR-1 sponge* & *miR1-/-* lines (anti-Mp antibodies) and its fluorescence signal intensity plots for cardioblasts at one week of age (D) showing Mp up regulation in *miR-1* loss of function context suggested probable regulation of Mp by *miR-1*

miR-1 loss of function in heart causes dilated cardiomyopathy and an increase in Mp expression, similar to DMI symptoms

Conclusion

- Functional analysis of Mp in cardiac physiology highlights the importance of Mp protein in cardiac structure and physiology and suggests its involvement in heart defects associated with DMI.
- Our data support the view that the increase of Mp and the decrease of *miR-1* are associated with the cardiac defects observed in DMI.

Perspectives

- Test the direct regulation of Mp by *miR-1* in vivo by generating *GFP-Mp3'UTR* reporter lines (carrying or not the *miR-1* target sequence).
- Testing rescue of heart tube dilatation observed in *Hand>Bru3* by inhibiting the expression of Mp, specifically in heart tissue.

INFOS