

UNIVERSITÉ MONTPELLIER I
UFR de MÉDECINE

Année 2010

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ MONTPELLIER I

Discipline : Génétique Moléculaire
Formation Doctorale: Biologie Santé
École Doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Présentée et soutenue publiquement par

Mouna MESSAOUD KHELIFI

Le 16 Décembre 2010

Titre

**Etude de séquences *cis*-régulatrices
d'épissage dans le gène *DMD*: rôle dans la
régulation des pseudoexons et intérêt pour
le saut d'exon thérapeutique**

JURY

Mme Mireille Claustres
Mme Sylvie Mazoyer
M. Faouzi Baklouti
Mme Sylvie Tuffery-Giraud

PU-PH, Université de Montpellier I
Directeur de Recherche, INSERM, Lyon
Directeur de Recherche, INSERM, Lyon
IR, Université de Montpellier I

Présidente
Rapporteur
Rapporteur
Directeur de Thèse

Titre : Etude de séquences *cis*-régulatrices d'épissage dans le gène DMD : rôle dans la régulation des pseudoexons et intérêt pour le saut d'exon thérapeutique.**Résumé**

L'épissage des **ARN pré-messagers** (pré-ARNm) est une étape essentielle pour l'expression des gènes chez les eucaryotes supérieurs. La reconnaissance des exons par la machinerie d'épissage (le spliceosome) est réalisée grâce à différents **éléments *cis*-régulateurs** incluant les séquences consensus d'épissage et les séquences auxiliaires activatrices ou inhibitrices d'épissage. Le pré-ARNm représente une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement des maladies génétiques. L'approche du **saut d'exon thérapeutique (SET)**, destinée à restaurer l'expression d'une protéine totalement ou partiellement fonctionnelle en interférant avec le processus d'épissage, suscite un grand intérêt notamment pour la **dystrophie musculaire de Duchenne (DMD)** où la modification du transcrit permettrait d'obtenir une forme modérée de la maladie, la Dystrophie musculaire de Becker (BMD). Des **oligonucléotides antisens** (AONs) sont utilisés pour masquer les signaux d'épissage de reconnaissance d'un exon par le spliceosome, et induire son excision (ou saut) du transcrit mature. La détermination de la meilleure séquence cible des AONs est une difficulté majeure de cette approche. Pour le **gène DMD**, nous avons pu établir grâce à des analyses bioinformatiques et statistiques combinées avec des tests fonctionnels utilisant des minigènes rapporteurs d'épissage, que le ciblage de motifs exoniques qui fixent le **facteur d'épissage SF2/ASF** permettait d'obtenir la meilleure efficacité des AONs. Par ailleurs, nous avons exploré la régulation de l'épissage des **pseudoexons** dans le gène *DMD*, et notamment les mécanismes conduisant à l'inclusion de ces séquences introniques dans le transcrit mature en condition pathologique. L'étude de deux cas exceptionnels d'activation de pseudoexons associée à des **remaniements introniques** rares (double délétion, inversion) élargit le spectre des mutations à l'origine de ces défauts d'épissage, et illustre le rôle encore mal connu des remaniements introniques en pathologie humaine.

Mots-clés : Gène *DMD*, épissage, saut d'exon thérapeutique, oligonucléotides antisens, séquences *cis*-régulatrices, pseudoexons, minigènes rapporteurs d'épissage.

Title: Splicing *cis*-regulatory sequences in the *DMD* gene: role in pseudoexons regulation and interest for the therapeutic exon skipping strategy.

Abstract

Splicing of pre-messenger RNAs (pre-mRNAs) to mature transcripts is a crucial step in eukaryotic gene expression. The recognition of exon by the splicing machinery (the spliceosome) involves different ***cis*-regulatory elements**, including the splice site motifs and auxiliary sequences, which can act by stimulating or repressing splicing. The pre-mRNA represents a new therapeutic target for the treatment of genetic diseases. Notably, the exon skipping strategy is currently one of the most promising therapeutic approaches for the Duchenne muscular dystrophy (DMD). It intends to restore the expression of a partially functional protein by interfering with the splicing process, and converts the severe DMD phenotype into the moderate form of the disease, Becker muscular Dystrophy (BMD). **Antisense oligonucleotides** (AONs) are used to mask the splicing signals involved in exon recognition by the spliceosome to induce its skipping from the mature transcript and restore an open reading frame. The determination of the best target sequence of the AONs is one of the major hurdles to overcome. For the ***DMD* gene**, a bioinformatic and statistical analysis combined with minigenes studies allowed us to establish that targeting binding sites for the splicing factor SF2/ASF maximizes the AONs efficiency. In a second part of this work, we investigated the splicing regulation of **pseudoexons** in the *DMD* gene, in particular the mechanisms leading to the inclusion of these intronic sequences in the mature transcript in pathological conditions. The study of two exceptional cases of pseudoexons activation associated with rare **intronic rearrangements** (double-deletions, inversion) expands the spectrum of missplicing mutations, and demonstrates the potential role of pure intronic rearrangements in human pathology.

Key words: *DMD* gene, splicing, therapeutic exon skipping strategy, antisense oligonucleotides, *cis*-regulatory sequences, pseudoexons, minigenes.

Laboratoire d'accueil: INSERM U827 Laboratoire de Génétique de maladies rares. Pathologies moléculaires, études fonctionnelles et banques de données génétiques. IURC, Institut Universitaire de Recherche Clinique ; 641, avenue du doyen Gaston Giraud 34095 MONTPELLIER cedex 5

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à remercier particulièrement le Pr. Mireille Claustres, d'une part de me faire l'honneur d'être la présidente de mon jury de thèse et d'autre part de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir permis de réaliser mon rêve de travailler dans un laboratoire de génétique. Soyez assurée de mon profond respect.

J'exprime toute ma gratitude à ma directrice de thèse, le Dr. Sylvie Tuffery-Giraud, un grand merci pour la qualité de son encadrement, ses compétences, sa disponibilité, sa perspicacité, ses précieux conseils et son soutien inestimable en toutes circonstances. Je te remercie pour l'opportunité que tu m'as donnée d'étudier l'épissage, mais surtout, de m'avoir permis de faire mes premiers pas en génétique humaine et de m'y avoir donné goût.

Je remercie vivement le Dr. Sylvie Mazoyer et le Dr. Faouzi Baklouti d'avoir consacré un temps précieux à l'étude de ces travaux et qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'en être les rapporteurs.



Mes sincères remerciements vont également à toutes les personnes qui à un moment ou à un autre ont participé activement à ces travaux : Nicolas Molinari, Nicole Lautrédou, François-Olivier Desmet, Olivier Leroy, Sandie Le guédard-Mereuze et Julie Miro.

Je remercie sincèrement toute l'équipe diagnostique de DMD qui ont très largement contribué à la mise en place de ces travaux en identifiant et caractérisant les mutations très intéressantes qui ont fait l'objet du deuxième article : Philippe Khau van Kien, Deborah Mechin, Delphine Thorel et Aliya Ishmukhametova.

J'associe à ces remerciements tous les membres de l'unité 827, je vous remercie pour vos encouragements et votre gentillesse mais aussi d'avoir accepté ma différence.



J'exprime toute mon affection à mes amis pour le soutien dont ils m'ont fait part tout au long de cette thèse mais aussi pour tous les moments d'échanges qui m'ont aidé à découvrir d'autres cultures et à m'ouvrir aux autres : Pierre, Andréa, Florin, Erica, Mohammed, Karima,

Sara, Chanez, Amine, Ahmed, Wafa, Fatima, Hamid, Réda, Daniel, Salima, Niels, In, Youlia, Samir, Randjani, Naima et Rym.



Je tiens à exprimer toute ma gratitude et mon amour à ma famille, mes parents, ma sœur Warda et mes frères Seif Eddine et Amine, toujours présents pour moi malgré la distance. Merci de m'avoir donné cette force de ne jamais baisser les bras face aux difficultés plus ou moins importantes de la vie et de garder le courage.

Sommaire

Résumé/Abstract	2
Remerciements	3
Sommaire	5
Liste des Tableaux	9
Table des illustrations	10
Liste des abréviations	12
Introduction	15

Partie A Le processus d'épissage

A. Le processus d'épissage : Mécanisme et régulation	17
I. La réaction d'épissage	21
II. Le spliceosome	22
1. Les composants du spliceosome	22
2. Les différentes étapes de l'assemblage du spliceosome	24
a. Le complexe E	25
b. Le complexe A	25
c. Les complexes B, B* et C	25
3. Les modèles de reconnaissance des sites d'épissage	26
4. Le spliceosome U12	28
III. Les introns de groupe II : Epissage auto-catalytique	28
VI. Les éléments régulateurs d'épissage	28
1. Les séquences consensus d'épissage	29
a. Le site 5' d'épissage ou site donneur	29
b. La région 3' d'épissage	30
2. Les séquences cis-régulatrices d'épissage	31
a. Les séquences "cis" et les facteurs "trans" associés	31
b. Les modèles de fonctionnement des ESEs/ISEs et des ESSs/ISSs	34
c. L'identification des séquences auxiliaires d'épissage et le développement des outils de prédictions bioinformatiques	37
3. La structure secondaire	41
4. Le couplage transcription / épissage	43
5. L'organisation de la chromatine	44
6. La surveillance des ARNs	46

a. Le NMD (Nonsense Mediated mRNA Decay)	46
b. Le NAS (Nonsense-associated Altered Splicing)	47
B. L'altération de l'épissage dans les pathologies humaines	48
I. Les différents types de mutations affectant l'épissage	49
1. Les mutations affectant les sites d'épissage	50
2. Les mutations affectant les séquences auxiliaires d'épissage	51
a. L'altération d'un ESE et / ou création d'un ESS	51
b. La création d'un ISE	53
3. Les mutations altérant la structure secondaire du pré-ARNm	54
4. Les mutations créant ou activant des sites cryptiques d'épissage	56
a. La rétention partielle d'un intron	56
b. La délétion partielle d'un exon	57
c. Insertion d'un pseudoexon	57
5. Les mutations des éléments en trans	58
a. Les mutations affectant les composants du spliceosome	58
b. Les mutations affectant des facteurs protéiques auxiliaires régulant l'épissage	59
III. Les thérapies	59
1. Les thérapies basées sur l'utilisation des molécules pharmaceutiques	59
a. Action sur les facteurs <i>trans</i> de l'épissage	59
b. La translecture des codons stop prématurés	60
2. Les stratégies thérapeutiques basées sur les oligonucléotides antisens	61
a. Les oligonucléotides antisens (AONs)	61
b. La correction des mutations par des snRNAs modifiés	62
c. Le Trans-épissage	62
d. L'ARN interférence (ARNi)	64

Partie B Les dystrophies musculaires de Duchenne et Becker

A. Les dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker	66
I. L'historique	66
II. Les aspects cliniques	67
III. Les aspects moléculaires	69
1. Le gène <i>DMD</i>	69
2. Les différents produits du gène <i>DMD</i>	70
a. Les isoformes complètes de la dystrophine	70
b. La structure de la dystrophine Dp427	70
c. Les isoformes courtes de la dystrophine	72

d. Les isoformes consécutives aux épissages alternatifs	74
3. Le complexe DAPC et son rôle dans le muscle	74
4. Les différents types de mutations	76
5. Corrélations génotype-phénotype : la règle du cadre de lecture dite "règle de Monaco"	79
IV. Les modèles animaux	82
1. Les souris mdx (X-linked muscular dystrophy mice)	82
2. Les modèles canins cxmd (canine X-linked muscular dystrophy)	83
3. Le modèle félin hfmd (hypertrophic feline muscular dystrophy)	84
B. Les différentes stratégies thérapeutiques	84
I. La prise en charge médicale	84
II. La thérapie pharmacologique	85
III. La thérapie cellulaire	86
1. La transplantation des myoblastes	86
2. Les cellules souches	87
IV. La thérapie génique	88
V. Surexpression de l'utrophine	89
VI. Translecture des codons stop	92
VII. Le saut d'exon thérapeutique : application à la DMD	92
1. Le concept	92
2. La validation expérimentale	94
3. L'application	96
4. Les modifications chimiques	100
5. L'administration	102
6. L'expression durable	103
7. Les paramètres de choix des AONs	103
Partie C Définition des meilleures séquences cibles intra-exoniques dans le gène DMD pour l'approche du saut d'exon thérapeutique (SET)	105
Partie D Régulation d'épissage des pseudoexons (Application au gène <i>DMD</i>)	
A. La régulation de l'épissage des pseudoexons	144
I. Le rôle potentiel des pseudoexons	144
II. L'activation des pseudoexons	146
III. La répression des pseudoexons	147
IV. L'étude des pseudoexons du gène <i>DMD</i>	151

Conclusion	189
Références bibliographiques	193
Annexe 1	217
Annexe 2	220
Annexe 3	223