Des mécanismes moléculaires pathologiques aux stratégies de correction génomique in vitro de la Dystrophie Facio-Scapulo-Humérale

Yara Bou Saada

▶ **To cite this version:**

Yara Bou Saada. Des mécanismes moléculaires pathologiques aux stratégies de correction génomique in vitro de la Dystrophie Facio-Scapulo-Humérale. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris Saclay (COmUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLS241 . tel-03357697

HAL Id: tel-03357697

https://theses.hal.science/tel-03357697

Submitted on 29 Sep 2021

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.

NNT : 2016SACLS241

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
L'UNIVERSITE PARIS-SUD

Ecole Doctorale n° 582
CBMS Cancérologie : biologie - médecine - santé

Spécialité de doctorat : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Par

Madame Yara Bou Saada

Des mécanismes moléculaires pathologiques aux stratégies de correction génomique *in vitro* de la Dystrophie Facio-Scapulo-Humérale

Thèse présentée et soutenue à « Gustave Roussy », le « 28 septembre 2016 »

Composition du Jury :

Pr. Benihoud Karim	Professeur à l'Université Paris-Sud	Président
Dr. Hall Janet	Directrice de recherche à l'INSERM	Rapporteuse
Dr. Polesskaya Anna	Chargée de recherche HDR au CNRS	Rapporteuse
Dr. Carnac Gilles	Chargé de recherche HDR au CNRS	Examinateur
Dr. Ishchenko Alexander	Chargé de recherche HDR au CNRS	Examinateur
Dr. Vassetzky Yegor	Directeur de recherche au CNRS	Directeur de thèse
Dr. Hamade Aline	Maître de conférences à l'Université Libanaise	Co-directrice de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements aux membres du jury qui ont accepté d'examiner ce travail. Je remercie sincèrement les Docteurs Janet Hall et Anna Polesskaya pour le temps qu'elles ont consacré à l'examen de ce manuscrit et pour leurs suggestions constructives et didactiques. Je remercie chaleureusement le Professeur Karim Benihoud et les Docteurs Gilles Carnac et Alexander Ishchenko pour leur présence en qualité d'examinateurs au sein de ce jury.

Je remercie sincèrement le Docteur Yegor Vassetzky qui m'a fait confiance durant les cinq années passées au sein de son équipe, et qui était toujours présent pour discuter et proposer des idées créatives. Travailler avec vous m'a apporté une maturité scientifique et m'a appris le travail persévérant, libre et responsable.

Je remercie le Docteur Aline Hamade qui a suivi de près mon parcours universitaire depuis ma licence et mon Master 1 au Liban et jusqu'au doctorat en France.

Je remercie tous nos collaborateurs en France et à l'international, en particulier les Docteurs Gilles Carnac, Eugénie Ansseau et Ruy Luzada, travailler avec vous était une expérience constructive et très enrichissante.

Je remercie très chaleureusement Amis FSH pour les rencontres organisées et les échanges au cours de ces années de travail sur la FSHD. Votre présence, votre encouragement et surtout votre espoir donne un sens à ce travail.

Je remercie sincèrement le Docteur Joëlle Wiels pour m'avoir accueilli au sein de son unité de recherche et d'avoir émis des suggestions et critiques constructives au cours des séminaires de recherche.

Je remercie également le Docteur Marc Lipinski pour ses nombreux conseils, pour avoir suivi de près mon travail de thèse et pour avoir lu avec un œil critique les articles.

Des remerciements pour toute l'UMR 8126, unité de recherche riche en thématiques, en nationalités et en langues. Merci à vous un à un pour avoir contribué, de près ou de loin, à l'accomplissement de ce travail. Je remercie particulièrement chaque personne qui a fait ou fait partie

de l'équipe « Organisation nucléaire et modèles pathologiques », plus particulièrement Carla, Diego, Rawan, Tatyana, et Shirmoné. Gâce à vous le travail au laboratoire était agréable et motivant.

Je voudrais remercier particulièrement Muriel Fuchs pour tous les problèmes résolus grâce à elle et pour son dévouement, Brigitte Cyrille pour sa patience et son professionalisme, et Sokhon Phomsoupha pour ses sourires et ses rires continuels.

Un grand merci à l'Association Française contre les Myopathies pour avoir soutenu les projets de recherche du laboratoire et financé ma quatrième année de thèse.

Une réussite professionnelle découle aussi de la présence d'êtres qui nous sont chers et précieux. Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et ma gratitude envers mes parents, ma source infinie d'amour et d'encouragement. Je vous dois tous mes accomplissements. Un grand merci à ma sœur Maria, mon actrice préférée dont je suis fière. Ton grain de folie et ton humour me rappellent à chaque fois combien la vie est belle ! Merci à ma tante Dalal, ma deuxième mère, mon rêve se réalise aussi grâce à toi ! Je pense aussi à ma famille au Liban, en France et aux Etats-Unis ainsi qu'à ma belle-famille française, votre présence égaye mes jours.

Un grand merci à ma meilleure amie Ilige pour être présente et à l'écoute 24h/24 et pour n'avoir jamais cessé de croire en moi. Je suis fière de toi et de tes accomplissements… nos soirées d'études jusqu'à 4h du matin à la maison, dans des cafés ou dans nos voitures ont finalement abouti !

Merci à mes amis les plus proches ; Eliane pour son encouragement constant, Carla pour ce nouveau lien d'amitié riche en support et en spiritualité, Federica pour une année 2012 exceptionnelle grâce à nos discussions palpitantes et notre passion culinaire, à Michella, Patricia, Samantha-Joe, Joanna, Johny, Rachad, Nathalie, Serah, Corine, Ribal et Toufic. Quelle chance d'être si bien entourée ! Je remercie infiniment Huda, d'abord voisine chaleureuse et serviable devenue ensuite une mère de cœur, destin ou hasard… la Vie est toujours généreuse avec moi !

Pour finir, merci de tout mon cœur à mon mari, Charles-Henry. Les mots ne suffiront jamais pour exprimer tout ce que j'ai envie de te dire… notre Amour nous offre l'Eternité !

A Toi, ma douce incertitude et ma flamme d'espoir,

vagues de turbulences ravageant mon esprit et source de paix apaisant mon cœur.

Que le livre de ma vie me mène à Toi.

Avant-propos

De tout temps, l'étude de la physiologie des maladies a permis de mieux comprendre à la fois les mécanismes cellulaires et moléculaire à leurs origines, et de proposer constamment de nouvelles approches thérapeutiques permettant ainsi, à terme, l'éradication de ces maladies.

La dystrophie Facio-Scapulo-Humérale (FSHD), maladie génétique rare, est une myopathie progressive caractérisée principalement par une atteinte asymétrique des muscles faciaux, scapulaires et huméraux. Les cellules musculaires des patients FSHD sont atrophiques, hypersensibles au stress oxydant et plusieurs voies de signalisation sont dérégulées. Cette myopathie handicapante découle de causes génétiques localisées sur le locus 4q35, ainsi que d'évènements épigénétiques altérant l'organisation chromatinienne de la région génomique en question. L'ensemble de ces altérations génétiques et épigénétiques est accompagné d'une dérégulation de l'expression des gènes du locus 4q35, dont *DUX4*, gène majeur impliqué dans la FSHD. La complexité de cette myopathie la rend jusque-là incurable.

Des recherches extensives sont encore en cours afin de décortiquer les mécanismes moléculaires et cellulaires derrière la FSHD et dans le but de proposer des cibles et des pistes thérapeutiques. Le travail de thèse qui m'a été confié s'inscrit dans ces deux optiques. En effet, mes objectifs de thèse se sont construits autour de plusieurs grandes thématiques que sont la différenciation myogénique, le stress oxydant, les dommages de l'ADN, et les outils de l'édition génomique dans le cadre de stratégies thérapeutiques. L'ensemble de ces notions sont abordées dans l'introduction ci-après. Mon travail s'est articulé sur deux volets distincts. Il a concerné, dans un premier temps, l'implication des dommages de l'ADN et du stress oxydant dans la pathophysiologie de la FSHD et est exposé dans les deux premières parties de la section des résultats. Comme la FSHD est due aussi à des modifications épigénétiques altérant la structure de la chromatine, le deuxième volet de ma thèse propose deux stratégies de correction génomique ayant pour but de rétablir la conformation chromatinienne du locus 4q35 et seront détaillées dans la troisième partie des résultats.

Sommaire

Liste des abréviations *15*

Liste des figures *19*

Liste des tableaux *21*

Introduction *23*

1 Dystrophie Facio-Scapulo-Humérale : un modèle génétique et épigénétique original 25

1.1 Historique de la Dystrophie Facio-Scapulo-Humérale 25

1.2 Description clinique de la FSHD 26

1.3 Génétique de la FSHD 28

1.3.1 Caractérisation du locus FSHD 28

1.3.2 La délétion d'unités D4Z4 sur le locus 4q35 31

1.3.3 Les polymorphismes génétiques permissifs pour la FSHD 33

1.4 Les gènes du locus FSHD 34

1.4.1 DUX4c 34

1.4.2 FRG1 35

1.4.3 FRG2 36

1.4.4 TUBB4Q 36

1.4.5 ANT1 37

1.4.6 FAT1 37

1.4.7 DUX4 38

Origine et caractérisation de *DUX4* 38

Expression génique de *DUX4* dans la FSHD 39

Effets pathologiques liés à l'expression de *DUX4* dans la FSHD 40

1.5 Les gènes en *trans* impliqués dans la FSHD 44

1.6 Epigénétique de la FSHD 45

1.7 Les principales voies de signalisation dérégulées dans la FSHD 49

1.8 Les modèles animaux proposés pour la FSHD 51

2 La différenciation myogénique des myoblastes normaux et des myoblastes FSHD 57

2.1 Organisation du muscle squelettique 57

2.2 La myogenèse et la régénération du muscle strié squelettique 59

2.2.1 La formation des fibres musculaires 60

2.2.2 Les cellules satellites et la régénération musculaire 62

2.3 La différenciation myogénique *in vitro* des myoblastes FSHD 63

3 Le stress oxydant, les dommages de l'ADN et leurs implications dans l'homéostasie musculaire 67

3.1 Les espèces réactives de l'oxygène, les défenses cellulaires antioxydantes : entre l'homéostasie redox et le stress oxydant 67

3.2 Les dommages oxydatifs de l'ADN et les voies de détection et de réparation de l'ADN 71

3.2.1 Les lésions oxydatives de l'ADN 71

3.2.2 La réponse aux dommages de l'ADN (DDR) : gardien de l'intégrité génomique 73

Les prinicpales voies de détection des dommages de l'ADN 74

Les voies de réparation de l'ADN 76

3.3 Le stress oxydant et l'homéostasie musculaire 80

3.3.1 Les rôles physiologiques des ROS dans le muscle squelettique 81

3.3.2 Les effets néfastes du stress oxydant sur le muscle squelettique 81

3.4 L'influence des dommages de l'ADN sur la différenciation myogénique et la fonction musculaire 84

3.5 Les dommages de l'ADN dans les maladies neuromusculaires 86

3.6 Les marqueurs du stress oxydant dans la FSHD 87

4 Stratégies thérapeutiques de la FSHD : interférence par ARN, transplantation autologue et ingénierie génétique *in vitro* 90

4.1 Les stratégies de thérapies cellulaires et génétiques développées dans le cadre des dystrophies musculaires : principes, applications et limitations 90

4.2 Transplantation autologue dans le cadre de la FSHD 107

4.3 Approches de la répression génique de *DUX4* 108

4.4 Répression épigénétique de *DUX4* à l'aide du variant CRISPR/dCas9 109

Hypothèses et objectifs 111

Résultats 115

1 DUX4 induit des dommages à l'ADN et un stress oxydant affectant la différenciation myogénique des myoblastes FSHD 117

2 Les myoblastes FSHD sont capables de réparer les dommages de l'ADN modérés induits par de faibles doses de stress oxydant 150

3 Stratégies de correction génomique de la FSHD 161

3.1 Correction phénotypique et transcriptomique des myotubes hybrides normaux-FSHD 163

3.2 TALENs et CRISPR/Cas9 ciblant la région 4qA161 : conception et validation de ces outils 165

3.2.1 La détection par PCR génomique de la translocation t(8 ;14) reproduite à l'aide de deux nucléases artificielles 167

3.2.2 La vérification de la capacité de coupure des TALENs et CRISPR/Cas9 ciblant 4q35 169

3.2.3 La sensibilité de la technique de détection par PCR génomique des translocations provoquées par les outils de l'édition génomique 170

3.3 La conception d'une protéine de fusion dCas9-CTCF-GFP ciblant 4qA161 comme stratégie de correction « épigénétique » de la FSHD 172

Discussion.....177

1 Le stress oxydant et les dommages de l'ADN : composantes intrinsèques à la FSHD liées à l'expression aberrante de *DUX4* et impliquées dans la pathophysiologie de cette myopathie..... 179

2 Vers une stratégie thérapeutique ciblée en remaniant le génome et l'épigénome : approches thérapeutiques potentielles 182

Conclusions 185

Perspectives.....189

Matériels & Méthodes.....195

1 Lignées cellulaires..... 197

1.1 Préparation des flasques de culture / boites de Pétri à collagène 197

1.2 Culture des myoblastes primaires en condition de prolifération 197

1.3 Culture des myoblastes humains immortalisés (LHCN-M2) 198

1.4 Culture de la lignée cellulaire de rhabdomyosarcome TE-671 198

1.5 Culture de la lignée cellulaire HeLa..... 199

1.6 Différenciation myogénique des myoblastes primaires en myotubes par déplétion en sérum 199

1.7 Différenciation myogénique des LHCN-M2 transfectés par DUX4 199

2 Transfections 200

2.1 Transfections des myoblastes primaires..... 200

2.2 Transfection des myoblastes humains immortalisés (LHCN-M2) 200

2.3 Transfection des TE-671 et des HeLa 203

2.4 Transfection des HeLa par les plasmides TALENs et les plasmides CRISPR-Cas9 203

2.5 Transfection des fibroblastes immortalisés MRC5-SV2 par les plasmides TALENs et les plasmides CRISPR-Cas9..... 204

3 Traitements..... 204

3.1 Traitement des myoblastes primaires en prolifération ou en différenciation au Tempol ou à la N-acétylcystéine (NAC)..... 204

3.2 Traitement au Tempol des myoblastes primaires et des LHCN-M2 transfectés par DUX4 antérieurement à l'évaluation des dommages à l'ADN 205

3.3 Traitement des myoblastes primaires/immortalisés au H2O2..... 205

4 Test des comètes en condition alcaline et quantification des dommages à l'ADN 206
5 Détection et quantification des sites apuriniques/apyrimidiques (sites AP) 207
6 Détection des espèces réactives de l'oxygène (ROS) par marquage au Dihydroéthidium dans les cellules vivantes 208
7 Immunofluorescence 209
7.1 Immunofluorescence et quantification du signal fluorescent 209
7.2 Analyse et quantification des myotubes à phénotype déformé 210
8 Transfert de protéines (Western blot) 210
9 Western blot pour la détection de la protéine DUX4 212
10 Transcription inverse et Réaction en chaîne par polymérase quantitative (qRT-PCR) ... 212
11 Analyses statistiques 213
12 Conception et clonage des outils de l'édition du génome 214
12.1 Conception de la protéine de fusion CTCF-dCas9-GFP et clonage de CTCF dans le vecteur plasmidique 214
12.1.1 Conception de la protéine de fusion CTCF-dCas9-GFP 214
12.1.2 Clonage de CTCF dans le vecteur plasmidique dCas9-GFP: 215
12.2 Conception et clonage des ARN guides 216
12.2.1 Conception et clonage des gARN relatifs aux expériences avec le vecteur plasmidique CTCF-dCas9-GFP 217
12.2.2 Conception et clonage des gARN relatifs aux expériences avec le vecteur plasmidique CRISPR/Cas9 217
12.3 Conception des amorces pour le séquençage de la protéine de fusion CTCF-dCas9-GFP 219
12.4 Conception et production des TALENs 220
13 PCR génomique pour la détection des translocations 220
13.1 Amplification par PCR de la région de translocation et détermination de la taille des amplicons par électrophorèse sur gel d'agarose 220
13.2 Dilutions en série de l'ADN génomique et quantification de l'intensité des bandes d'ADN sur le gel d'agarose 221

Publications 223

1 Publications relatives au travail de thèse 225
2 Publications non relatives au travail de thèse 225

Références 245

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
8-OH-dG	8-hydroxy-2'-deoxyguanosine
AAV	Virus adéno-associé
AGO2	Argonaute 2
AKT	Protéine kinase B
ANOVA	Analyse de la variance
ANT1	Adenine Nucleotide Translocator 1
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	ATM-related
BER	Réparation par excision de base
BRCA1	Breast cancer type 1
BRCA2	Breast cancer type 2
BrdU	Bromodésoxyuridine
BSA	Albumine de sérum bovin
CAT	Catalase
CD56/NCAM	Molécule d'adhésion des cellules neurales
CDK	Kinases dépendantes des cyclines
Chk1	Checkpoint kinase 1
Chk2	Checkpoint kinase 2
CKI	Inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CRISPRi	Interférence par CRISPR
CTCF	CCCTC-Binding factor
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DBE	D4Z4 Binding Element
dCas9	dead-Cas9
DDR	DNA damage response
DEFB103	Défensine beta 103
DHE	Dihydroéthidium
DMD	Dystrophie musculaire de Duchenne
DME1	DUX4 Myogenic Enhancer 1
DME2	DUX4 Myogenic Enhancer 2
DMI	Index de déformation myogénique
DRC	D4Z4 Recognition Complex
DSB	Cassure double brin
DUX4	Double homeobox 4
DUX4c	DUX4 centromérique
DUX4-fl	DUX4 full length
DUX4-s	DUX4 short
FAT1	FAT Atypical Cadherin 1
FRG1	FSHD Region Gene 1
FRG2	FSHD Region Gene 2
FR-MAR	FSHD-Related Region S/MAR
FSHD	Dystrophie Facio-Scapulo-Humérale
gARN	ARN guide
GPX	Glutathion peroxidase
GR	Glutathion réductase
GSH	Glutathion
GSSG	Disulfure de glutathion

GST	Glutathion S-transférase
H2AX	Histone 2A variant X
H2B	Histone 2B
H3K9me3	Triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3
H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène
HMGB2	High-mobility group protein B2
HRP	Peroxydase de raifort
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
iMyo	Myoblastes immortalisés humains
KLF15	Krüppel-like factor 15
KRAB	Krüppel-associated box
LGMD	Dystrophie musculaire des ceintures
MEF2	Myocyte Enhancer Factor 2
MFI	Index de fusion myogénique
miARN	microARN
MMR	Réparation des mésappariements de bases
MRF	Facteur de régulation myogénique
MuRF1	Muscle Ring Finger 1
MYF5	Myogenic factor 5
MYOG	Myogénine
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF-kB	Nuclear factor- kappa B
NHEJ	Réparation par la jonction d'extrémités non homologues
NLS	Signal de localisation nucléaire
NOX	NADPH oxydases
Nrf2	Nuclear factor, erythroid 2-Like 2
$O_2^{\circ-}$	Radical superoxyde
OCDL	Non-DSB Oxidative clustered bi-stranded DNA lesions
OGG1	8-Oxoguanine glycosylase
OH°	Radical hydroxyle
ORF	Cadre de lecture
Otx	domaine « orthodenticle »
PAM	Protospacer-associated motif
PAX3	Paired box 3
PAX7	Paired box 7
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PFA	Paraformaldéhyde
PI	Iodure de propidium
PITX1	Paired-like homeodomain transcription factor 1
PMO	Phosphorodiamidate morpholino oligo
pMyo	Myoblastes primaires
prd	Domaine "paired"
qRT-PCR	Transcription inverse et Réaction en chaîne par polymérase quantitative
RB	protéine du rétinoblastome
RD	Rhabdomyosarcome
RFLP	Polymorphisme de longueur des fragments de restriction
RH	Réparation par la recombinaison homologue
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RVD	Repeat-Variable Diresidues
siARN	small interfering RNA
signal PolyA	Signal de polyadénylation
Site AP	site apurinique/apyrimidique
SMCHD1	Structural Maintenance of Chromosomes flexible Hinge Domain containing 1

SNP	Polymorphisme d'un seul nucléotide
SOD	Superoxyde dismutase
SSB	Cassure simple brin
SSLP	Simple Sequence Length Polymorphism
SVF	sérum de veau fœtal
TALEN	Nucléase effectrice de type activateur de transcription
TM	Tail moment
TP53	Tumor protein P53
TUBA1A	Chaine α-1A de la tubuline
TUBB4Q	Tubulin, beta polypeptide 4, member Q
UTR	Untranslated region
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
XPC	gène Xeroderma pigmentosum groupe C
YAC	Chromosome artificiel de levures
YY1	Yin Yang 1

Liste des figures

Figure 1. Représentation schématique des muscles atteints dans la dystrophie Facio-scapulo-humérale (FSHD) ainsi que des muscles épargnés

Figure 2. Organisation du locus 4q35 et conditions permissives à la FSHD

Figure 3. Effets cellulaires pathologiques liés à la surexpression de *DUX4*

Figure 4. Evènements épigénétiques dans la FSHD

Figure 5. Organisation des boucles chromatiniennes en 4q35 dans la FSHD

Figure 6. Organisation du muscle squelettique adulte

Figure 7. Origine embryonnaire du muscle squelettique et processus de la différenciation myogénique

Figure 8. Anomalies histologiques du muscle squelettique FSHD à différents stades de l'atteinte masculaire

Figure 9. Anomalies phénotypiques des myotubes FSHD *in vitro*

Figure 10. Schéma simplifié du système cellulaire de défense antioxydant et des principales sources de ROS

Figure 11. Le déséquilibre entre la production de ROS et le système antioxydant définit un état de stress oxydant

Figure 12. Les dommages oxydatifs de l'ADN

Figure 13. Les principales voies de détection des dommages de l'ADN

Figure 14. La réparation de l'ADN par excision de base

Figure 15. Les mécanismes de réparation des cassures double brin de l'ADN

Figure 16. Les effets cellulaires et tissulaires des ROS

Figure 17. Représentation schématique d'une paire de TALEN ainsi que des systèmes CRISPR/Cas9 et CRISPR/dCas9 associés à leur séquence génomique cible

Figure 18. Représentation schématique de la stratégie de correction génomique visant le variant pathogénique 4qA161 à l'aide du système CRISPR/Cas9 et d'un couple de TALENs

Figure 19. Mise en évidence de l'efficacité de la technique d'amplification par PCR génomique de la translocation induite par TAL8 et TAL14

Figure 20. Mise en évidence de l'efficacité de ciblage et de coupure spécifique en 4q35 de TAL4 et de 18g1

Figure 21. Les limites de la détection des translocations basée sur la PCR génomique

Figure 22. Représentation schématique de la stratégie de correction génomique visant le variant pathogénique 4qA161 à l'aide de la protéine de fusion CTCF-dCas9-GFP

Figure 23. Conception des vecteurs plasmidiques relatifs à la stratégie de correction génomique à l'aide de la protéine de fusion CTCF-dCas9-GFP

Figure 24. Représentation schématique et linéaire du plasmide circulaire comprenant la séquence de Cas9 et dans lequel la séquence de l'ARN guide est clonée

Liste des tableaux

Tableau 1. Les approches *in vivo* de surexpression de *DUX4*

Tableau 2. Modèles animaux indépendants de *DUX4*

Tableau 3. Caractéristiques des cultures de myoblastes primaires normaux et FSHD

Tableau 4. Liste des plasmides utilisés dans les expériences de transfections

Tableau 5. Liste et caractéristiques des anticorps primaires et secondaires utilisés dans le cadre des expériences d'immunofluorescence

Tableau 6. Liste et caractéristiques des anticorps primaires et secondaires utilisés dans les expériences de transfert de protéines (Western Blot)

Tableau 7. Liste des amorces sens (F) et anti-sens (R) utilisées dans les expériences de qRT-PCR

Tableau 8. Liste des oligonucléotides double-brin sens et anti-sens conçus pour le clonage des séquences des ARN guides dans le plasmide pU6-sgRNA EF1Alpha-puro-T2A-BFP

Tableau 9. Liste des oligonucléotides double-brin sens et anti-sens conçus pour le clonage des séquences des ARN guides dans le plasmide CRISPR/Cas9

Tableau 10. Liste des amorces sens (F) et anti-sens (R) conçues pour le séquençage de CTCF-dCas9-GFP

Tableau 11. Liste des amorces sens et anti-sens employées dans les expériences d'amplification par PCR génomique des régions de translocation

Introduction

1 Dystrophie Facio-Scapulo-Humérale : un modèle génétique et épigénétique original

1.1 Historique de la Dystrophie Facio-Scapulo-Humérale

En 1861, le médecin français Guillaume Duchenne à qui l'on doit la découverte et la description de la maladie de Duchenne, s'est intéressé, lors de ses recherches cliniques, au diagnostic et à l'étude des syndromes de « paralysie musculaire pseudo-hypertrophique ». Il décrivit notamment « l'atrophie musculaire graisseuse progressive de l'enfance » qui se caractérise par l'apparition chez le jeune enfant (âge de 5 à 7 ans) d'une atrophie faciale envahissant progressivement les muscles des membres supérieurs, du tronc et pouvant s'étendre jusqu'aux membres inférieurs (Duchenne 1868). Cette description a permis de distinguer l'atrophie musculaire graisseuse progressive de l'enfance de la paralysie musculaire hypertrophique, et correspond à ce qu'on dénomme aujourd'hui la Dystrophie Facio-Scapulo-Humérale (FSHD).

Indépendamment des travaux de Guillaume Duchenne, le neurologiste allemand Wilhelm Erb introduit pour la première fois la notion de « dystrophie musculaire progressive » et décrit en 1884 une forme juvénile d'atrophie musculaire progressive, qui concerne la ceinture scapulaire et les muscles du périnée, mais Wilhelm Erb n'a pas mentionné d'atteinte des muscles faciaux (Erb 1884).

En 1885, deux médecins français Louis Landouzi et Jules Déjérine, publient un article décrivant pour la première fois la « myopathie atrophique progressive ; myopathie sans neuropathie débutant d'ordinaire dans l'enfance, par la face » (Landouzy, L and Dejerine 1885). Leur description de cette myopathie découle du suivi d'une famille pendant 11 ans et plus précisément d'un des frères présentant une atrophie des muscles faciaux à partir de l'âge de 3 ans, qui petit à petit a progressé dès l'âge de 17 ans pour attendre la ceinture scapulaire ainsi que les membres supérieurs, puis, ensuite, le tronc et la ceinture pelvienne. Cette myopathie n'est accompagnée ni de paralysie, ni de perturbation sensorielle, ni d'atteinte nerveuse. Bien que les descriptions de cette myopathie atrophique progressive faites par Guillaume Duchenne et Wilhelm Erb rejoignent celles de Louis Landouzi et Jules Déjérine, ces derniers ont minutieusement reconnu les particularités cliniques, la variabilité clinique et plus tard établi des critères diagnostics de cette myopathie progressive qu'ils nommèrent de type facio-scapulo-

huméral (Landouzy, L and Dejerine 1885; Landouzy, L and Dejerine 1886). Leur nom est par conséquent éponyme à la FSHD.

1.2 Description clinique de la FSHD

Les dystrophies musculaires constituent un groupe hétérogène de maladies génétiques caractérisées par une faiblesse et une dégénérescence progressive de certains muscles squelettiques. Plus d'une trentaine de dystrophies musculaires qui diffèrent par la sévérité de l'atteinte musculaire, l'âge de l'apparition des symptômes, l'évolution de la maladie et le mode de transmission héréditaire ont été décrites. Alan Emery décrivit en 2002 six dystrophies musculaires majeures caractérisées par leurs distributions typiques de l'atteinte musculaire et dont faisait partie la FSHD (Emery 2002).

La FSHD fait partie des myopathies les plus communes ; elle est considérée comme étant la troisième maladie musculaire héréditaire en terme de fréquence, et la myopathie la plus fréquente chez l'adulte. Selon Orphanet et OMIM, sa prévalence moyenne est estimée à 1/20000, mais une étude néerlandaise récente estime une prévalence de l'ordre de 1/8333 dans la population néerlandaise suggérant ainsi la FSHD comme la myopathie la plus fréquente (Deenen et al. 2014). Environ 870 000 individus sont atteints de la FSHD dans le monde (www.fshsociety.org), nombre probablement sous-estimé dû à l'existence de cas non diagnostiqués. D'après les données de l'Observatoire français DMFSH (Dystrophie Musculaire Facio-Scapulo-Humérale), environ 3250 patients FSHD sont diagnostiqués en France.

D'un point de vue clinique, la FSHD se déclare le plus souvent dans l'enfance ou l'adolescence et se caractérise par deux particularités de l'atteinte musculaire, son asymétrie et sa distribution spécifique suivant un mode descendant, la distinguant des autres myopathies **(Figure 1)**. L'atteinte de certains muscles faciaux spécifiques, notamment les muscles orbiculaires et ceux des paupières et des lèvres, constitue souvent le début de la FSHD, marquée surtout par l'inexpressivité faciale, la difficulté de sourire et de fermer complètement les yeux. Les muscles oculomoteurs, masséters, temporaux et du pharynx sont épargnés. Ces premiers signes apparaissent lentement et peuvent passer inaperçus, retardant ainsi le diagnostic. L'atteinte asymétrique des muscles de la ceinture scapulaire et des muscles huméraux survient ensuite et se manifeste par la difficulté à lever le bras au-dessus de

l'horizontale, des épaules tombantes et en avant, et la saillie de l'omoplate. Cette atteinte « facio-scapulo-humérale » a été ainsi attribuée à cette myopathie.

La maladie s'étend selon un mode progressif, lent et descendant et peut toucher par la suite les muscles abdominaux et ceux de la ceinture pelvienne, des membres inférieurs et des pieds. Dans la moitié des cas, les muscles fessiers sont également atteints provoquant la bascule du bassin et qui, associée à la faiblesse des muscles abdominaux, entraine une hyperlordose lombaire. L'atteinte des muscles releveurs des pieds (muscle tibial antérieur et les muscles extenseurs des pieds) entraine un steppage. Cette évolution descendante des atteintes musculaires avec l'âge ainsi que l'atrophie et la faiblesse musculaires progressives rendent la FSHD très invalidante. Au-delà de 50 ans, 20% des patients FSHD perdent la marche et sont contraints d'utiliser un fauteuil roulant. (Padberg 1982; Lunt & Harper 1991; R Tawil et al. 2014; Richards et al. 2012).

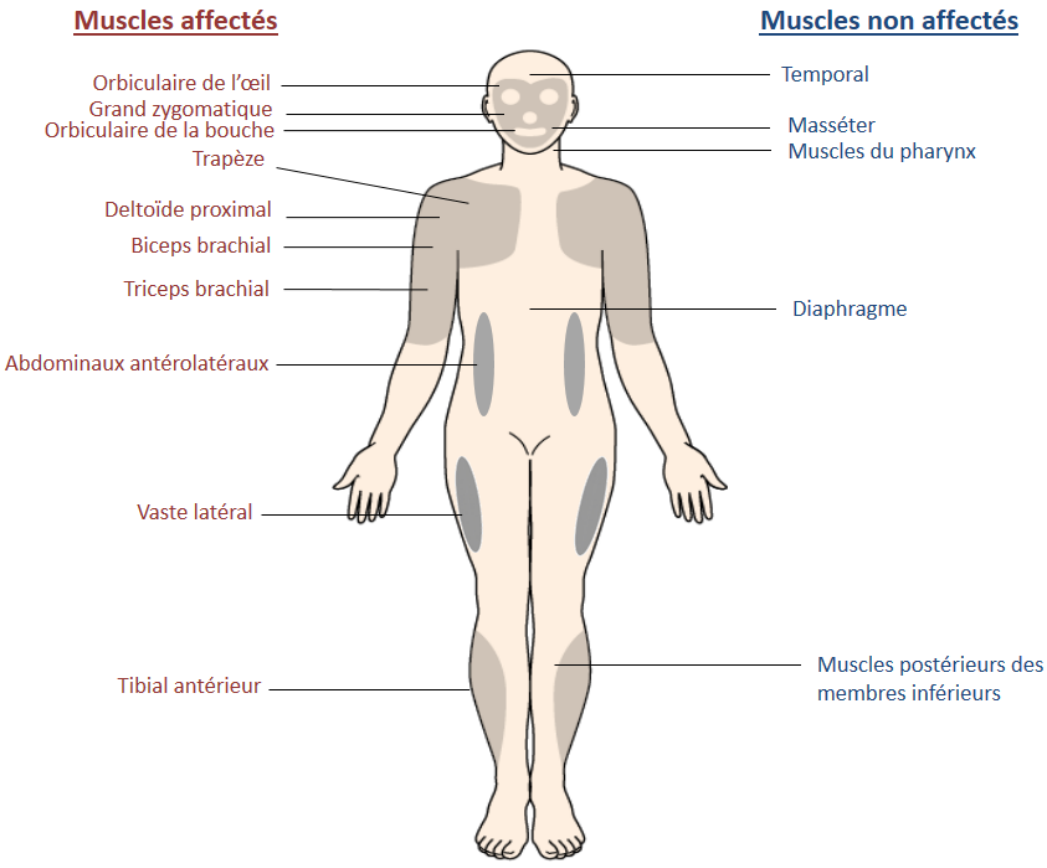


Figure 1. Représentation schématique des muscles atteints dans la dystrophie Facio-scapulo-humérale (FSHD) ainsi que des muscles épargnés. Figure adaptée à partir de Emery et al. *The Lancet* 2002.

Une grande variabilité intra- et inter-familiale est observée dans le cas de la FSHD. Bien que la FSHD ait une pénétrance de 95% à 20 ans (Lunt et al. 1989) chez les patients symptômatiques, les symptômes peuvent apparaitre à un âge très précoce (1 ans) ou très tardif (60 ans), avec une atteinte plus sévère dans le cas de la FSHD infantile (phénotype FSHD apparaissant à l'âge de 1 à 4 ans) contraignant les patients à utiliser le fauteuil roulant dès leur jeune âge (Klinge et al. 2006; Padberg 1982; Lunt et al. 1989). Près de 20% des patients demeurent asymptomatiques (pour revue (Rabi Tawil et al. 2014)).

A l'atteinte musculaire peuvent s'ajouter des manifestations cliniques non musculaires telles qu'une perte de l'audition et une télangiectasie rétinienne dans 75% et 60% des cas respectivement (Padberg et al. 1995). Dans de très rares cas, un retard mental (Saito et al. 2007), une insuffisance respiratoire (Wohlgemuth et al. 2004; D'Angelo et al. 2011) et des complications cardiaques peuvent survenir (Laforêt et al. 1998; Tsuji et al. 2009) (pour revue (Statland & Tawil 2014)).

Pour finir, les patients FSHD souffrent fréquemment de douleur et de fatigue. Bien que la FSHD soit une pathologie invalidante surtout avec l'âge, elle ne modifie cependant pas l'espérance de vie des patients.

1.3 Génétique de la FSHD

1.3.1 Caractérisation du locus FSHD

Jusqu'à la fin des années 80, le diagnostic de la FSHD se basait essentiellement sur les manifestations cliniques et sur son caractère héréditaire à mode de transmission autosomique dominante, avec toutefois l'existence de 10 à 30% de cas sporadiques, sans antécédent familial connu, émergeant suite à des mutations de novo (Zatz et al. 1995). Approximativement la moitié des cas sporadiques sont dus à des mutations post-zygotiques provoquant ainsi un mosaïsme (Bakker et al. 1996; van der Maarel et al. 2000).

Grâce aux progrès de la biologie moléculaire des années 1980, l'identification et la localisation des gènes responsables des maladies à l'aide de la cartographie génétique, et surtout avec le développement de nouveaux marqueurs polymorphiques de type microsatellites (Weber & May 1989),

ont rendu possible la localisation du locus responsable de la FSHD, notamment par clonage positionnel, sur le chromosome 4 en 1990 (Wijmenga et al. 1990; Upadhyaya & Cooper 2002), et plus précisément en 4q35 (Wijmenga et al. 1991).

Suite à cette découverte révolutionnaire dans le domaine de la FSHD, plusieurs études ont permis de mieux caractériser le locus FSHD. A l'aide d'une sonde sous-clonée du cosmide E13, nommée p13E-11, qui s'hybride sur le locus 4q35, l'équipe de G. Padberg a découvert par Southern-blot un polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) de EcoRI associé à la FSHD ; en effet, cette sonde a révélé des fragments EcoRI plus courts chez les patients FSHD (14 à 28 kb) par rapport aux individus sains (fragment > 28kb) (Wijmenga et al. 1992). Le Southern-blot basé sur l'hybridation de la sonde p13E-11 à l'ADN génomique digéré par EcoRI devint dès lors la technique de référence pour le diagnostic moléculaire de la FSHD, les fragments EcoRI de taille inférieure à 38 kb étant associés à la FSHD (Deidda et al. 1996; Lemmers et al. 2001).

Le fait que la taille des fragments EcoRI variait d'un patient FSHD à l'autre et que le cosmide E13 comportait plusieurs copies d'une séquence de 3.3kb, supportait l'hypothèse que la FSHD résultait d'une délétion d'un nombre de répétitions (van Deutekom et al. 1993), qui furent nommées D4Z4 (D pour DNA, 4 correspond au chromosome 4 et Z à la nature répétitive de la séquence). La cartographie physique de la région FSHD a pu finalement être établie à partir d'un chromosome artificiel de levures (YAC) (y25C2E) (Wright et al. 1993) **(Figure 2 A, B)**.

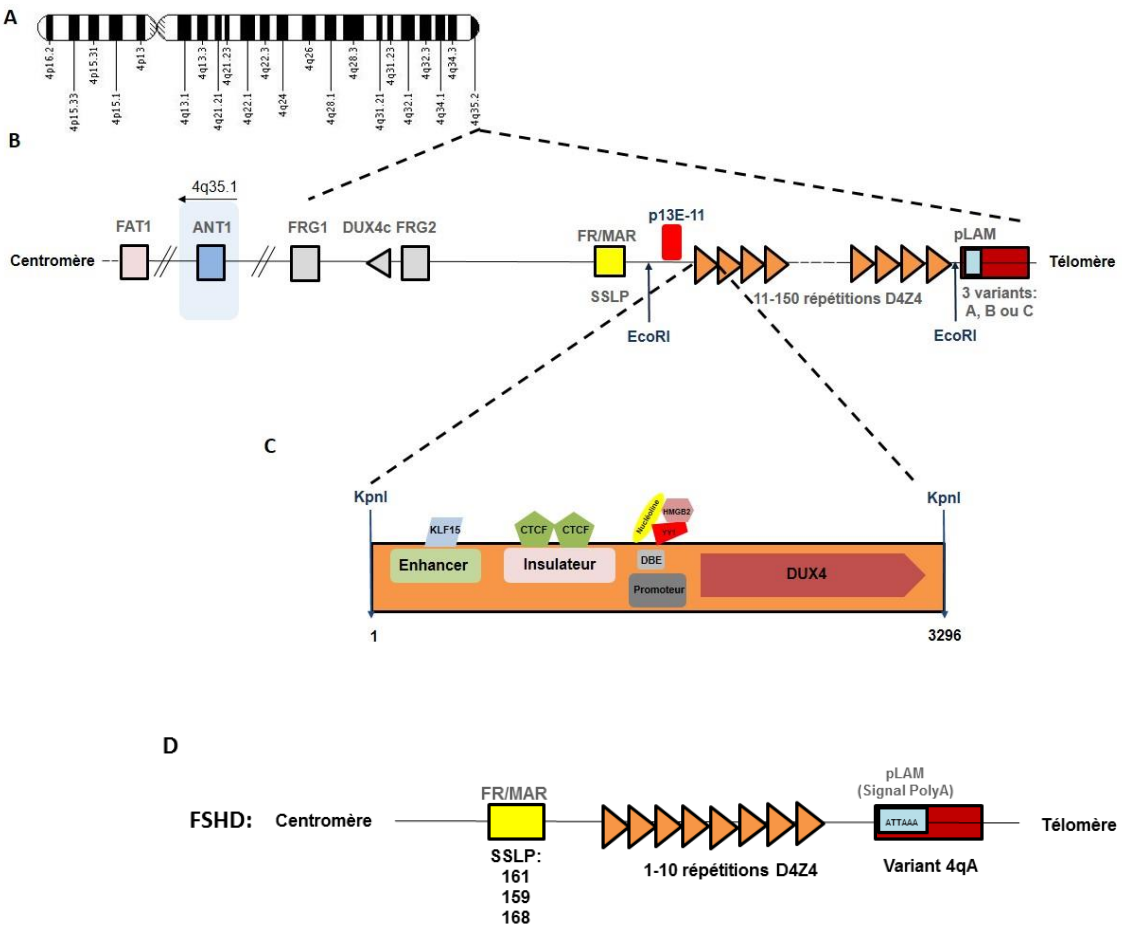


Figure 2. **Organisation du locus 4q35 et conditions permissives à la FSHD. (A)** Représentation schématique du chromosome 4 avec le locus 4q35 à son extrémité télomérique. **(B)** Représentation schématique de l'organisation du locus 4q35, des sites de restriction de EcoRI et du site de reconnaissance de la sonde p13E-11. **(C)** Organisation d'une unité D4Z4, correspondant au fragment de restriction de KpnI, comprenant le cadre de lecture de *DUX4*. Les chiffres « 1 » et « 3296 » correspondent à la première et la dernière base du fragment de restriction respectivement. **(D)** Les évènements génétiques rendant le chromosome 4 permissif à la FSHD : la réduction du nombre de répétitions D4Z4 au-dessous de 10 unités, la présence du variant 4qA du côté télomérique comprenant un signal de polyadénylation (signal PolyA), et la présence d'un des 3 polymorphismes du côté centromérique 4qA161, 159 ou 168 au niveau de la séquence SSLP. Cette figure n'est pas représentée à l'échelle exacte. FR/MAR : FSHD-Related Region S/MAR ; pLAM : séquence régulatrice comprenant une séquence de polyadénylation ; ANT1 : Adenine Nucleotide Translocator 1 ; FAT1 : FAT Atypical Cadherin 1 ; FRG1 : FSHD Region Gene 1 ; DUX4c : centromeric DUX4 ; FRG2 : FSHD Region Gene 2 ; DUX4 : Double homeobox 4 ; KLF15 : Krüppel-like Factor 15 ; CTCF : CCCTC-Binding factor ; YY1 : Yin Yang 1 ; HMGB2 : High-mobility group protein B2; DBE: D4Z4 Binding Element; SSLP: Simple Sequence Length Polymorphism.

1.3.2 La délétion d'unités D4Z4 sur le locus 4q35

La structure de la séquence D4Z4 présente en plusieurs copies dans le cosmide E13 a été par la suite caractérisée ; séquence macrosatellite de 3,3 kb pouvant être excisée de part et d'autre par l'enzyme de restriction KpnI, D4Z4 comportait deux boites homéotiques précédées d'un cadre de lecture, et deux séquences répétitives (van Deutekom et al. 1993; Hewitt et al. 1994). Les séquences D4Z4 constituent des répétitions de 3,3 kb répétées en tandem, trouvées nombreuses et dispersées au niveau des régions hétérochromatiques dans le génome humain. Des séquences homologues à D4Z4 sont trouvées dans le bras court de tous les chromosomes acrocentriques et sur les régions télomériques des bras longs des chromosomes 4 et 10, toujours groupées sous forme de répétitions en tandem (Hewitt et al. 1994; Lyle et al. 1995). Le nombre des répétitions D4Z4 en 4q35 varie de 11 à plus de 100 copies chez les individus sains, tandis que chez les patients FSHD le locus n'en contient que de 1 à 10 copies (van Deutekom et al. 1993) (Figure 2D). Bien que les manifestations cliniques soient variables d'un patient à l'autre, de façon générale, une corrélation existe entre le nombre de répétitions D4Z4 résiduels, l'âge de l'apparition des symptômes et la sévérité de l'atteinte musculaire. En effet, les patients ayant les fragments EcoRI les plus courts manifestent les formes les plus sévères de la FSHD et présentent un âge de début de la maladie plus précoce (Goto et al. 1995; Lunt et al. 1995; Tawil et al. 1996).

Toutes ces découvertes cruciales cherchant à élucider et à définir l'étiologie de la FSHD étaient accompagnées de découvertes et d'observations rendant la définition génétique de cette myopathie plus complexe. En effet, dans environ 5% des patients FSHD, aucun réarrangement chromosomique touchant le nombre de répétitions de D4Z4 n'était présent sur le chromosome 4 (Wijmenga et al. 1991; Bakker et al. 1995). Les individus faisant donc partie de cette catégorie n'ayant pas de délétions D4Z4 étaient alors identifiés comme étant des patients « FSHD phénotypiques » ou encore patients FSHD2 (Gilbert et al. 1993). La FSHD liée au réarrangement chromosomique en 4q35 et représentant les 95% des cas FSHD est nommée quant à elle FSHD1, qui fait l'objet de ce travail.

D'autre part, le locus 10q26 comprenait des répétitions d'une séquence D4Z4 présentant plus de 98% d'homologie avec celle en 4q35 (Bakker et al. 1995; Deidda et al. 1995; Cacurri et al. 1998). Cette forte homologie de séquence est responsable d'échanges inter-chromosomiques entre ces deux

loci subtélomériques créant ainsi une séquence de répétitions « hybride » sur le chromosome 4 (Lemmers et al. 1998). Ces échanges subtélomériques 4q35-10q26 sont présents dans près de 20% de la population (van Deutekom et al. 1996), et environ 10% des individus sains ont des fragments de 10q26 de taille inférieure à 38 kb. Cette observation prouve ainsi que des délétions de répétitions D4Z4 en 10q26, similaires à celles observées sur 4q35 des patients FSHD, ne causent pas cette maladie. La FSHD est donc uniquement liée aux délétions de répétitions D4Z4 spécifiques du locus 4q35, qu'elles soient originaires du locus 4q35 ou du locus 10q26 (van Deutekom et al. 1996). Ces données pointent à nouveau l'importance de découvrir le rôle exact des répétitions de la séquence D4Z4 dans l'étiologie de la FSHD. Pour cela, une autre découverte vint appuyer cela ; il a été en effet démontré qu'au moins une copie D4Z4 est nécessaire pour causer la FSHD puisque les individus portant sur 4q35 une délétion couvrant toutes les répétitions D4Z4 ne manifestent aucun signe lié à la FSHD (Tupler et al. 1996). Cette observation a dirigé la lumière sur le contenu de D4Z4 et plusieurs études ont cherché alors à identifier son rôle potentiel dans la FSHD.

Le séquençage de la région D4Z4 a révélé la présence d'un cadre de lecture ouvert (ORF) dépourvu d'introns et comprenant deux boites homéotiques (Hewitt et al. 1994). Il a été ensuite démontré que cet ORF est fonctionnel et le gène ainsi caractérisé et à deux boites homéotiques a été nommé *DUX4* (Double homeobox 4) (Gabriels et al. 1999). Plus tard, plusieurs travaux ont mis en évidence la présence d'autres éléments fonctionnels dans chaque répétition D4Z4 ; en effet, sont retrouvés consécutivement un « enhancer » (Petrov et al. 2008) comprenant des sites de liaison de KLF15 (Dmitriev, Petrov, Ansseau, Charron, et al. 2011), un insulateur comprenant des sites de liaison de CTCF (Ottaviani et al. 2009), un promoteur (Gabriels et al. 1999), un élément de liaison de D4Z4 (DBE : D4Z4 Binding Element) ayant les sites de liaison de la nucléoline, de HMGB2 et de YY1 (Gabellini et al. 2002) et le cadre de lecture de *DUX4* (Gabriels et al. 1999) **(Figure 2C)**.

Longtemps considérées comme de l'ADN « poubelle » les séquences répétées du génome ont fait l'objet de beaucoup d'études lors des 20 dernières années et s'avèrent jouer un rôle majeur dans la régulation de l'expression génique à différents niveaux (Faulkner et al. 2009; Shen et al. 2011), et leur instabilité peut être associée à des maladies (Bruce et al. 2009; Tremblay et al. 2010) comme c'est le cas de D4Z4 dans l'étiologie de la FSHD.

1.3.3 Les polymorphismes génétiques permissifs pour la FSHD

Quelques années plus tard, la caractérisation génomique détaillée de l'ensemble de la région 4q35 a permis d'identifier différents variants alléliques, des cotés distal et proximal de D4Z4, définissant des conditions permissives ou non-permissives pour cette maladie. Deux variants alléliques du côté distal de D4Z4 à fréquences égales dans la population ont été identifiés, désignés par 4qA et 4qB, qui diffèrent par la présence d'une séquence pLAM comprenant une séquence de polyadénylation, suivie de répétitions de type ß-satellites de 6.2 kb sur 4qA uniquement (van Geel et al. 2002; Lemmers et al. 2002) et plus tard un troisième variant rare 4qC a été décrit (R. J. L. F. Lemmers et al. 2010). Cependant, seule la délétion des répétitions D4Z4 uniquement sur l'allèle 4qA est responsable de la FSHD (Lemmers et al. 2002; Lemmers et al. 2004). En effet la séquence pLAM suivant la dernière unité D4Z4 comprend une séquence de polyadénylation ATTAAA et pourra alors stabiliser les ARNm de *DUX4*, gène majeur dans la FSHD décrit dans la partie 1.1.4.7 (R. J. Lemmers et al. 2010). On désigna ainsi 4qA comme étant un élément en *cis* nécessaire pour constituer une condition permissive pour la FSHD (Lemmers et al. 2002; Lemmers et al. 2004). Plus tard, des variations de séquences de « type polymorphisme d'un seul nucléotide » (SNP, single-nucleotide polymorphism) au niveau de la séquence SSLP (Simple Sequence Length Polymorphism) présente à 3,5 kb du côté proximal de D4Z4 furent identifiées, définissant ainsi plusieurs haplotypes dont seulement trois sont permissifs à la FSHD en présence des contractions D4Z4 : 4qA161, 4qA159 et 4qA168 (R. J. Lemmers et al. 2010) **(Figure 2D)**.

Pour résumer, la FSHD résulte de la combinaison de trois évènements ayant lieu sur le locus 4q35 ; la réduction du nombre de répétitions D4Z4 au-dessous du seuil de 10 unités, et la coexistence du variant allélique distal 4qA avec l'un des trois polymorphismes proximaux permissifs à la FSHD 4qA161/159/168.

1.4 Les gènes du locus FSHD

L'association de la région 4q35 à la FSHD a poussé les chercheurs à chercher un (des) gène(s) potentiel(s) présent(s) dans D4Z4 ou à proximité. C'est ainsi que plusieurs gènes en *cis* ont été découverts, et plus tard l'implication de gènes en *trans* dans la FSHD a été aussi décrite.

1.4.1 DUX4c

Situé à 42 Kb des répétitions D4Z4 du côté centromérique et juste à proximité du gène *FRG2* décrit en section 1.1.4.3, *DUX4c* provient d'une répétition D4Z4 tronquée et inversée contenant un ORF qui fut alors nommé *DUX4c* (c pour centromérique). Les protéines DUX4c et DUX4 sont identiques du N-terminal aux homéodomaines, divergent du côté C-terminal (Wright et al. 1993), domaine responsable de la fonction d'activation transcriptionnelle de DUX4 (Kawamura-Saito et al. 2006) qui s'avère être tronqué dans DUX4c. L'expression de *DUX4c* endogène est détectée dans les myoblastes d'individus sains, et est trouvé surexprimé chez ceux des patients FSHD. Sa surexpression est accompagnée de la surexpression du régulateur myogénique Myf5 (Ansseau et al. 2009), un inhibiteur de la différenciation des myoblastes (Kitzmann et al. 1998). L'expression forcée de *DUX4c* favorise la prolifération des myoblastes et dérégule leur différenciation myogénique *in vitro* (Ansseau et al. 2009; Bosnakovski, Lamb, et al. 2008). Une étude récente a mis en évidence l'interaction de DUX4c avec plusieurs partenaires protéiques, notamment la desmine, protéine du filament intermédiaire qui participe à la régulation de la structure du sarcomère (Sequeira et al. 2014), et plusieurs protéines de liaison à l'ARN impliquées dans l'épissage et la traduction des ARNm durant la myogenèse (Ansseau et al. 2016).

Ces données suggèrent que *DUX4c* peut interférer dans l'homéostasie et la régénération du muscle et dans l'organisation du cytosquelette. Des délétions dans la région proximale de D4Z4 incluant le gène *DUX4c* ont été identifiées chez des patients FSHD (Lemmers et al. 2003), suggérant que ce gène n'est pas directement responsable de la FSHD. Cependant, le niveau d'expression de *DUX4c*, pouvant provenir du deuxième chromosome 4, n'a jamais été étudié chez ces patients ; cela ne permet donc pas d'exclure l'implication de *DUX4c* dans la FSHD.

1.4.2 FRG1

Portant le nom de la FSHD, *FRG1* (FSHD Region Gene 1) fut le premier gène identifié en 4q35. Situé approximativement à 120 kb des répétitions D4Z4 du côté centromérique, *FRG1* s'exprime dans tous les tissus humains testés, notamment les muscles, le cerveau et les lymphocytes (Van Deutekom et al. 1996). FRG1 endogène localise au niveau du splicéosome, un complexe macromoléculaire responsable de l'épissage des ARNm (Rappsilber et al. 2003). Lorsque FRG1 est ectopiquement surexprimé la protéine se localise au niveau des nucléoles, lieu de la synthèse nucléaire des ARNr (ARN ribosomaux), ainsi que dans les corps de Cajal dans lesquels sont stockés les facteurs de transcription et des facteurs d'épissage des ARN (van Koningsbruggen 2004). FRG1 semble être nécessaire pour le développement normal de la musculature et du système vasculaire (Gabellini et al. 2006; Liu et al. 2010). Ces données suggèrent l'implication de FRG1 dans les mécanismes de régulation post-transcriptionnelle mais ses fonctions normales et pathologiques restent peu décrites.

L'expression de *FRG1* dans la FSHD est controversée ; certaines études ont montré une surexpression de *FRG1* dans les échantillons FSHD (Gabellini et al. 2002; Bodega et al. 2009), résultats contredits par d'autres équipes (Van Deutekom et al. 1996; Jiang et al. 2003; Manjusha Dixit et al. 2007; Osborne et al. 2007). Le promoteur de *FRG1* comprend des sites de liaison à *DUX4* ; ce dernier est en effet capable de s'y lier et d'activer la transcription de *FRG1* (Ferri et al. 2015).

Afin d'étudier le rôle de *FRG1* dans la FSHD, une souris transgénique le surexprimant a été générée par l'équipe de R. Tupler. Cette souris présentait des atteintes musculaires, des altérations de l'épissage des ARNm et FRG1 localisait au niveau du splicéosome (Gabellini et al. 2006) (**Tableau 2**). D'autres modèles animaux surexprimant *FRG1* (*Xenopus laevis, C.elegans* et *Drosophila melanogaster*) développés plus tard présentaient aussi des altérations musculaires (Hanel et al. 2009; Liu et al. 2010; Jones et al. 2016), et dans le modèle *Xenopus laevis* la surexpression de la protéine FRG1 altérait le phénotype vasculaire (Wuebbles et al. 2010), caractéristique retrouvée également dans une majorité des patients FSHD qui développe une vasculopathie rétinienne. Bien que FRG1 récapitule deux caractéristiques proéminentes de la FSHD, sa surexpression controversée dans les cellules FSHD et la distribution de l'atteinte musculaire dans les animaux transgéniques non

caractéristique de la FSHD, font de lui un facteur influençant le phénotype FSHD sans pour autant être causal de cette myopathie.

1.4.3 FRG2

FRG2 (FSHD Region Gene 2) est un gène situé à 37 kb des répétitions D4Z4, dont les fonctions normale et pathologique restent encore peu définies. L'expression de *FRG2* a été montrée comme plus élevée dans les muscles FSHD (Gabellini et al. 2002; Klooster et al. 2009). Une autre étude a mis en évidence l'expression de *FRG2* uniquement durant la différenciation myogénique des myoblastes FSHD *in vitro*, contrairement aux myoblastes en différenciation issus d'individus sains dans lesquels FRG2 reste indétectable (Rijkers et al. 2004). Ceci peut être expliqué par la capacité de DUX4 à activer le promoteur de *FRG2* favorisant ainsi sa transcription dans les cellules FSHD (Thijssen et al. 2014). De même que pour FRG1, la surexpression de *FRG2* dans la FSHD reste controversée (Masny et al. 2010). Des expériences de conversion des fibroblastes en myoblastes par l'expression forcée de MyoD *in vitro* sont accompagnées d'une surexpression de *FRG2*, suggérant un rôle potentiel de ce gène dans des processus myogéniques (Rijkers et al. 2004). Cependant, des délétions de D4Z4 s'étendant dans la région proximale et incluant le gène *FRG2* ont été décrites chez certains patients FSHD (Lemmers et al. 2003; Deak et al. 2007). Cela suggère que ce gène n'est pas directement responsable de la FSHD mais pourrait potentiellement participer dans le mécanisme pathologique.

1.4.4 TUBB4Q

Le gène *TUBB4Q*, situé à 80 Kb des répétitions D4Z4, appartient à la famille des ß-tubulines. Il est considéré comme étant pseudogène car aucun transcrit n'a été détecté (Masny et al. 2010) et plusieurs de ses gènes homologues sont des pseudogènes (van Geel et al. 2000). De même que pour *FRG2*, *TUBB4Q* peut être inclus chez certains patients FSHD dans la délétion étendue à la région proximale de D4Z4 (Deak et al. 2007). Ce gène ne constitue pas un gène causal de la FSHD.

1.4.5 ANT1

Le gène *ANT1* (Adenine Nucleotide Translocator 1) se situe à 5 Mb des répétitions D4Z4 et code pour une composante majeure de la membrane interne de la mitochondrie, le translocateur ADP/ATP, qui catalyse l'échange de l'ATP produit par la chaine respiratoire et l'ADP cytosolique. Trois isoformes d'*ANT* (1 à 3) existent chez l'homme et leur expression est tissu-spécifique. *ANT1* s'exprime uniquement dans le muscle squelettique et le cœur, et son expression est induite pendant la différenciation myogénique (Doerner et al. 1997). Bien que des mutations du gène *ANT1* soient associées à des myopathies mitochondriales (Kaukonen et al. 2000; Flierl et al. 2005), les études sur l'expression d'*ANT1* dans la FSHD ont donné des résultats contradictoires (Laoudj-Chenivesse et al. 2005; Gabellini et al. 2002; Jiang et al. 2003; Manjusha Dixit et al. 2007; Winokur, Chen, et al. 2003). Ces données non conclusives quant à l'implication d'ANT1 dans la FSHD n'excluent cependant pas la dérégulation possible des mitochondries des cellules musculaires FSHD (Turki et al. 2012).

1.4.6 FAT1

L'implication du gène FAT1 (FAT Atypical Cadherin 1) dans la pathophysiologie de la FSHD fut suggérée pour la première fois en 2013 par l'équipe de F. Helmbacher (Caruso et al. 2013). En effet, FAT1 se situe sur le chromosome 4 à 3,6 Mb du locus 4q35, et code pour une protocadhérine de la famille des protéines FAT impliquées dans la polarité cellulaire, l'adhésion cellulaire, la croissance et l'organisation tissulaire durant le développement embryonnaire (Tanoue & Takeichi 2005; Sopko & McNeill 2009). FAT1 s'exprime normalement dans les muscles en développement (Smith et al. 2007). Cette étude a montré que FAT1 contrôlait la polarité des myoblastes en migration et la forme des muscles durant le développement embryonnaire, et plus précisément ceux de la face et des épaules. Une diminution de l'expression de FAT1 provoquait dans un modèle murin une morphologie anormale des muscles faciaux et de plusieurs muscles de la région scapulo-humérale, similaire aux premiers signes cliniques caractéristiques de la FSHD, qui était accompagnée d'une fonte musculaire précoce au stade adulte. D'une façon intéressante, FAT1 est trouvé sous-exprimé spécifiquement dans plusieurs biopsies musculaires de fœtus humains atteints de la FSHD et était associé à des modifications épigénétiques de type répression de la chromatine au niveau de son locus (Caruso et al.

2013). De plus, cette étude a révélé différents SNP (Single Nucleotide Polymorphism) au niveau d'un potentiel site d'activation transcriptionnelle (enhancer) au sein du locus FAT1 chez des patients FSHD1.

Plus récemment, une étude a dévoilé la présence de plusieurs variants de FAT1 issus d'épissage alternatif chez des patients ayant des symptômes caractéristiques de la FSHD mais ne portant ni une contraction de la région D4Z4, ni une hypométhylation du 4q (patients à phénotype « facioscapulohumeral dystrophy-like ») (Puppo et al. 2015).

Enfin, l'équipe de J. Dumonceaux a révélé au niveau des fœtus humains une expression plus faible de FAT1 dans les muscles habituellement affectés précocement dans la FSHD, ainsi qu'une diminution d'expression de FAT1 dans les muscles de patients FSHD de type 1 et 2 par rapport aux individus sains (Mariot et al. 2015). Ces découvertes proposent une implication de la dérégulation de l'expression de FAT1 dans les tissus musculaires dans la pathophysiologie de la FSHD et suggèrent un lien entre le niveau d'expression de FAT1 et l'apparition précoce ou tardive de l'atteinte musculaire.

1.4.7 DUX4

Suite à la découverte du cadre de lecture de *DUX4* dans chaque unité D4Z4 sur 4q35, la possibilité que ce gène soit fonctionnel était écartée ; Dépourvu d'introns et d'un signal de polyadénylation, *DUX4* etait considéré comme étant un pseudogène (Hewitt et al. 1994) et D4Z4 comme étant de l'ADN « poubelle » (pour revue (Dmitriev et al. 2009)). Ce n'est que quelques années plus tard que l'expression de *DUX4* a été validée dans les échantillons FSHD et ce « gène de la FSHD » attira alors l'attention des chercheurs.

Origine et caractérisation de *DUX4*

DUX4 appartient à la famille des protéines DUX, protéines à deux homéodomaines codées par des séquences répétées de 3,3 Kb homologues à D4Z4 dispersées dans le génome, notamment au niveau des bras courts de tous les chromosomes acrocentriques (Lyle et al. 1995; Ding et al. 1998). La spécificité des protéines à homéodomaines dérive de la capacité de l'homéodomaine à reconnaitre et à interagir d'une façon spécifique avec la séquence d'ADN cible (Gehring et al. 1994). D'une façon

générale, les protéines à homéodomaines sont des facteurs de transcription régulant l'expression de leurs gènes cibles selon un mode spatio-temporel bien déterminé (pour revue (Gehring et al. 1994)). Les protéines DUX sont en effet des facteurs de transcription nucléaires (pourvu d'un signal de localisation nucléaire NLS). Contrairement à d'autres protéines de cette famille, la séquence de DUX4 est dépourvue d'introns et s'avère provenir de la rétrotransposition de l'ARNm de *DUXC*, gène présent chez les mammifères et qui a été perdu chez les primates durant l'évolution (Clapp et al. 2007).

La protéine DUX4 s'exprime chez l'Homme durant le développement embryonnaire, son expression est maintenue uniquement dans les cellules germinales des testicules ainsi que dans les cellules souches pluripotentes et se trouve réprimée dans les cellules somatiques (Snider et al. 2010). Les deux homéodomaines de DUX4, H1 et H2, ont un niveau de similarité élevé avec les domaines « paired » (prd) et « orthodenticle » (otx) trouvés respectivement dans les familles des protéines Pax, impliquées dans le développement des muscles squelettiques (Buckingham & Relaix 2007), et les protéines Otx impliquées dans le développement du système nerveux (Finkelstein et al. 1990). La fonction normale de DUX4 durant le développement embryonnaire et la raison pour laquelle son expression est maintenue dans les cellules germinales des testicules restent jusqu'à présent très peu connues, cependant la détection de DUX4 dans les échantillons de patients FSHD fut le premier pas vers le début de la caractérisation fonctionnelle de ce gène.

Expression génique de *DUX4* dans la FSHD

Plusieurs études ont pu démontrer la transcription à partir du ORF de *DUX4* et la production d'une protéine fonctionnelle de 424 acides aminés (Gabriels et al. 1999; Clapp et al. 2007; Kowaljow et al. 2007; M Dixit et al. 2007). De plus, plusieurs travaux ont mis en évidence la présence de l'ARNm et/ou de la protéine DUX4 dans les myoblastes primaires (Kowaljow et al. 2007; M Dixit et al. 2007; Snider et al. 2010), les myotubes (R. J. Lemmers et al. 2010) et les biopsies (Snider et al. 2010) de patients FSHD, indétectables dans les échantillons des individus sains. Par la suite l'équipe de S. Tapscott a démontré une transcription bidirectionnelle de D4Z4 produisant plusieurs transcrits DUX4 sens et anti-sens (Snider et al. 2009). Deux transcrits sens de *DUX4* issus d'un épissage

alternatif ont été par la suite caractérisés (Snider et al. 2010). Le premier transcrit sens a été nommé *DUX4-fl* (full length), il comprend la totalité du cadre de lecture et est détecté uniquement dans les biopsies et les myoblastes des patients FSHD. Le deuxième transcrit court *DUX4-s* (short) peut être trouvé dans les muscles des individus sains et est dépourvu de l'extrémité C-terminale car il provient d'un site donneur d'épissage alternatif (Snider et al. 2010). Le choix de ce site d'épissage alternatif a été corrélé à l'état répressif de la chromatine de cette région.

DUX4-fl, dont la toxicité est attribuée à son extrémité C-terminale, s'exprime dans 0,1% seulement des noyaux des muscles FSHD (Snider et al. 2010). L'ARNm *DUX4* (long et court) détecté dans les cellules provient uniquement de la transcription de la dernière unité D4Z4 et est stabilisé grâce au signal de polyadénylation ATTAAA présent uniquement sur l'haplotype 4qA permissif (M Dixit et al. 2007; Snider et al. 2009; R. J. Lemmers et al. 2010). Ceci explique l'absence de signaux de polyadénylation dans les répétitions D4Z4 et prouve que la protéine DUX4 provient seulement du gène de l'unité D4Z4 la plus distale, même si *DUX4* est transcrit à partir de toutes les répétitions D4Z4.

Une étude intéressante a montré que le raccourcissement des télomères dans des myoblastes provenant de patients FSHD provoquait une expression plus importante de *DUX4*, mécanisme qui pourrait jouer un rôle dans la sévérité progressive de la maladie (Stadler et al. 2013).

Effets pathologiques liés à l'expression de *DUX4* dans la FSHD

La protéine DUX4 est une protéine nucléaire de 52 kD dont l'ORF est conservé depuis plus de 100 millions d'années, suggérant fortement un rôle physiologique important qui reste à être élucider (Clapp et al. 2007). Son extrémité C-terminale lui confère une forte activité de facteur de transcription, observée notamment dans les cellules tumorales du sarcome Ewing-like dans lesquelles la translocation chromosomique t(4 ;19)(q35 ;q13) produit une protéine de fusion CIC-DUX4 (Kawamura-Saito et al. 2006).

Suite à des expériences de mutagenèses dirigées, la toxicité de DUX4 s'avère provenir de ses deux homéodomaines ainsi que de son extrémité C-terminale (Corona et al. 2013).

Il a été démontré que *DUX4* s'exprime très faiblement dans les muscles FSHD, et ce niveau faible de la protéine DUX4 correspondait à une production abondante de DUX4 dans seulement 1/1000 des myoblastes FSHD (Snider et al. 2010) et 1/200 des myotubes FSHD (Tassin et al. 2013). Cependant ce faible niveau d'expression semble être suffisant pour causer des changements cellulaires et déréguler l'expression des gènes cibles. Ceci est probablement dû à la capacité des protéines exprimées dans un noyau à diffuser vers les noyaux adjacents dans les myotubes multinucléés (Ralston & Hall 1989). Effectivement il a été démontré que les protéines DUX4 migraient vers les noyaux à proximité (Tassin et al. 2013; Ferreboeuf, Mariot, Furling, et al. 2014). *DUX4* s'exprime dans les muscles de fœtus FSHD, démontrant que ce marqueur moléculaire de la FSHD s'exprime déjà durant le développement embryonnaire (Ferreboeuf, Mariot, Bessières, et al. 2014).

Les effets pathologiques qui découlent de l'expression inappropriée de *DUX4*, tant aux niveaux transcriptomique et protéomique qu'au niveau fonctionnel, ont été décrits durant ces dernières années **(Figure 3)**. Le profil d'expression des muscles FSHD s'avèrent comporter une portion significative de gènes trouvés aussi dérégulés dans les myoblastes contrôles transduits par *DUX4* (F Rahimov et al. 2012).

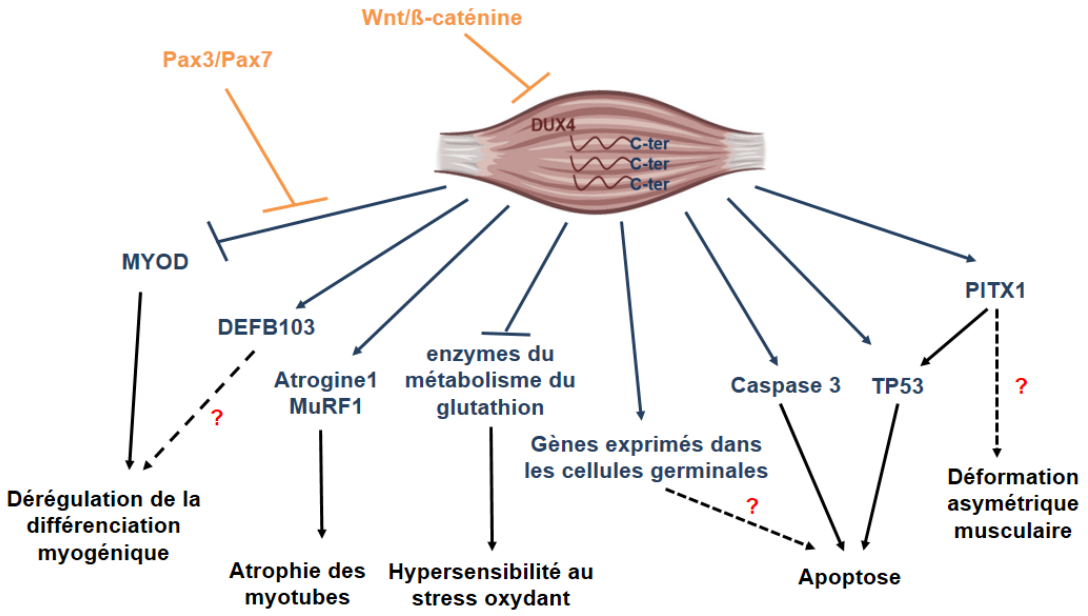


Figure 3. Effets cellulaires pathologiques liés à la surexpression de *DUX4*. Les flèches discontinues indiquent les hypothèses non encore validées.

DUX4 a été décrit comme étant un activateur transcriptionnel de *PITX1* (M Dixit et al. 2007), un membre de la famille des facteurs de transcription à homéodomaine (Paired-like homeodomain transcription factor 1) localisé sur 5q31 et qui est impliqué notamment dans la segmentation de l'embryon et le développement des membres postérieurs (Szeto et al. 1999). En effet il a été montré que la dérégulation de l'expression de *PITX1* peut provoquer une déformation asymétrique gauche-droite des membres postérieurs (Marcil 2003). Cependant, l'activation de l'expression de *PITX1* par l'interaction de DUX4 avec son promoteur fut récemment contredite (Zhang et al. 2015). Toutefois, *PITX1* a été trouvé surexprimé dans les biospies et les myotubes FSHD (M Dixit et al. 2007; Tassin et al. 2013).

D'autre part, l'expression forcée de *DUX4* provoque la mort cellulaire par apoptose via l'activation de la caspase-3 (Kowaljow et al. 2007) et par un mécanisme dépendant de p53 (Wallace et al. 2011). Ces données corrèlent la présence de protéines pro-apoptotiques telles que la caspase-3 dans les muscles de certains patients FSHD (Sandri et al. 2001; Laoudj-Chenivesse et al. 2005). Cependant le mécanisme moléculaire spécifique menant à l'apoptose reste à être défini.

La surexpression de *DUX4* dans des myoblastes primaires humains est accompagnée de l'activation de l'expression de gènes exprimés dans les cellules souches ainsi que les gènes impliqués dans la spermatogenèse et normalement trouvés exprimés dans les cellules germinales (Geng et al. 2012). L'expression inappropriée de ces gènes a été détectée dans les muscles FSHD et pourrait être incompatible avec l'état post-mitotique des cellules musculaires squelettiques. Ceci peut probablement contribuer au dysfonctionnement musculaire observé dans la FSHD et induire même l'apoptose.

Des gènes impliqués dans les voies des réponses immunitaires sont trouvés dérégulés dans les cellules musculaires surexprimant *DUX4*, notamment *DEFB103*, une défensine humaine pouvant inhiber la réponse immunitaire innée (Semple et al. 2010; Semple et al. 2011), est fortement exprimée (Geng et al. 2012). De plus, DEFB103 est un ligand antagoniste au récepteur de CXCR4 (Feng et al. 2006), ce dernier étant nécessaire pour la différenciation myogénique. Ainsi DEFB103 pourrait inhiber la différenciation myogénique (Geng et al. 2012).

Par ailleurs, la surexpression de *DUX4* est accompagnée d'une sous-expression de *MyoD* et d'autres régulateurs myogéniques, une légère surexpression de *Myf5*, et une sous-expression des enzymes impliquées dans le métabolisme du glutathion (Bosnakovski, Xu, et al. 2008). DUX4 semble ainsi déréguler les processus de la myogenèse et de la réponse cellulaire au stress oxydant. Ces observations sont en concordance avec les données transcriptomiques et protéomiques (Winokur, Chen, et al. 2003; Celegato et al. 2006) obtenues à partir des biopsies de patients FSHD et qui ont révélé une dérégulation de l'expression des gènes de réponse au stress oxydant et une sous-expression de *MyoD* et plusieurs de ses gènes cibles.

Afin de donner un sens fonctionnel à ces données, la sensibilité au stress oxydant et la différenciation myogénique des myoblastes surexprimant *DUX4* ont été évaluées. Effectivement ces cellules étaient très sensibles au stress oxydant induit par le Paraquat, composant induisant spécifiquement un stress oxydant (Bosnakovski, Xu, et al. 2008). La surexpression de *DUX4* étaient accompagnée de l'activation de l'Atrogine1 et de MuRF1, deux gènes impliqués dans l'atrophie musculaire, et les myotubes qui en résultaient étaient atrophiques (Vanderplanck et al. 2011) et rarement multinucléés (Bosnakovski, Xu, et al. 2008). Les myoblastes FSHD étaient plus sensibles au stress oxydant que ceux provenant d'individus sains (Winokur, Barrett, et al. 2003; Barro et al. 2010; Bou Saada et al. 2016), et produisent des myotubes à phénotype aberrant (Barro et al. 2010; Dib et al. 2015). Ainsi la surexpression de *DUX4* dans les cellules musculaires récapitule des caractéristiques phénotypiques retrouvées *in vitro* dans celles issues de patients FSHD.

Aucun modèle animal surexprimant *DUX4* n'a pu être généré jusqu'à présent dû aux conséquences dramatiques liées à la surexpression de ce gène. Cependant, plusieurs voies de signalisation semblent inhiber l'expression de *DUX4* ou bien compenser l'effet pathologique de ce gène *in vitro*. En effet, Block *et coll.* ont démontré que l'activation de la voie de signalisation Wnt/ß-caténine dans les myotubes FSHD est accompagnée de la répression transcriptionnelle de *DUX4* empêchant ainsi l'apoptose médiée par ce facteur de transcription, et inversement l'inhibition de l'expression des gènes de cette voie de signalisation résulte par l'activation de *DUX4* (Block et al. 2013). Cette relation directe qui existe entre la voie *Wnt* et *DUX4* n'est pas surprenante car la signalisation de Wnt/ß-caténine est montrée comme impliquée dans le développement musculaire

(Polesskaya et al. 2003) (pour revue (Cossu & Borello 1999), ainsi que dans la réparation musculaire postnatale en facilitant la différenciation des myoblastes et la fusion des myotubes (Velden et al. 2006). D'autre part, la surexpression de *Pax3* ou *Pax7* dans les myoblastes surexprimant *DUX4* a pu compenser la toxicité et éviter l'apoptose liée à l'expression de *DUX4*, et la levée de l'inhibition de *MyoD* (Bosnakovski, Xu, et al. 2008).

1.5 Les gènes en *trans* impliqués dans la FSHD

Au-delà des gènes en *cis* situés dans le locus FSHD, des gènes localisés sur d'autres chromosomes sont trouvés surexprimés et/ou capables d'influencer sur l'expression des gènes en 4q35.

Un premier exemple est le facteur de transcription *KLF15* (Krüppel-like Factor 15) trouvé surexprimé dans les myoblastes, les myotubes et les biopsies de patients FSHD. Il est capable d'interagir directement avec l'« enhancer » présent en D4Z4 et augmenter son activité, provoquant ainsi une surexpression de *FRG2* et *DUX4c* (Dmitriev, Petrov, Ansseau, Stankevicins, et al. 2011).

D'autre part, la découverte récente de mutations affectant le gène *SMCHD1* (Structural Maintenance of Chromosomes flexible Hinge Domain containing 1) trouvée chez les patients FSHD2 (n'ayant pas de délétions D4Z4) portant un haplotype permissif pour la maladie a permis d'identifier pour la première fois une cause génétique déterminante de la FSHD2 (Lemmers et al. 2012). En effet *SMCHD1*, situé sur le chromosome 18, appartient à la famille des gènes *SMC* impliqués dans l'organisation et la dynamique des chromosomes ainsi que dans la régulation de la répression de la chromatine dans plusieurs organismes. *SMCHD1* est notamment nécessaire pour l'hyperméthylation d'ilots CpG sur le chromosome X afin de maintenir son inactivation (Blewitt et al. 2008; Gendrel et al. 2013). De la même façon, ce répresseur chromatinien interagit directement avec D4Z4 et maintient son état hyperméthylé, tandis qu'en son absence, la région D4Z4 est hypométhylée provoquant ainsi l'expression inappropriée de *DUX4* chez les patients FSHD2 (Lemmers et al. 2012). D'une façon intéressante, une étude menée sur des patients FSHD1 portant 8-10 répétitions D4Z4 mais présentant un phénotype sévère a révélé la présence de mutations dans *SMCDH1* (Sacconi et al. 2013; Larsen et

al. 2015). SMCDH1 est donc considéré comme un modificateur chromatinien qui, absent ou muté, peut être un modificateur de la sévérité de la maladie chez les patients FSHD1.

Pris ensemble, ces découvertes successives relèvent la complexité génétique de la FSHD et mettent en évidence l'intervention de plusieurs gènes dans cette maladie. Cependant toutes les données convergent vers l'hypothèse que *DUX4* demeure le gène majeur de la FSHD.

1.6 Epigénétique de la FSHD

Plusieurs facteurs permettent d'associer la région D4Z4 à l'hétérochromatine, notamment l'abondance en ilots CpG de la région D4Z4 (Neguembor & Gabellini 2010), la présence des répétitions habituellement associées à l'hétérochromatine (Hewitt et al. 1994), la proximité de la région 4q35 du télomère (Winokur et al. 1994) et la localisation de 4q35 à la périphérie nucléaire (Masny et al. 2004). Les variabilités des manifestations cliniques entre les patients FSHD, et le fait que la contraction D4Z4 est nécessaire mais reste insuffisante pour provoquer la FSHD, ont poussé les chercheurs à étudier l'implication des facteurs épigénétiques dans la FSHD. De plus, la mise en évidence de l'expression inappropriée de *DUX4* et d'autres gènes présents dans la région 4q35 associée à la FSHD suggère un mécanisme de régulation épigénétique de l'expression génique **(Figure 4)**.

En effet les modifications épigénétiques n'affectent pas la séquence d'ADN mais l'expression des gènes en modifiant la conformation et la structure chromatiniennes. La structure chromatinienne d'une région génomique peut être modulée notamment par le degré de méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones, et par des éléments tels que les insulateurs (pour revue (Wei et al. 2005) et (Fischle et al. 2003)).

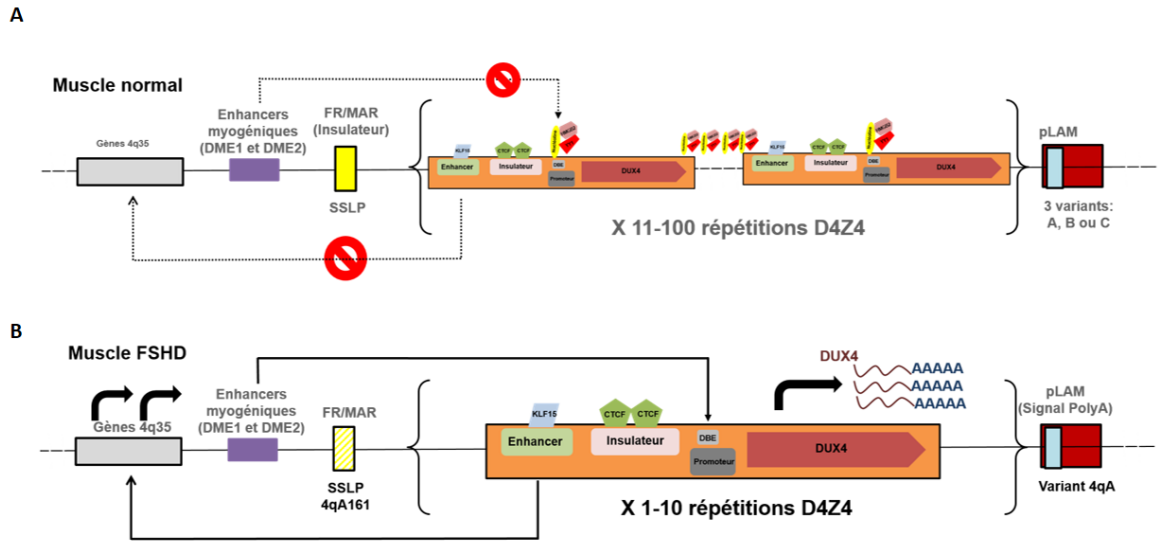


Figure 4. **Evènements épigénétiques dans la FSHD. (A)** Chez les individus sains, un nombre important des complexes multiprotéiques DRC (D4Z4 Recognition Complex) se lient aux unités D4Z4 et participent à la formation de l'hétérochromatine et la répression des gènes du locus 4q35. FR-MAR est associé à la matrice nucléaire et exerce une fonction insulatrice en séparant en deux boucles chromatiniennes les gènes en 4q35 des répétitions D4Z4 comprenant un enhancer. La méthylation du promoteur de *DUX4* empêche l'expression de DUX4 favorisée par les enhancers myogéniques DME1 et DME2 **(B)** Chez les patients FSHD, la contraction de la séquence de répétitions D4Z4 limite le nombre de complexes DRC et est associée à une hypométhylation. FR-MAR perd sa fonction insulatrice et altère la structure tridimensionnelle de la chromatine, plaçant l'enhancer de D4Z4 et les gènes 4q35 au sein d'une même boucle chromatinienne. Les enhancers myogéniques DME1 et DME2 interagissent avec le promoteur hypométhylé de *DUX4* et favorisent son expression. L'ARNm *DUX4* est stabilisé par une queue de polyadénylation fournie par la séquence pLAM du variant A télomérique.

Gabellini *et coll*. ont mis en évidence la liaison d'un complexe multiprotéique DRC (D4Z4 Recognition Complex) au DBE (D4Z4 Binding Element) de chaque unité D4Z4. Ce DRC est un complexe de répression composé de YY1, HMGB2 et la nucléoline, facteurs interagissant avec des protéines impliquées dans la formation de l'hétérochromatine et dans la régulation transcriptionnelle des gènes (Ko et al. 2008; Thomas & Seto 1999; Lehming et al. 1998; Xie et al. 1998). Chez les individus sains, un nombre élevé de DRC est associé aux répétitions D4Z4 exerçant ainsi sa fonction de répression transcriptionnelle et inhibant l'expression des gènes en 4q35 (Gabellini et al. 2002). Par

contre, l'allèle portant spécifiquement la contraction du nombre de répétitions D4Z4 provoquant la FSHD comprend significativement moins de complexes DRC associés aux unités D4Z4 résiduelles, qui ne pourront pas ainsi exercer de manière efficace la répression transcriptionnelle des gènes 4q35. Cette étude a été renforcée par le fait que les répétitions D4Z4 résiduelles chez les patients FSHD sont hypométhylées en comparant par rapport à celles des individus sains (de Greef et al. 2009; van Overveld et al. 2003).

De plus, la triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me3), marqueur de la formation de l'hétérochromatine et la répression génique présente dans les unités D4Z4 chez les individus sains, est perdue dans la FSHD (Zeng et al. 2009). Cela empêche le recrutement au niveau de D4Z4 de la protéine de liaison à l'hétérochromatine, HP1ɣ, impliquée dans la répression transcriptionnelle des gènes, et pourrait être intimement lié aux modifications de la structure chromatinienne de la région 4q35 dans la FSHD (Zeng et al. 2009).

Par ailleurs, Snider *et coll.* ont démontré que les répétitions D4Z4 sont bi-directionnellement transcrites dans les tissus somatiques (cellules musculaires et fibroblastes) d'individus sains et de patients FSHD. Un cluster de petits ARN en amont de *DUX4* génère ainsi des fragments d'ARN ressemblant à des miARN (micro ARN) ou des siARN (small interfering RNA) (Snider et al. 2009). Une étude récente a mis en évidence la participation potentielle de ces petits ARN à la répression épigénétique des D4Z4 en augmentant la H3K9me2 et en recrutant AGO2 (Argonaute 2) qui initie le silencing de *DUX4* via la voie de l'interférence par ARN (Lim et al. 2015).

Au-delà des modifications épigénétiques touchant la région D4Z4, l'organisation tridimensionnelle de la chromatine de la région 4q35 semble être remodelée dans la FSHD. En effet notre équipe a mis en évidence la présence à proximité de D4Z4 d'un site d'attachement à la matrice nucléaire (S/MAR pour Scaffold or Matrix Attachement Region) désigné par FR-MAR (pour FSHD-Related Region S/MAR) (Petrov et al. 2006). Les S/MAR sont des séquences d'ADN de 200 à 1000 pb riches en AT qui permettent l'ancrage de l'ADN à la matrice nucléaire et la formation de boucles d'ADN dans le noyau. Les S/MAR peuvent être situés à proximité d' « enhancers », d'insulateurs ou des gènes transcrits et l'organisation de la chromatine en boucles limitées par les S/MAR est impliquée notamment dans la régulation de la transcription (Vassetzky et al. 2000).

Dans notre laboratoire, il a été démontré que chez les individus sains, FR-MAR est associé à la matrice nucléaire et sépare les répétitions D4Z4 des gènes en 4q35 en deux boucles chromatiniennes distinctes **(Figure 5)**. Dans les myoblastes FSHD, l'association de FR-MAR à la matrice nucléaire est significativement affaiblie, modifiant ainsi l'organisation chromatinienne de la région 4q35 et ne pouvant plus séparer D4Z4 des gènes à proximité. Cette découverte fut complétée deux ans plus tard par l'identification de la présence d'un « enhancer » à l'extrémité 5' de l'unité D4Z4 qui peut activer l'expression des gènes 4q35 lorsqu'ils sont dans la même boucle chromatinienne que D4Z4 dans la FSHD (Petrov et al. 2008; Kisseljova et al. 2014). FR-MAR possède donc une fonction d'insulation dans les cellules normales en séparant physiquement l'enhancer dans D4Z4 des gènes en *cis*.

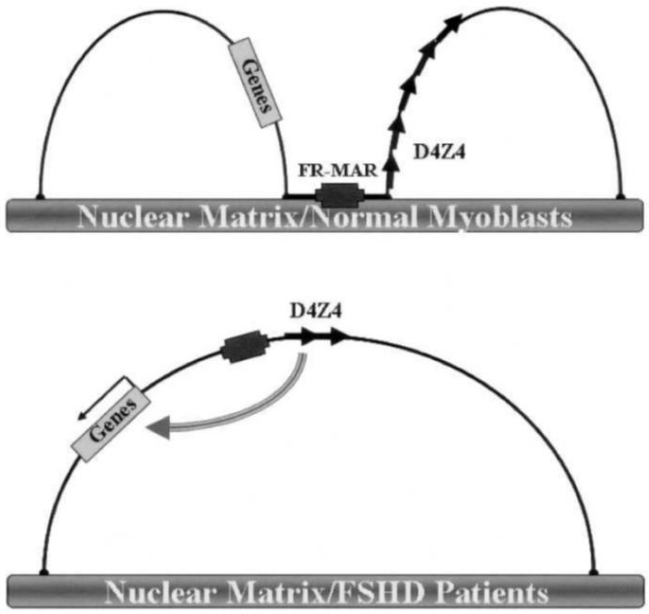


Figure 5. **Organisation des boucles chromatiniennes en 4q35 dans la FSHD.** Chez les individus sains, FR-MAR s'attache à la matrice nucléaire, séparant ainsi la région D4Z4 contenant un « enhancer » des gènes en 4q35 en deux boucles chromatiniennes. Chez les patients FSHD, FR-MAR est affaibli et, ne pouvant pas s'attacher à la matrice nucléaire, regroupe D4Z4 et les gènes 4q35 en une seule boucle chromatinienne. L' « enhancer » en D4Z4 peut alors activer l'expression des gènes à proximité. Figure d'après Petrov et al. *Genome Research*, 2008.

Plus récemment, deux « enhancers » myogéniques DME1 (*DUX4* Myogenic Enhancer 1) et DME2 (*DUX4* Myogenic Enhancer 1) furent identifiés en 4q35, pouvant interagir dans les myocytes FSHD avec le promoteur hypométhylé de *DUX4* et activer l'expression de *DUX4*. Cette interaction

apparait spécifique aux cellules musculaires car elle n'est pas observée dans les fibroblastes FSHD. L'affaiblissement de l'association de FR-MAR à la matrice nucléaire et son incapacité à séparer D4Z4 du reste de la région 4q35 peut être la cause principale de l'activation de l'expression de *DUX4* par ces deux « enhancers » myogéniques, mais cette hypothèse reste à être validée.

En conclusion, l'étiologie de la FSHD parait assez complexe, relevant à la fois de la génétique et de l'épigénétique. Le modèle unifié de la FSHD1 actuellement adopté peut être résumé ainsi : le changement pathologique de la conformation chromatinienne en 4q35 intimement lié à la contraction D4Z4 sur des haplotypes permissifs induit l'expression inappropriée de plusieurs gènes impliqués dans la FSHD, dont le plus important est DUX4.

1.7 Les principales voies de signalisation dérégulées dans la FSHD

Malgré les grandes différences dans les listes des gènes différentiellemetnt exprimés obtenues dans les nombreuses études omiques à grande échelle dans la FSHD, les études de transcriptomes, protéomes et microRNômes ont dévoilé, de manière générale et récurrente, une dérégulation de plusieurs voies de signalisation principales qui peuvent participer à la pathophysiologie de la maladie.

Une voie de signalisation majeure se trouvant dérégulée dans la FSHD est celle de la différenciation myogénique ; elle a été révélée par plusieurs études transcriptomiques et protéomiques (Winokur, Chen, et al. 2003; Tsumagari et al. 2011; Cheli et al. 2011; Bakay et al. 2006) ainsi que par des études de microRNômes (Dmitriev et al. 2013; Colangelo et al. 2014; Portilho et al. 2015). A cette voie principale s'ajoutent les voies de l'adhésion cellulaire et de l'organisation du cytosquelette (Tsumagari et al. 2011; Tassin et al. 2012; Dib et al. 2016). D'une façon intéressante, la surexpression de *DUX4* dans des cellules musculaires semble déréguler l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le processus de la myogenèse (Bosnakovski, Xu, et al. 2008; Geng et al. 2012).

Par ailleurs, la voie de la réponse cellulaire au stress oxydant et la détoxification des ROS constitue la deuxième voie principalement dérégulée dans la FSHD et englobe des gènes clés tels que la Superoxyde dismutase (SOD), la Glutathion peroxydase (GPX), la Glutathion S-transférase (GST) ainsi que des gènes impliqués dans le métabolisme mitochondrial (Winokur, Chen, et al. 2003; Laoudj-Chenivesse et al. 2005; Osborne et al. 2007; Cheli et al. 2011; Tsumagari et al. 2011). Cette

voie de signalisation trouvée dérégulée suggère que les cellules FSHD sont exposées à un stress oxydant endogène. De même, l'expression forcée de *DUX4* dans des lignées cellulaires humaines ou murines était accompagnée d'une altération de l'expression de plusieurs gènes contrôlant l'homéostasie redox cellulaire (Bosnakovski, Xu, et al. 2008; Sharma et al. 2013).

Une troisième voie de signalisation principalement activée dans les cellules FSHD est celle du système immunitaire et de l'inflammation (Winokur, Chen, et al. 2003; Arashiro et al. 2009; Tsumagari et al. 2011; Dib et al. 2016). En concordance avec cela, une étude a montré l'activation de la voie NF-κB (Nuclear Factor κB) dans les muscles FSHD (Macaione et al. 2007), voie décrite comme impliquée dans le mécanisme pro-inflammatoire et dans la régénération musculaire dans des myopathies inflammatoires, la dystrophie musculaire des ceintures et la myopathie de Duchenne (Haslbeck et al. 2005; Monici et al. 2003), et pouvant etre aussi induite par un stress oxydant musculaire (Catani et al. 2004). Notons aussi que la voie de la migration leucocytaire transendothéliale, un processus actif durant l'inflammation, est trouvée dérégulée dans la FSHD (Fedik Rahimov et al. 2012; Dib et al. 2016).

Par ailleurs, une quatrième voie de signalisation qui s'avère etre dérégulée dans la FSHD regroupe des gènes spécifiques aux cellules germinales (F Rahimov et al. 2012; Tasca et al. 2012), et qui se trouve aussi activée dans des myoblastes normaux transfectés par DUX4 (Geng et al. 2012). L'expression inappropriée de ces gènes dans les cellules musculaires squelettiques post-mitotiques des patients FSHD pourrait contribuer au dysfonctionnement muscuclaire, mais des études fonctionnelles supplémentaires sont nécessaires afin de confirmer leur participation exacte dans la FSHD.

Enfin, plusieurs voies de signalisation supplémentaires décrites comme dérégulées dans la FSHD regroupent la voie du transport et de la dégradation des ARN (Dib et al. 2015), la voie de signalisation de VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire) (Dib et al. 2015), la voie de signalisation du calcium (F Rahimov et al. 2012; Dib et al. 2016), la voie des gènes spécifiques aux muscles lisses vasculaires (Osborne et al. 2007) ainsi que de plusieurs gènes gènes impliqués dans le cycle cellulaire (Cheli et al. 2011; Pakula et al. 2013). Des études fonctionnelles basées sur l'ensemble des gènes et des voies de signalisation révélées par ces études sont nécessaires afin de confirmer l'étendue de leur contribution à la pathophysiologie de la FSHD.

1.8 Les modèles animaux proposés pour la FSHD

Dû à la toxicité de DUX4 *in vivo* observée sur les embryons de xénope (Wuebbles et al. 2010) et de poisson zèbre (Mitsuhashi et al. 2013), les tentatives de générer un modèle animal transgénique surexprimant DUX4 se heurtent à la létalité embryonnaire. Cependant, plusieurs équipes ont testé *in vivo* l'effet de DUX4 en générant différents modèles animaux à l'aide d'approches différentes, donnant des résultats différents (**Tableau 1**). Ces modèles miment en partie la FSHD et peuvent être potentiellement utilisés pour tester de nouvelles approches thérapeutiques. Cependant ces modèles animaux ne constituent pas des modèles précliniques sûrs. Il est présumé que *DUX4* participe largement à la FSHD, mais l'absence de lien solide *in vivo* entre l'expression de *DUX4* et l'ensemble des caractéristiques phénotypiques observées chez les patients FSHD suggère l'intervention d'autres voies cellulaires et d'autres mécanismes moléculaires dans cette myopathie qui nécessitent d'être élucidées afin de pouvoir proposer une approche thérapeutique valable pour la FSHD. Il est aussi important de comprendre : i) comment la faible expression de *DUX4* peut autant contribuer au phénotype FSHD, ii) quelle part de la pathophysiologie de la FSHD est attribuée à l'expression inappropriée de DUX4, iii) quel(s) est (sont) le(s) rôle(s) biologique(s) exact(s) de *DUX4* dans les cellules germinales et les cellules somatiques et iv) quel est l'effet biologique lié à l'expression de *DUX4* dans les tissus non-musculaires.

Tableau 1. Les approches *in vivo* de surexpression de *DUX4*.

Modèles animaux surexprimant *DUX4*	**Modification génétique/biologique**	**Apparition des symptômes**	**Symptômes *in vivo* / Caractéristiques *in vitro***	**Avantages**	**Inconvénients**
Souris AAV-DUX4 (Wallace et al. 2011)	Injection intramusculaire (dans le muscle tibial antérieur) de DUX4 délivré à l'aide de vecteurs AAV6, dans des souris âgées de 6 à 8 semaines. Faible dose /forte dose	Une semaine post-injection. Durée de vie non spécifiée.	- Dégénérescence des myofibres - Cellules mononucléées infiltrées - Marquage de la caspase-3 positif - Affaiblissement musculaire à forte dose - Récupération de la fonction musculaire 3 semaines post-injection → régénération musculaire	- Possibilité de la réversibilité de l'endommagement musculaire induit par DUX4 si DUX4 est inhibé	- Expression transitoire et local de DUX4 - Niveau d'expression non physiologique de DUX4
Souris D4Z4-2.5 (Krom et al. 2013)	Introduction transgénique chez la souris de 2.5 unités D4Z4 sur un haplotype permissif d'un locus humain	8 à 12 semaines. Durée de vie non spécifiée.	- Expression dans les testicules et les cellules souches embryonnaires - Expression faible et variable de DUX4, marquée au niveau : des muscles des membres, du tronc, de la tête (muscles typiques FSHD) et tissus non musculaires (yeux, foie et cervelet) - Pas de dégénérescence ni de faiblesse musculaire - Pas d'anormalités histologiques ni morphologiques des muscles - Myoblastes dont certains noyaux sont DUX4 (+) *in vitro*, incapacité à fusionner en myotubes - Hypométhylation généralisée (dans tous les tissus) du locus D4Z4	- Récapitulation réussie du lien entre la génétique et l'épigénétique observé dans la FSHD - Niveau d'expression faible de DUX4, proche de celui observé dans la FSHD	- Modèle non approprié pour des approches thérapeutiques dû à l'absence d'un phénotype de dystrophie musculaire - Contexte génomique au niveau du site d'intégration du transgène différent que celui de la FSHD
Souris D4Z4-12.5 (Krom et al. 2013)	Introduction transgénique chez la souris de 12.5 unités D4Z4 sur un haplotype permissif d'un locus humain	Durée de vie normale	- Expression dans les testicules et les cellules souches embryonnaires - Faible expression uniquement dans le muscle tibial antérieur et les muscles pectoraux - Pas d'expression de DUX4 dans les myoblastes ni les myotubes *in vitro* - Méthylation importante des ilots CpG du locus D4Z4	- Récapitulation réussie du lien entre la génétique et l'épigénétique observé dans la FSHD	

Souris iDUX-2.7 (Dandapat et al. 2014)	Introduction chez la souris d'un transgène inductible (doxycycline) au niveau d'un site euchromatique chromosome X	Anormalités détectées surant l'embryogenèse. Létalité embryonnaire chez la majorité des souris mâles.	Souris mâles : - Expression de *DUX4* dans plusieurs tissus non musculaires (sans doxycycline) - Myoblastes et myotubes ayant des noyaux DUX4 (+) - Les survivants mâles : Taille plus petite Muscles plus petits et faibles Gamétogenèse défectueuse Télangiectasie rétinienne Mort précoce au bout de 2 mois	- Evaluation *in vitro* et *in vivo* des effets de DUX4 - Niveau d'expression faible de DUX4, proche de celui observé dans la FSHD	- Modèle non approprié pour un screening de drogues car la durée de vie est courte - Pas d'expression de DUX4 détectable dans les muscles - Contexte génomique au niveau du site d'intégration du transgène différent que celui de la FSHD
			Souris femelles : - Pas d'expression de DUX4 - Pas de dystrophie musculaire - Inactivation du chromosome X porteur du transgène		- Modèle non représentatif de la FSHD
Souris traitées à la doxycycline et greffées de cellules satellites de iDUX-2.7 (Dandapat et al. 2014)	Transplantation des cellules satellites de souris mâles iDUX-2.7 dans une souris hôte traitée à la doxycycline	Non spécifiés	- Faible capacité des cellules satellites greffées du donneur à produire des cellules musculaires	- Modèle approprié pour le screening de drogues pouvant améliorer la régénération musculaire	- Modèle non représentatif de la FSHD
Poisson zèbre DUX4 (Wallace et al. 2011)	Poisson zèbre transgénique exprimant DUX4 sous le contrôle d'un promoteur spécifique aux muscles (MHCK7)	4 jours post-fertilisation	- Malformations corporelles - Dégénérescence musculaire systémique - Des cas de développement asymétrique des nageoires et hypertrophie cardiaque	- Récapitulation de certains aspects observés dans la FSHD - Utilisation potentielle pour un screening de drogues	- Activation tardive du promoteur (3ème jour post-injection) → limitation de l'étude de l'effet de DUX4 aux stades tardifs du développement embryonnaire - Dégénérescence musculaire systémique contrairement à celle observée chez les patients humains
Poisson zèbre	Poisson zèbre	24 heures	- A de fortes doses injectées : létalité embryonnaire	- Récapitulation	- Dégénérescence musculaire

DUX4 (Mitsuhashi et al. 2013)	surexprimant DUX4 suite à une microinjection de l'ARNm DUX4 au stade d'une cellule	post-injection	dans les 24 heures - A des doses contrôlées (1-2.10^5 copies) : embryons viables malformations corporelles dégénérescence musculaire générale capacité à nager réduite désorganisation de la musculature faciale anormalités asymétriques au niveau des yeux, des oreilles et des nageoires - Injection de l'ARNm de DUX4-s réduit significativement la toxicité induite par DUX4-fl	de certains aspects observés dans la FSHD - Expression de DUX4 ectopique depuis le début de l'embryogenèse - Mise en évidence de l'utilisation de DUX4-s comme approche thérapeutique - Utilisation potentielle pour un screening de drogues	systémique contrairement à celle observée chez les patients humains

D’autre part, d’autres modèles animaux proposés comme alternative par rapport aux modèles surexprimant DUX4, ont été générés (**Tableau 2**), comme par exemple les modèles murins PITX1 et Frg1, cibles directes de DUX4. Ces modèles animaux permettent en effet d’explorer les effets d’autres gènes potentiellement impliqués dans la FSHD sans pour autant mimer la maladie, et tester des approches thérapeutiques les ciblant spécifiquement. Récemment, l’efficacité d’un traitement *in vivo* aux oligonucléotides morpholinos inhibant la traduction de l’ARNm PITX1 a été démontré chez les souris PITX1, tant au niveau du phénotype des muscles (moins de fibres musculaires atrophiques) qu’au niveau fonctionnel (amélioration de la fonction musculaire) (Pandey et al. 2014).

Finalement une approche, indépendante des gènes candidats de la FSHD, a été proposée par Zhang *et coll*., basée sur la xénogreffe de muscles de patients FSHD dans des souris immunodéficientes, semble être une alternative intéressante, notamment pour tester l’effet des drogues potentielles dans un contexte plus physiologique (Zhang et al. 2014).

Tableau 2. Modèles animaux indépendants de *DUX4*.

Modèles animaux indépendants de DUX4	Modification génétique/biologique	Apparition des symptômes	Symptômes *in vivo* / Caractéristiques *in vitro*	Avantages	Inconvénients
Souris FRG1 (Gabellini et al. 2006)	Souris transgénique par introduction du transgène FRG1 sous le contrôle du promoteur humain spécifique aux muscles squelettiques	A l'âge de 13 semaines Durée de vie non spécifiée	- Diminution du poids corporel - Intolérance aux exercices - Prolifération des fibres de collagène - Caractéristique typique de la FSHD : Atrophie musculaire de muscles sélectifs - Epissage alternatif aberrant de pré-ARNm spécifiques (TNNT3 (régulation de la contraction musculaire) et MTMR1 (impliquée dans l'atrophie))	- Etude de l'effet pathologique *in vivo* de FRG1 qui est une cible transcriptionnelle de DUX4	- Expression de FRG1 limitée aux muscles squelettiques - Modèle non représentatif de la FSHD, l'expression de FRG1 étant encore controversée
Drosophile FRG1 (Jones et al. 2016)	Drosophiles transgéniques exprimant FRG1		- Capacité de vol affaiblie - Musculature désorganisée	- Utilisation potentielle pour un screening de drogues - Evaluer les effets pathologiques liés à l'expression de FRG1	- Modèle non représentatif de la FSHD, l'expression de FRG1 étant encore controversée
Souris Pitx1 (Pandey et al. 2012)	Souris transgénique, surexprimant d'une façon conditionnelle *Pitx1* dans les muscles squelettiques. : Activation de *Pitx1* en absence de doxycycline	Activation de Pitx1 à l'âge de 10 semaines. Apparition des symptômes 3 à 5 semaines post-activation.	- Diminution de la masse musculaire et faiblesse musculaire d'un groupe de muscles (biceps, triceps, deltoïde, muscle tibial antérieur) - Surexpression de p53 dans les muscles affectés - Caractéristiques histologiques : atrophie des myofibres accompagnée de nécrose et d'inflammation.	- Etude de l'effet pathologique *in vivo* de *Pitx1* qui est une cible transcriptionnelle de DUX4	
Souris xénogreffée (Zhang et al. 2014)	Greffe de muscles de biceps humains FSHD dans les membres postérieurs des souris immunodéficientes	Non spécifiés	- Durée de vie limitée à 41 semaines post-transplantation - Expression de DUX4 dans les xénogreffes extraits du muscle tibial antérieur de la souris - Phénotype des souris xénogreffées non spécifié	- Approche plus physiologique pour l'étude des biomarqueurs et de la régénération musculaire - Possibilité de tester des drogues	- Modèle non récapitulatif de la FSHD ne permettant pas d'étudier l'effet généralisé sur l'ensemble du corps

2 La différenciation myogénique des myoblastes normaux et des myoblastes FSHD

2.1 Organisation du muscle squelettique

Il existe trois types de tissus musculaires ayant chacun des fonctions différentes : le tissu musculaire strié squelettique responsable des mouvements volontaires, le tissu musculaire lisse permettant les mouvements non volontaires et le tissu musculaire myocardique assurant la contraction non volontaire de muscle strié cardiaque. Le muscle strié squelettique est le tissu atteint dans la FSHD.

Le muscle strié squelettique est constitué de plusieurs faisceaux musculaires enveloppés de tissu conjonctif, appelé l'épimysium. Chaque faisceau musculaire est formé d'un groupe de fibres musculaires, nommées aussi myofibres, enveloppées de tissu conjonctif, nommé périmysium. Au sein d'un faisceau musculaire, les fibres musculaires sont séparées les unes des autres par du tissu conjonctif dénommé l'endomysium. Le muscle squelettique doit sa fonction à la fibre musculaire, son unité fonctionnelle, dotée de la capacité de se contracter.

En effet la fibre musculaire, aussi appelée myocyte ou cellule musculaire, est un syncytium plurinucléé provenant de la fusion de plusieurs précurseurs musculaires. Sa membrane plasmique est recouverte d'un revêtement externe appelé la lame basale avec qui elle forme le sarcolemme, membrane de la fibre musculaire. Entre la membrane plasmique et la lame basale résident les cellules satellites, population de cellules souches musculaires quiescentes. Les myonuclei d'une fibre musculaire sont accolés sous la membrane plasmique, en position périphérique. Dans le cytoplasme de la myofibre (sarcoplasme) se trouvent de milliers de myofibrilles en position centrale de la fibre. Les myofibrilles sont des structures tubulaires allongées dans le sens de la cellule d'un diamètre de 1 à 2µm, constituées de la succession régulière de petits cylindres, les sarcomères. Ces derniers sont composés de deux types de filaments de protéines contractiles : les filaments fins d'actine associés à de la tropomyosine et de la troponine, et les filaments épais de myosine. L'assemblage de ces filaments constitue le sarcomère, l'unité contractile du muscle **(Figure 6)**.

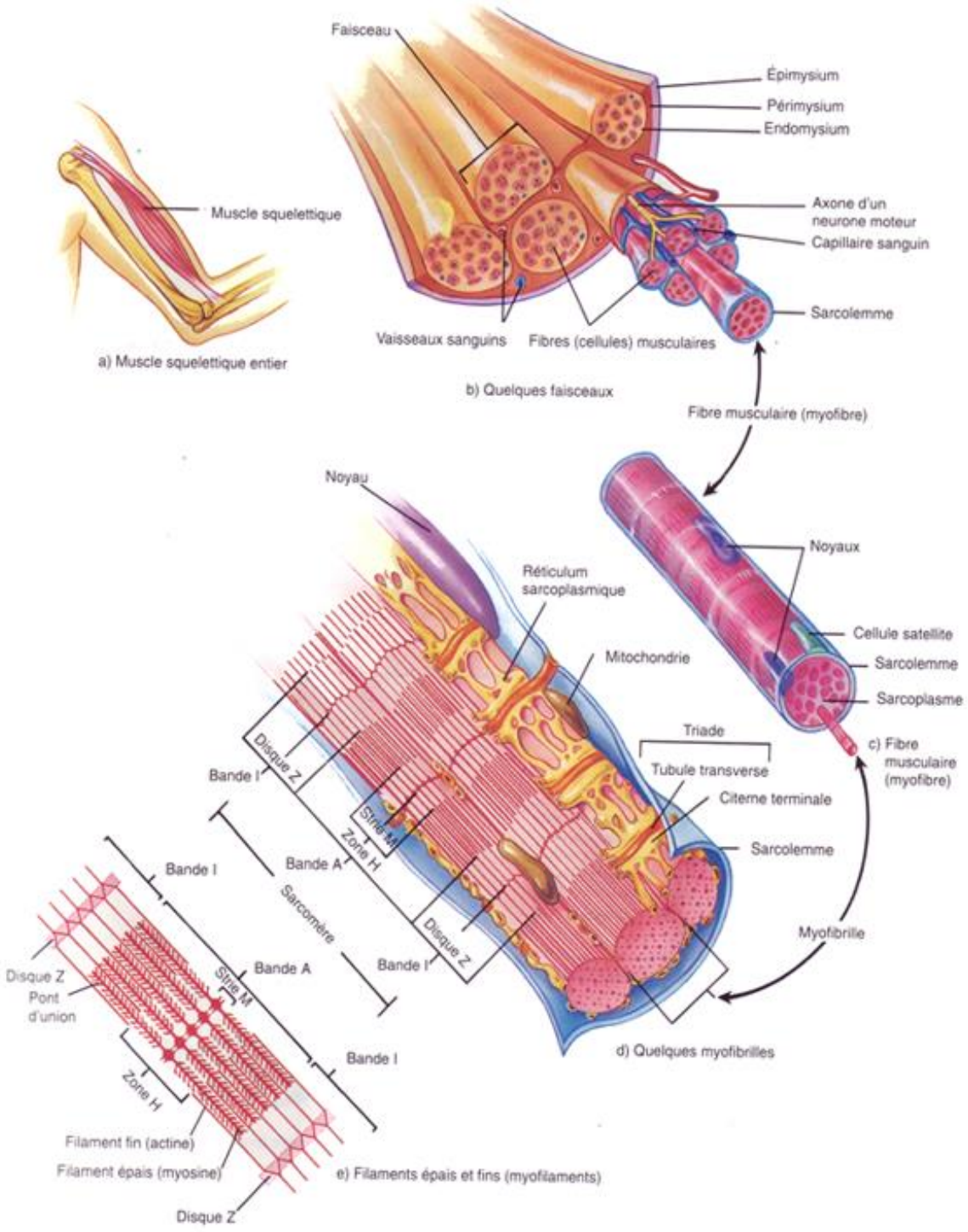


Figure 6. **Organisation du muscle squelettique adulte.** Le muscle strié squelettique adulte est constitué de faisceaux de fibres musculaires (myofibres, unité fonctionnelle du muscle), composées de myofibrilles dont l'unité est le sarcomère. Les sarcomères contenus dans les myofibrilles sont composés des filaments des protéines contractiles (actine et myosine). D'après Tortora and Grabowski, 1994 « Principes d'anatomie et de physiologie ».

Dans le sarcoplasme se trouvent tous les organites et molécules nécessaire au fonctionnement du muscle. De nombreuses mitochondries volumineuses sont alignées le long des myofibrilles, et fournissent l'énergie nécessaire à la contraction musculaire, l'ATP. Des protéines du cytosquelette (filaments intermédiaires de desmine et microtubules) assurent la cohésion des myofibrilles. Le réticulum sarcoplasmique enroulé autour de chaque myofibrille constitue sa source de calcium nécessaire à la contraction, et les tubules T, tubules transverses en continuité avec la membrane plasmique, véhiculent les potentiels d'action naissant à la jonction neuromusculaire vers l'intérieur de la fibre pour permettre la contraction. Le sarcoplasme comprend aussi de nombreuses granules de stockage du glycogène, énergie de réserve principale des cellules animales, et des molécules de myoglobine dont la fonction est de fixer l'oxygène et de le transmettre aux mitochondries.

Les muscles squelettiques sont des tissus très innervés et vascularisés. Le tissu conjonctif entourant chaque niveau d'organisation d'un muscle est en continuité avec les tendons reliant le muscle aux os sous-jacents. Représentant près de la moitié de la masse corporelle humaine, les muscles striés squelettiques permettent la motricité et le maintien de la posture du corps. Ils sont impliqués aussi dans le stockage d'énergie grâce aux réserves de glycogène et dans la thermogenèse. Ils constituent un réservoir d'acides aminés qui peuvent être relâchés dans le sang en cas de jeûne.

2.2 La myogenèse et la régénération du muscle strié squelettique

Une fibre musculaire se développe à partir de cellules progénitrices du muscle ayant pour origine majoritaire les somites (Tajbakhsh 2003), structures embryonnaires segmentées émanant du mésoderme présomitique (Pourquié 2001). Chaque somite est composé d'un sclérotome ventral, à l'origine du squelette axial, et d'un dermomyotome épithélial dorsal à l'origine du derme et des muscles. C'est au niveau du dermomyotome qu'apparaissent les premières cellules myogéniques qui migrent alors entre le dermomyotome et le sclérotome pour former le myotome primaire, le premier muscle squelettique, ainsi qu'à des sites plus distants pour former les muscles des membres (Tajbakhsh, S and Buckingham 2000) **(Figure 7A)**.

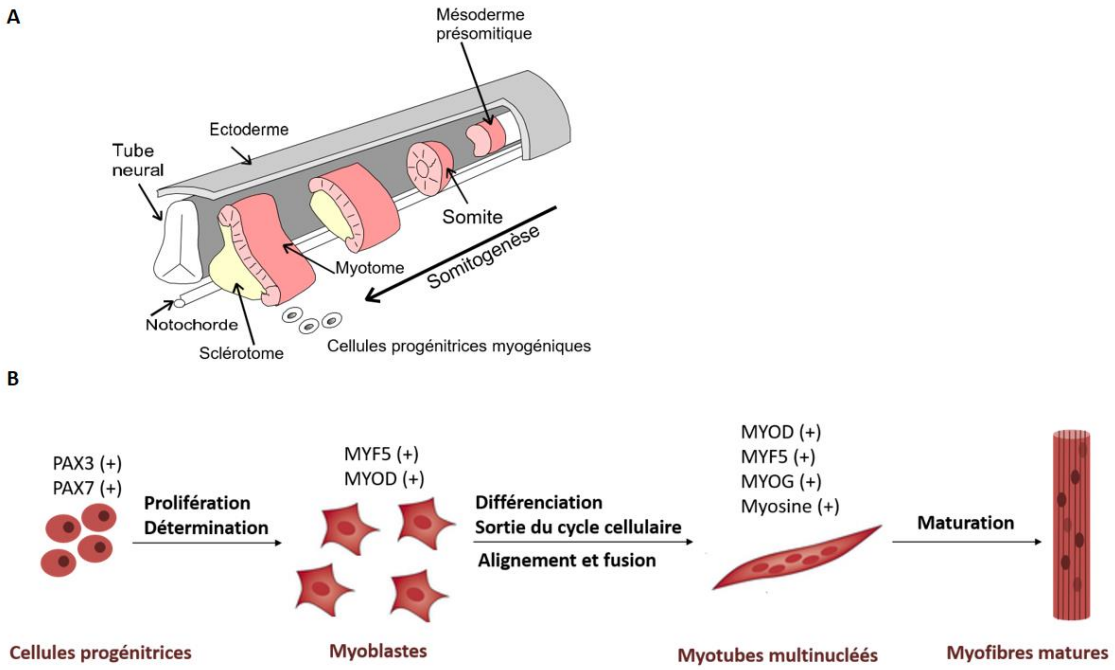


Figure 7. **Origine embryonnaire du muscle squelettique et processus de la différenciation myogénique (A)** Les cellules progénitrices myogéniques ont pour origine les somites et forment le myotome primaire, le premier muscle squelettique. **(B)** Les cellules progénitrices subissent l'étape de la détermination pour générer les myoblastes exprimant *MYOD* et *MYF5*. Les myoblastes prolifèrent, puis quittent le cycle cellulaire et entament la différenciation terminale. Ils s'alignent et fusionnent pour donner des myotubes multinucléés exprimant principalement MYOD, MYF5, la myogénine (MYOG) et la myosine. Une dernière étape de maturation mène à la formation des fibres musculaires matures. Figure adaptée à partir de Fatica et al. *Nature Reviews Genetics* 2014.

2.2.1 La formation des fibres musculaires

Les cellules progénitrices subissent en premier temps une étape cruciale de la myogenèse, la détermination myogénique, durant laquelle les progéniteurs musculaires multipotents (cellules souches capable de se différencier et former des tissus distincts) deviendront des cellules unipotentes (ne produisant qu'un seul type cellulaire), les myoblastes, engagés dans la voie myogénique (Perry & Rudnick 2000). La détermination myogénique débute lors de la formation du myotome et est orchestrée par deux facteurs de transcription essentiels appartenant à la famille des MRFs (Myogenic Regulatory Factors) : MYOD (Myogenic Differentiation 1, ou MYF3) et MYF5 (Perry & Rudnick 2000).

En second temps, les myoblastes vont entamer l'étape de la différenciation terminale dans laquelle ils fusionnent ensemble pour former les myotubes. Cette étape implique une régulation fine du cycle cellulaire. Afin de pouvoir se différencier, les myoblastes jusque-là en prolifération sortent du cycle cellulaire, étape irréversible coordonnée par les régulateurs du cycle cellulaire. En effet, une diminution de l'expression de plusieurs activateurs du cycle cellulaire (tels que la cycline A, D1 ou D2 et de leurs partenaires CDK (kinases dépendantes des cyclines)) et une induction de l'expression des répresseurs du cycle cellulaire (tels que les inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines (CKI) p21, p57, p27 et la protéine du rétinoblastome (RB)) constituent le déclenchement de la sortie du cycle cellulaire, marquant ainsi la première étape de la différenciation terminale (Rajabi et al. 2014).

D'autre part, la différenciation myogénique nécessite la mise en place d'un programme génétique complexe nécessaire au fonctionnement de la cellule musculaire. MYOD semble être le facteur de transcription clé initiant le programme myogénique, par sa capacité à activer, à différents moments de la différenciation myogénique, plusieurs gènes importants pour ce processus et pour la structure et le fonctionnement des myotubes (Bergstrom et al. 2002). Parmi eux se trouvent des facteurs de transcription pro-myogéniques tels que *MYOG* (myogénine) et *MEF2* (Myocyte Enhancer Factor 2) qui coopèrent avec MYOD pour l'activation d'autres gènes, des gènes responsables de l'arrêt du cycle cellulaire comme *p21* et *RB* et des gènes codant pour des protéines structurelles du muscle comme la myosine et les sous-unités de la troponine (**Figure 7B**).

En conclusion, la myogenèse est un processus finement régulé dans lequel les myoblastes issus de l'étape de la détermination myogénique et exprimant *MYOD* et *MYF5* sont capables de proliférer et se différencier en myotubes. Pour cela, les myoblastes sortent du cycle cellulaire et fusionnent pour former des cellules multinuclées, les myotubes, exprimant des protéines spécifiques du muscle. Finalement, les myotubes multinucléés donnent naissance à des fibres musculaires matures, processus au cours duquel ont lieu le réarrangement du cytosquelette, l'agencement des myofibrilles en sarcomère et la relocalisation des noyaux en périphérie. Ces fibres musculaires forment ainsi les muscles de l'embryon.

2.2.2 Les cellules satellites et la régénération musculaire

Les fibres musculaires sont post-mitotiques, incapable de se diviser en cas de besoin, notamment suite à un traumatisme musculaire. Ce sont les cellules satellites, cellules mononuclées localisées sous la membrane basale des fibres musculaires (Mauro 1961), qui sont sollicitées lors de la croissance pour augmenter la masse musculaire, lors de la régénération musculaire notamment suite à une lésion musculaire, et pour l'hypertrophie musculaire due à l'exercice physique.

Les cellules satellites adultes sont en effet des cellules souches musculaires quiescentes ayant pour origine les somites et qui expriment *PAX7* (Paired-box), gène appartenant à la famille des facteurs de transcription Pax et qui est nécessaire pour la maintenance des cellules satellites post-natales et leur auto-renouvèlement (Seale et al. 2000; Olguin & Olwin 2004; Relaix et al. 2006). *PAX7* est exprimé également dans les précurseurs myogéniques lors du développement embryonnaire mais ne l'est plus dans les cellules différenciées.

Une fois activées, les cellules satellites prolifèrent, se différentient et fusionnent entre elles ou avec des fibres musculaires existantes, afin de reconstituer de nouvelles myofibres fonctionnelles. En même temps, la division asymétrique de ces cellules souches leur permet de reconstituer la population initiale de cellules satellites quiescentes (Collins & Partridge 2005; Kuang et al. 2007). L'activation des cellules satellites inclut l'induction de la surexpression de *MYOD* et *MYF5*, tout comme pour le processus de la myogenèse embryonnaire (Zammit et al. 2002), la sortie de leur niche et leur entrée dans le cycle cellulaire. Ces cellules sont alors appelées myoblastes. Une fraction de ces myoblastes gardera l'expression de *PAX7* et perdra celle des marqueurs myogéniques pour pouvoir ainsi quitter le cycle cellulaire et restaurer le pool de cellules satellites (Zammit et al. 2004).

Les myoblastes restants prolifèrent et après plusieurs cycles de division, la majorité sortent du cycle cellulaire de façon irréversible au niveau de la transition G1/S et entament la différenciation terminale.

Nous disposons au laboratoire de plusieurs cultures de myoblastes primaires isolés à partir de biopsies de muscle d'individus sains et de patients FSHD provenant du laboratoire de D. Laoudj-Chenivesse. Une partie de mon travail de thèse a été effectuée sur ces cultures primaires humaines qui représentent un modèle d'étude proche de la physiologie.

2.3 La différenciation myogénique *in vitro* des myoblastes FSHD

D'un point de vue histologique, les biopsies de muscles FSHD présentent des modifications fréquemment retrouvées dans d'autres myopathies. Une variation dans la taille des fibres musculaires est souvent détectée dans les muscles FSHD à un stade initial de la maladie. La progression de l'atteinte musculaire est marquée par la présence de nécrose, d'un envahissement par les macrophages des fibres nécrotiques et une régénération musculaire. A un stade avancé de la maladie, le nombre de fibres musculaires est considérablement réduit, le muscle est envahi par du tissu adipeux interstitiel et une fibrose de l'endomysium. Dans certains cas, une inflammation périvasculaire et interstitielle est observée, qui a probablement lieu en réponse à la dégénérescence et la nécrose musculaire (Padberg 1982) **(Figure 8)**.

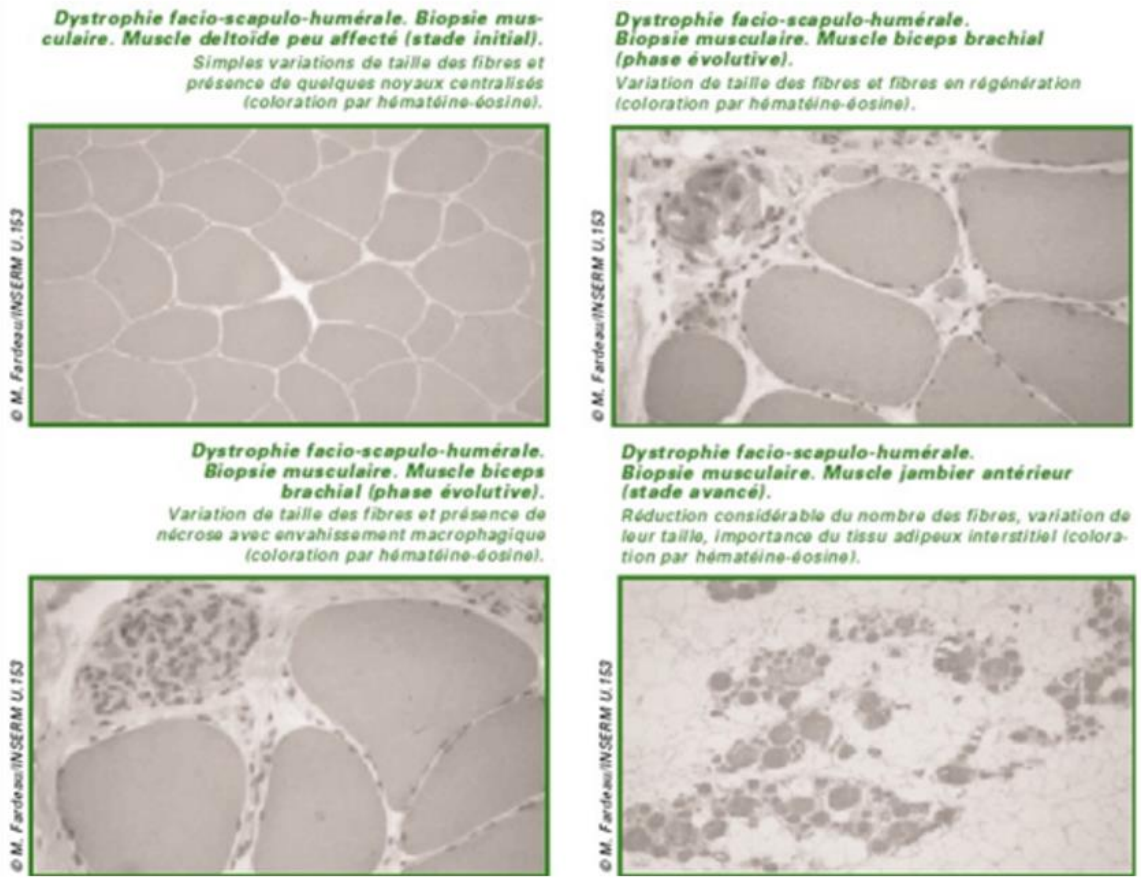


Figure 8. **Anomalies histologiques du muscle squelettique FSHD à différents stades de l'atteinte masculaire.** Les biopsies de muscles FSHD présentent, selon le degré de la sévérité de l'atteinte musculaire, des fibres nécrotiques envahies par des macrophages, une réduction de la taille des fibres musculaires et un envahissement du muscle par du tissu adipeux. Figure extraite d'un document de l'AFM publié en 2002.

Dans le cadre de l'étude de la pathophysiologie de la FSHD, évaluer la différenciation myogénique *in vitro* des myoblastes primaires FSHD constitue un élément clé pour la compréhension de la dégénérescence progressive des muscles des patients. Plusieurs études ont démontré des variabilités au niveau de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la voie de la différenciation génique dans les myoblastes et les myotubes FSHD (détaillés dans le paragraphe **1.7**) ainsi que des variabilités pathologiques au niveau du phénotype des myotubes FSHD *in vitro*.

En effet, les myoblastes primaires FSHD en culture proliféraient d'une façon similaire que les myoblastes normaux, et exprimaient *MyoD*. Arrivés à confluence, les myoblastes FSHD étaient capables d'entamer la différenciation myogénique terminale *in vitro* dans un milieu de culture pauvre en sérum et produisaient des myotubes dont l'organisation sarcomérique était intacte (immunomarquage de la myosine et de l'α-actinine) (Barro et al. 2010). Bien que ces caractéristiques de la différenciation myogénique étaient similaires entre les myoblastes FSHD et normaux, les myotubes FSHD qui en résultaient présentaient une morphologie anormale, et des variations au niveau de leur indexe de fusion myogénique (MFI, ratio des noyaux dans les myotubes sur le nombre total des noyaux) ainsi que de leur index de déformation myogénique (DMI, proportion des myotubes à phénotype déformé). Contrairement aux myoblastes normaux qui fusionnaient et formaient des myotubes ramifiés à noyaux alignés, les cultures FSHD comprenaient soit des myotubes atrophiques avec un diamètre inférieur à 20 µm et un faible MFI, soit déformés avec des noyaux aléatoirement répartis dans le sarcoplasme et un MFI plus élevé. D'une manière intéressante, plus les myoblastes FSHD étaient capables de fusionner entre eux, plus les myotubes qui en résultaient étaient déformés. Cette déformation de la morphologie des myotubes FSHD étaient aussi accompagnée d'une désorganisation du cytosquelette d'actine et des microtubules (Barro et al. 2010) (**Figure 9**). Ces caractéristiques morphologiques pathologiques étaient indépendantes des caractéristiques histo-pathologiques des muscles d'origine. Ainsi les cellules satellites FSHD se différencient en myotubes dont la morphologie est anormale *in vitro*.

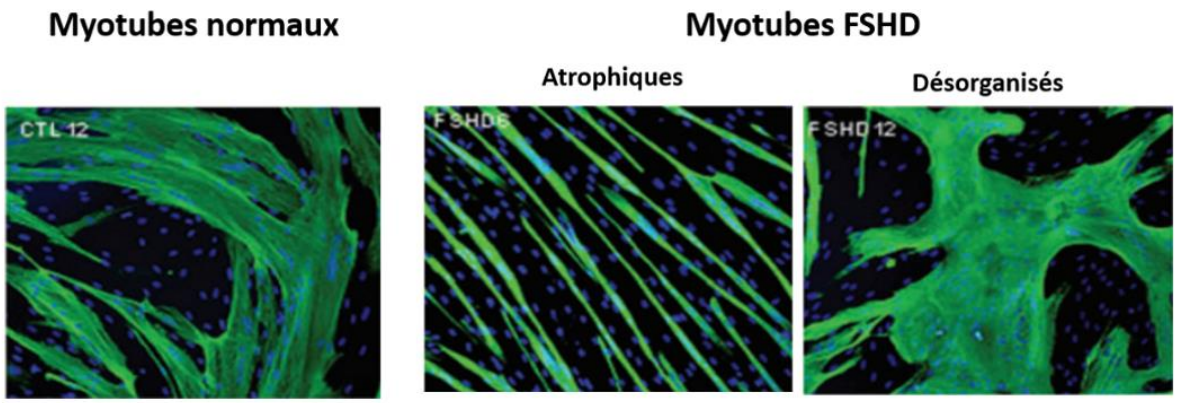


Figure 9. **Anomalies phénotypiques des myotubes FSHD *in vitro*.** Lors de la différenciation myogénique in vitro, les myoblastes normaux fusionnent et forment des myotubes ramifiés à noyaux alignés (figure à gauche), tandis que les myotubes FSHD formés sont soit fins et atrophiques (figure au milieu) soit déformés à aspect désorganisé (figure à droite). Figure adaptée à partir de Barro et al. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2010.

D'une façon intéressante, une étude protéomique effectuée sur des myotubes FSHD a pu démontrer la diminution de plusieurs composants de la contraction et de la structure musculaire dans les myotubes atrophiques, tels que les chaines lourdes de la myosine (MYH8, MYH3 et MYH7), les chaines légères de la myosine (MYL1 et MYL6B) et d'autres protéines impliquées dans le développement des muscles striés, suggérant ainsi une protéolyse spécifique associée à l'atrophie musculaire. Quant aux myotubes désorganisés, une surproduction des protéines impliquées dans l'organisation du cytosquelette (TUBA1A : Tubulin α-1A chain, TUBB : Tubulin ß chain) est observée, pouvant être impliquées dans la désorganisation morphologique. Dans les deux types de myotubes FSHD, une altération des protéines impliquées dans l'épissage des ARNm a été décrite (Tassin et al. 2012).

Un phénotype défectueux des fibres musculaires peut être corrélé à une faiblesse musculaire, cela peut être le cas dans la FSHD mais les mécanismes pathologiques sous-jacents responsables des phénotypes aberrants des myotubes FSHD et leurs implications dans la capacité régénérative des cellules satellites restent à être définies.

D'autre part, la différenciation myogénique semble être compromise par l'expression de *DUX4*. Une première étude menée par Yip *et coll*. sur une lignée murine C2C12 transfectée d'une façon stable

et transitoire par un nombre limité de répétitions D4Z4 (1 à 4 répétitions) a montré la formation de myotubes à morphologie anormale, caractérisée par des myotubes gros, plus ronds que les myotubes C2C12 contrôles, avec un MFI diminué. Quant aux myotubes contrôles, ils étaient fins et allongés. La différenciation myogénique apparaissait normale d'après l'immunomarquage de certains marqueurs de la différenciation terminale tels que la chaine lourde de la myosine (Yip & Picketts 2003). Ainsi, les auteurs ont suggéré que la présence des répétitions D4Z4 influençait la fusion des myoblastes C2C12 plutôt que la différenciation myogénique en soi, et cela probablement par des interactions avec des gènes impliqués dans la fusion des myoblastes. Cependant, les mécanismes provoquant cette anomalie de fusion n'ont pas été élucidés. Quelques années plus tard, des études concentrées sur *DUX4* ont pu démontrer que l'expression forcée de ce facteur de transcription dans des myoblastes immortalisés normaux provoquait la formation de myotubes atrophiques accompagnée de la surexpression de deux ubiquitine ligases E3, MuRF1 (Muscle Ring Finger 1) et Atrogine-1 (Vanderplanck et al. 2011), qui sont tous les deux décrits dans la littérature comme impliqués dans la dégradation de protéines musculaires et par conséquent dans l'atrophie musculaire (de Palma et al. 2008; Lagirand-Cantaloube et al. 2009). De plus, DUX4 induit l'expression de DEFB103, codant pour la ß-défensine 3 capable d'induire la surexpression de la myostatine et par conséquent inhiber la différenciation myogénique (Geng et al. 2012). La ß-défensine 3 est trouvée aussi surexprimée dans les myoblastes et les biopsies de patients FSHD. Pris ensemble, ces données suggèrent que *DUX4* est impliqué dans l'atrophie des myotubes FSHD observée *in vitro*. Il est important de noter que les myotubes atrophiques obtenus suite à la surexpression de *DUX4* comprenaient majoritairement moins que trois noyaux par myotube, par conséquent la possibilité que l'expression forcée de *DUX4* inhiberait la capacité de fusion des myoblastes n'est pas à écarter.

La morphologique anormale des myotubes FSHD ainsi que l'ensemble des gènes et protéines musculaires trouvés dérégulés dans ces myotubes suggèrent une potentielle dérégulation de la fonctionnalité des muscles FSHD. La caractérisation des mécanismes moléculaires responsables des anomalies morphologiques des myotubes FSHD et l'étude de la fonctionnalité de ces myotubes et leur capacité à former des fibres musculaires fonctionnelles restent jusqu'à présent inconnus.

3 Le stress oxydant, les dommages de l'ADN et leurs implications dans l'homéostasie musculaire

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS), constamment produits par le métabolisme des cellules vivant en aérobie, ont été longtemps vues comme des produits toxiques du stress oxydant, agressant les constituants cellulaires. Nous nous attarderons dans ce chapitre particulièrement aux ROS et à leur implication dans l'homéostasie musculaire.

La contraction musculaire génère des espèces réactives de l'oxygène (ROS), longtemps considérés comme source d'un stress oxydant néfaste pour les fibres musculaires. Néanmoins, la découverte de la participation des ROS dans beaucoup de voies de signalisation a permis d'attribuer aux ROS produits en concentrations « physiologiques » des actions cellulaires bénéfiques au muscle. Maintenir l'homéostasie du tissu musculaire est cruciale pour sa fonction, et met en jeu comme pour tout autre type cellulaire, un système complexe de détoxification des ROS afin de garder un équilibre dynamique entre la production de ROS et leur élimination. Une accumulation « pathologique » de ROS altère les composants cellulaires, notamment l'ADN. Le stress oxydant et les dommages de l'ADN affectent le processus de la différenciation myogénique et participent à la pathophysiologie de plusieurs myopathies. Nous exposons dans ce chapitre l'ensemble de ces notions et nous nous attardons sur les données disponibles dans la littérature dans le cadre de la FSHD.

3.1 Les espèces réactives de l'oxygène, les défenses cellulaires antioxydantes : entre l'homéostasie redox et le stress oxydant

Les ROS représentent un groupe de molécules hautement réactives à propriété oxydante. Comme leur nom indique, les ROS dérivent de l'oxygène. En effet, durant le processus de la respiration la molécule de dioxygène O_2 est progressivement réduite en deux molécules d'eau H_2O suite à une réaction d'oxydoréduction mettant en jeu quatre électrons : $O_2 + 4e^- + 4H^+ = 2H_2O$. La réduction incomplète de l'O_2 génère des ROS à fort potentiel oxydant : le radical superoxyde ($O_2^{\circ -}$), le H_2O_2 et le radical hydroxyle (OH°) suite à sa réduction par un, deux, ou trois électrons respectivement. Le métabolisme cellulaire basal produit constamment des ROS ; en effet, toute réaction enzymatique

contrôlée mettant en jeu un transfert d'électrons peut être sujet à des fuites d'électrons, et qui en présence de l'O_2, produit des ROS. La source majeure de ROS est la mitochondrie et plus précisément la chaine respiratoire mitochondriale de la membrane interne mitochondriale (Murphy 2009). En effet, une fuite durant le transfert d'électrons de la phosphorylation oxydative peut générer des ROS suite à la réduction partielle de l'O_2 en anions superoxydes au sein de la mitochondrie, qui peuvent aussi atteindre le cytoplasme (Crompton 1999; Storz 2006). La production de ROS a lieu aussi dans d'autres compartiments cellulaires comprenant notamment des oxydases telles que les NADPH oxydases (NOX) (Bedard & Krause 2007).

Les ROS sont capables d'attaquer les molécules cellulaires telles que les protéines, les lipides, le pool de nucléotides et l'ADN. Afin d'éviter l'accumulation intracellulaire des ROS et pour garder l'homéostasie cellulaire, plusieurs systèmes de défenses cellulaires antioxydants, enzymatiques et non-enzymatiques, entrent en jeu d'une façon coordonnée afin d'empêcher ou de réduire les dommages oxydatifs.

Les enzymes antioxydantes sont nombreuses, dont les principales sont la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPX) et la catalase (CAT) (**Figure 10A**). Ces enzymes antioxydantes favorisent l'élimination des différents types de ROS, en ayant souvent recours à des co-facteurs ou à des molécules antioxydantes à potentiel redox (Culotta et al. 2006; Meister & Anderson 1983; Kirkman & Gaetani 2007).

D'autre part, la cellule dispose d'un ensemble de molécules antioxydantes non-enzymatiques, dont le plus important à citer est le glutathion. Le glutathion GSH est une molécule antioxydante majeure dans tout type cellulaire ; Grâce à son groupement thiol SH au niveau de son résidu de cystéine, ce tripeptide possède une capacité réductrice et peut réagir directement avec les ROS et les réduire, il permet d'éliminer les métaux lourds, et constitue aussi le substrat de la GPX pour éliminer le H_2O_2 et les hydroperoxydes organiques. De plus le GSH participe dans la réduction d'autres antioxydants tels que les vitamines C et E (pour revue (Meister & Anderson 1983)). D'autres antioxydants non-enzymatiques, tels que les vitamines C (acide ascorbique) (dans le cytosol) et E (α-tocophérol) (associés aux membranes cellulaires) et les caroténoïdes participent à l'homéostasie redox (Janero 1991; El-Agamey et al. 2004; Carr & Frei 1999) (**Figure 10**).

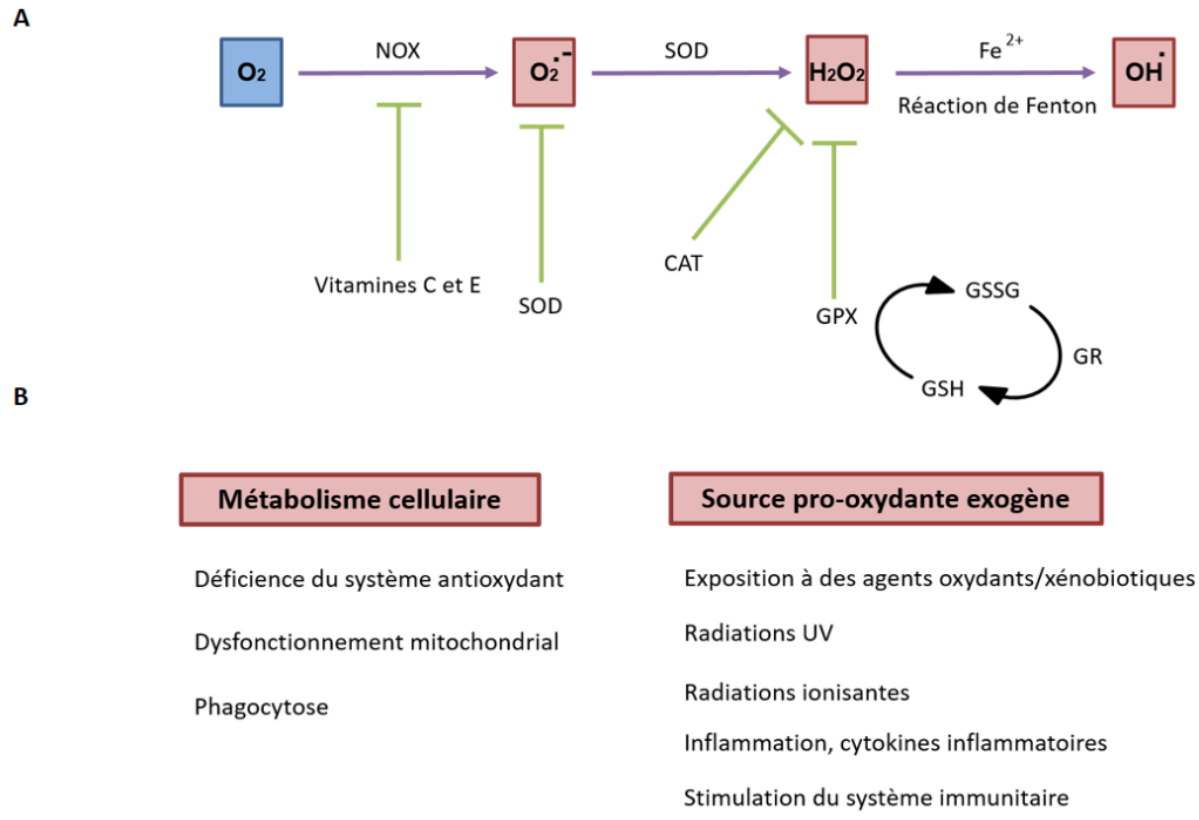


Figure 10. **Schéma simplifié du système cellulaire de défense antioxydant et des principales sources de ROS.** La cellule dispose d'enzymes de détoxification des ROS et de molécules antioxydantes constituant le système cellulaire de défense antioxydante. La NADPH oxydase (NOX) catalyse l'oxydation du NADPH par l'O_2 tout en produisant des radicaux $O_2^{\circ-}$. La superoxyde dismutase (SOD) existe chez les mammifères sous trois isoformes (SOD1 ; SOD2 et SOD3), chacun présent dans un compartiment cellulaire déterminé ou dans l'espace extracellulaire, et dont le rôle est de dismuter les radicaux superoxydes ($O_2^{\circ-}$) et former le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le dioxygène (O_2) en présence d'un métal de transition se liant à leur domaine actif. Le H_2O_2 peut générer les radicaux hydroxyles (OH°) par la réaction de Fenton en présence des Fe^{2+}. La glutathion peroxydase (GPX), existant sous 5 isoformes chez les mammifères (GPX1-5), catalyse la réduction du H_2O_2 ou du en eau, en utilisant 2 molécules de glutathion réduit (GSH). En cédant leurs ions d'hydrogène, les 2 GSH sont alors oxydés en disulfure de glutathion (GSSG), dimère de 2 glutathions unis par un pont disulfure. Le glutathion étant une des molécules antioxydantes principales de la cellule, le recyclage du GSH a lieu à l'aide de la glutathion réductase (GR) et son cofacteur d'oxydoréduction à l'état réduit, le NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, réduit), qui alors réduisent le GSSG en 2 GSH. La catalase (CAT), exprimée d'une façon ubiquitaire dans la cellule, catalyse à l'aide du fer, son cofacteur, l'élimination du H_2O_2 en H_2O et O_2. Figure adaptée à partir de Morel et al. *Biochemical Journal*, 1999. **(B)** Les principales sources endogènes et exogènes de ROS.

Dans le cas des muscles, les antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques se trouvent au sein des fibres musculaires ainsi que dans le réseau vasculaire et l'espace extracellulaire afin d'assurer une protection optimale du muscle, surtout en cas d'exercices physiques intenses ou prolongés (pour revue (Powers et al. 2011)).

Un stress oxydant a lieu quand l'homéostasie redox est altérée dans la cellule ; Ce déséquilibre peut être dû à une surproduction de ROS ou d'une déficience du système antioxydant. Une production non-physiologique de ROS peut être la conséquence d'un dysfonctionnement du métabolisme cellulaire ou d'une exposition à une source pro-oxydante exogène telle que les facteurs environnementaux (radiations ionisantes, radiation ultraviolet, inflammation, stimulation du système immunitaire) et des xénobiotiques causant la production de ROS durant leur métabolisme. Par exemple, une stimulation du système immunitaire entraîne une production locale et massive de ROS due, entre autres, à la stimulation de l'activité de NADPH oxydase dans les phagocytes (pour revue (Hampton et al. 1998)). Une inflammation provenant d'une infection chronique génère beaucoup de ROS dus aux neutrophiles recrutés qui produisent des radicaux superoxydes et du H_2O_2 (Hardbower et al. 2013). Une déficience du système antioxydant, notamment une dérégulation dans la synthèse du glutathion ou des enzymes antioxydantes (Mlchlels & Kfmacli 1988), ou une diminution du stock des vitamines antioxydantes (Hagen et al. 1999) sont accompagnées de l'augmentation de la quantité de ROS intracellulaires. Une accumulation excessive de ROS peut causer des dommages irréversibles aux macromolécules cellulaires et par conséquent provoquer l'apoptose (Liu et al. 2008) ou la carcinogenèse (Klaunig et al. 1998). Les ROS peuvent aussi oxyder et altérer le pool de nucléotides, influençant ainsi l'intégrité génomique (pour revue Rudd et al. 2016). Néanmoins une surproduction modérée et transitoire de ROS définit un état de « stress oxydant » ponctuel qui sera suivi d'une détoxification des ROS. La persistance de l'exposition à la source de ROS (par exemple une inflammation chronique) ou un défaut constitutif dans la défense antioxydante provoque un déséquilibre constant du statut redox et un stress oxydant chronique dont les conséquences sont souvent pathologiques (**Figure 11**).

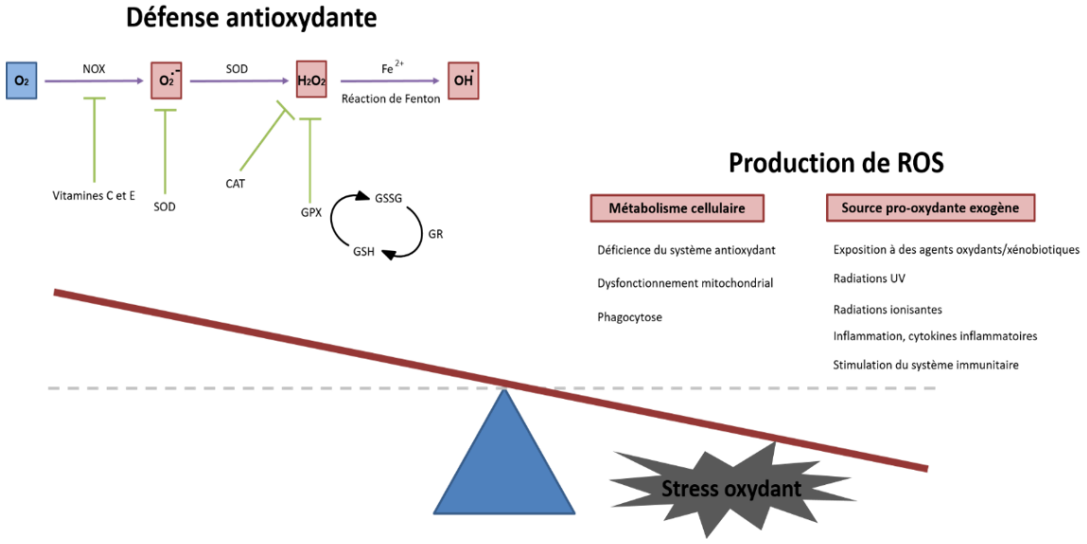


Figure 11. Le déséquilibre entre la production de ROS et le système antioxydant définit un état de stress oxydant.

3.2 Les dommages oxydatifs de l'ADN et les voies de détection et de réparation de l'ADN

3.2.1 Les lésions oxydatives de l'ADN

Les dommages de l'ADN jouent un rôle majeur notamment dans la mutagenèse, la carcinogenèse, et le vieillissement. Leur source peut être endogène (la respiration et le métabolisme cellulaire), ou exogène suite, par exemple, à une exposition à un agent génotoxique. Les dommages de l'ADN causés par les ROS constituent les dommages les plus fréquents, et regroupent plusieurs types de dommages oxydatifs de l'ADN : les lésions simples de l'ADN dont les bases oxydées, les sites abasiques et les cassures simple brin et double brin **(Figure 12)**, et les lésions complexes et étendues de l'ADN telles que les OCDL (non-DSB oxidative clustered bi-stranded DNA lesions) (pour revue (Nikitaki et al. 2015)).

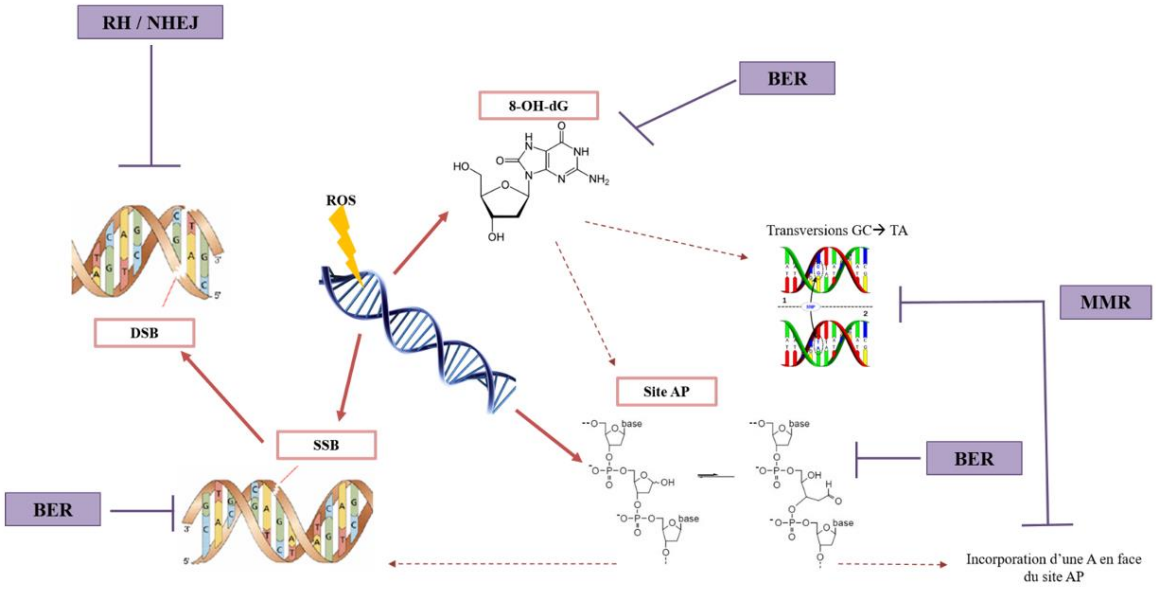


Figure 12. **Les dommages oxydatifs de l'ADN.** Plusieurs types de dommages de l'ADN, direct (flèches roses continues) et indirects (flèches roses discontinues), surviennent suite à l'attaque de l'ADN par les ROS. Face à ces attaques, la cellule dispose de plusieurs voies de réparation de l'ADN adaptées aux différents types de dommages de l'ADN. 8-OG-dG : 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, BER : réparation par excision de base, DSB : cassure double brin, MMR : réparation des mésappariements de bases, NHEJ : réparation par la jonction d'extrémités non homologues, RH : réparation par la recombinaison homologue, Site AP : site abasique, SSB : cassure simple brin.

Parmi les modifications oxydatives des bases azotées de l'ADN, estimées de l'ordre de 20 000 bases endommagées par cellule humaine par jour (Beckman & Ames 1997), la 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) s'avère être la plus abondante et la plus étudiée. Les 8-OH-dG se forment suite à une hydroxylation (rajout d'un groupe hydroxyle) de la guanosine et s'apparient préférentiellement avec l'adénine. Si les 8-OH-dG ne sont pas éliminées, elles génèrent ainsi des transversions GC→TA lors de la réplication de l'ADN, d'où leur potentiel mutagénique (Yasui et al. 2014). Les 8-OH-dG sont principalement réparées par la voie de la réparation par excision de base (BER), dans laquelle l'intervention d'une glycosylase clivant la liaison N-glycosidique entre la 8-hydroxyguanine et le désoxyribose libère la base et crée ainsi un site abasique (site AP, pour site apurinique/apyrimidique) (Demple & Harrison 1994; Almeida & Sobol 2007).

Outre les sites AP générés suite à la première étape de la réparation par BER des bases abimées, et ceux produits spontanément par hydrolyse des liaisons N-glycosidiques de l'ADN, les ROS peuvent

générer des sites AP en capturant l'hydrogène des désoxyriboses et s'ils ne sont pas réparés, mènent à la rupture de la liaison sucre-phosphate du squelette d'ADN et provoquent des cassures simples brins de l'ADN (SSB, pour single-strand breaks) (Breen & Murphy 1995). En effet les sites AP constituent un type de lésion de l'ADN parmi les plus fréquents dans le génome (50 000 et 200 000 lésions par cellule de mammifère), avec près de 10 000 lésions par cellule humaine par jour et touchant préférentiellement les purines (Nakamura & Swenberg 1999; De Bont & van Larebeke 2004). Cependant, en présence de ROS leur nombre est largement augmenté (Nakamura et al. 2000) et leur persistance cause des effets délétères. En effet, les sites AP peuvent évoluer en SSB. Le plus dangereux reste leur effet mutagène dû à l'incorporation préférentielle d'une adénine sur le brin opposé par l'ADN polymérase lors de la réplication. Afin d'assurer la complémentarité des bases, le site AP est remplacé par une thymine (Obeid et al. 2010) (pour revue (Jackson & Loeb 2001)).

Plusieurs SSB proches les uns des autres et présents sur les deux brins de l'ADN, causés par des attaques rapprochées de l'ADN par un nombre élevé de ROS, constituent des cassures doubles brin (DSB, pour double-strand break), fréquemment causées par les radiations ionisantes (pour revue (Breen & Murphy 1995)).

3.2.2 La réponse aux dommages de l'ADN (DDR) : gardien de l'intégrité génomique

Afin de maintenir l'intégrité de son génome, la cellule dispose de voies distinctes, complexes et fonctionnellement entrecroisées, connues sous le nom des mécanismes de la réponse aux dommages de l'ADN (DDR, pour DNA damage response). Ces voies englobent des processus coordonnés permettant la détection des lésions de l'ADN, l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire, l'accumulation des facteurs de réparation de l'ADN sur le site des dommages, et enfin la réparation physique des lésions de l'ADN. Chaque mécanisme de réparation de l'ADN est spécifique d'un ou de plusieurs types de lésions de l'ADN (Hoeijmakers 2001).

Les prinicpales voies de détection des dommages de l'ADN

Au moment où l'ADN cellulaire est attaqué, plusieurs voies de détection des dommages de l'ADN couplées à des cascades de signalisation sont mises en jeu, les principales étant celles de l'ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) et de l'ATR (ATM-related) pour la détection des cassures de l'ADN **(Figure 13)**.

ATM est majoritairement activée suite aux DSB dont la persistance induit des aberrations chromosomiques (van Gent et al. 2001) et met en jeu des protéines clés telles que H2AX et Chk2. Quant à la voie de ATR dont le substrat principal est Chk1 (Zhao & Piwnica-Worms 2001), elle est activée majoritairement suite aux SSB et au stress réplicatif dus au stress oxydant et aux radiations ionisantes et UV (Guo et al. 2000; Willis et al. 2013). D'une façon intéressante, les voies ATM-Chk2 et ATR-Chk1 sont interconnectées et se régulent l'un l'autre en réponse aux différents stimuli et aux différents types de dommages de l'ADN (pour revue (Yan et al. 2014)). Ces voies de DDR mènent à l'arrêt momentané du cycle cellulaire afin de laisser le temps à la réparation de l'ADN en amont de la réplication et de la division cellulaire, et coordonnent la réparation de l'ADN. Ainsi, suivant la phase du cycle cellulaire dans laquelle la cellule était durant l'attaque de l'ADN et le type de dommage de l'ADN provoqué, le cycle cellulaire est bloqué au niveau de la transition G1/S, au cours de la phase S ou de la transition G2/M (Zhou & Elledge 2000; Callegari et al. 2007). Dans le cas où les dommages de l'ADN sont abondants, l'apoptose est alors déclenchée (Bernstein et al. 2002).

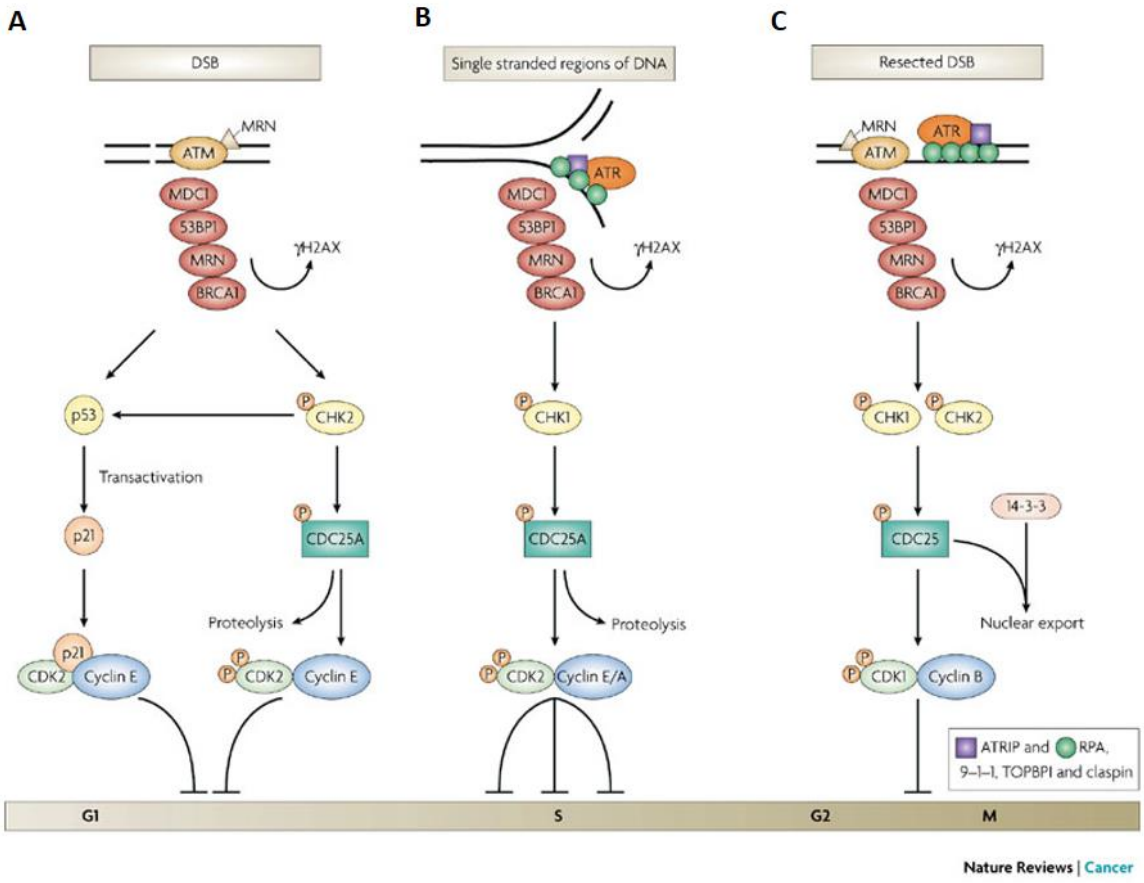


Figure 13. **Les principales voies de détection des cassures de l'ADN** Les principales voies de détection des cassures de l'ADN sont celles de ATM en phase G1 et de ATR en phase S, couplées à des cascades de signalisation menant à l'arrêt momentané du cycle cellulaire. **(A)** En réponse aux DSB, le complexe MRN, senseur des DSB, recrute ATM aux extrémités altérées de l'ADN, et ATM qui jusque-là était inactive sous la forme d'un dimère, autophosphoryle sa sérine 1981 (pATM) et se dissocie de son dimère. Sous cette forme monomérique active, pATM phosphoryle ses substrats directs dont la sérine 139 de l'histone H2AX (ɣ-H2AX), la thréonine 68 de la kinase transductrice Chekpoint kinase 2 (pChk2) et la sérine 15 de p53. pChk2 phosphoryle la phosphatase cdc25a qui, sous cette forme, est ubiquitylée et dégradée, empêchant ainsi la déphosphorylation de la Kinase 2 dépendante de la cycline (Cdk2). En activant directement ou indirectement (via pChk2) p53, facteur de transcription favorisant l'expression de p21, la voie active de ATM mène à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1. **(B)** La voie de ATR-Chk1 est activée majoritairement suite aux SSB et au stress réplicatif, dus entre autres au stress oxydant, et bloquant la fourche de réplication en phase S. Une fois activée par phosphorylation, pATR phosphoryle et active plusieurs substrats dont le substrat majeur est la kinase transductrice Chk1 qui est phosphorylée sur la sérine 345. pChk1 phosphoryle à son tour la phosphatase cdc25a qui sera alors dégradée, empêchant ainsi la progression de la phase S. **(C)** Enfin, les DSB qui ont lieu durant la phase G2 activent directement la voie ATM et indirectement celle de ATR, menant à la phosphorylation des kinases checkpoint (Chk1 et Chk2), et des phosphatases cdc25. Ainsi la déphosphorylation de CDK1-Cycline B est empêchée et la progression en mitose est bloquée. Figure d'après Löbrich et al. *Nature reviews. Cancer*, 2007.

Les voies de réparation de l'ADN

De multiples voies de réparation de l'ADN se chevauchant sont responsables de la réparation des dommages de l'ADN.

Dans le cas des lésions touchant les bases et n'altérant pas la structure en double hélice de l'ADN, tels que les 8-OH-dG, les sites AP et les SSB, leur réparation s'effectue via le BER (Almeida & Sobol 2007). Ce mécanisme de réparation consiste à retirer les bases altérées à l'aide des ADN glycosylases, créant ainsi un site AP. Ce dernier est ensuite excisé par les endonucléases AP, principalement par APE1, et le nucléotide manquant est remplacé à l'aide de l'ADN polymérase ß. Enfin, les bouts d'ADN sont reliés à l'aide d'une ADN ligase. La voie BER est subdivisée en deux sous-voies majeures chez les cellules de mammifères : la SP-BER (Short Path BER) et la LP-BER (Long Patch BER), qui diffèrent par les protéines utilisées tout au long de la voie de réparation (pour revue (Leandro et al. 2015)). La SP-BER est détaillée dans la **Figure 14**.

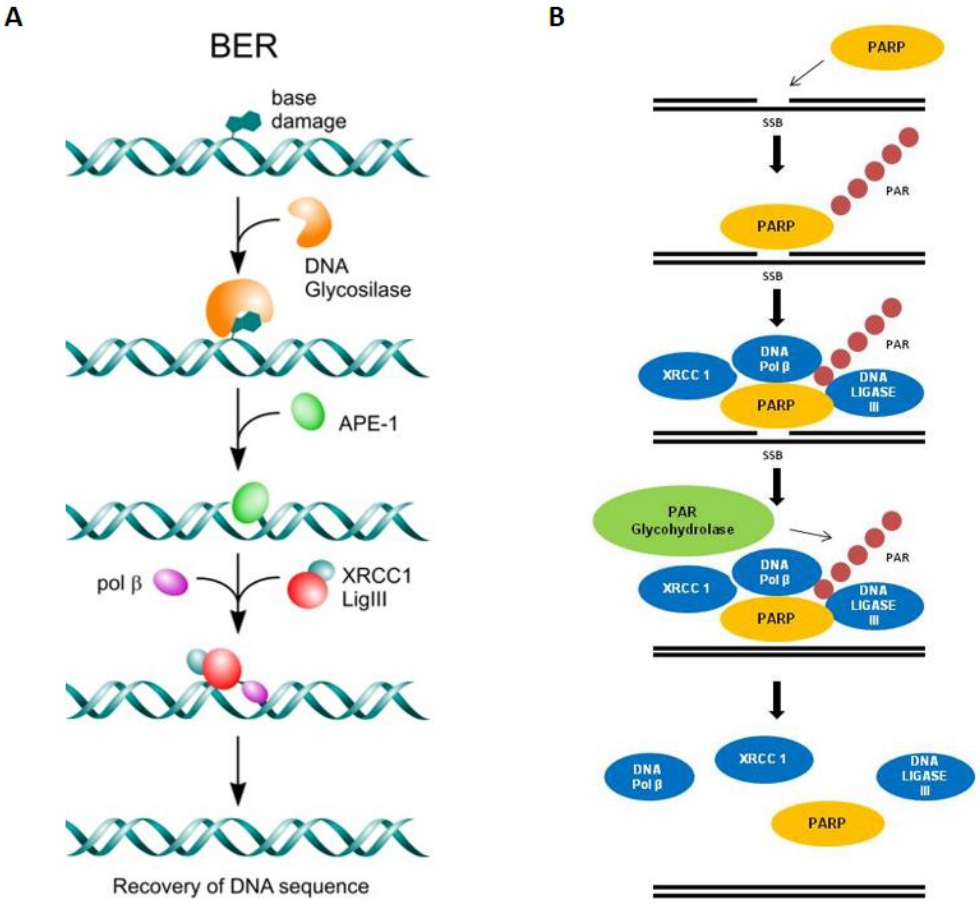


Figure 14. **La réparation de l'ADN par excision de base. (A)** Le mécanisme de réparation par excision de base (BER) consiste à cibler les bases altérées à l'aide des ADN glycosylases monofonctionnelles ou bifonctionnelles qui les reconnaissent et les retirent, créant ainsi un site AP. Ce dernier est ensuite excisé par les endonucléases AP (APE1). Le nucléotide manquant est alors remplacé à l'aide de l'ADN polymérase ß et enfin scellé à l'aide du complexe XRCC1/Ligase III. Figure à partir du livre de Emil Miladenov et George Iliakis 2011, " DNA Repair- On the Pathways to Fixing DNA damage and Errors". **(B)** Le BER peut mettre en jeu d'autres enzymes clés, les poly(ADP-ribose) polymérases 1 et 2 (PARP1 et 2), qui agissent comme des senseurs essentiellement des SSB et des transducteurs du signal de ces lésions ; une fois les SSB repérées, les PARP se lient à l'ADN et commencent à synthétiser des chaines de poly (ADP-ribose) (PAR), signal pour le recrutement d'autres enzymes nécessaires à la réparation des SSB (ADN polymérase ß, ligase III et XRCC1). Une fois les SSB réparées, les chaines de PAR sont dégradées à l'aide de la Poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG). Figure à partir de Hilton et al. *Frontiers in Bioscience*, 2013.

Les mésappariements de bases induits entre autres par les 8-oxo-dG et les sites AP sont réparés par le mécanisme de réparation des mésappariements de bases (MMR, pour Mismatch repair) durant lequel les bases incorrectes sont excisées et l'ADN re-synthétisé (pour revue (Jiricny 2006)). Cette voie de réparation comprend des protéines clés telles que MSH2 et MSH6.

Plusieurs études ont démontré que la voie de la réparation par excision de nucléotides (NER) est aussi impliquée dans la réparation des dommages oxydatifs de l'ADN. En effet, cette voie est responsable de la réparation des lésions étendues de l'ADN qui déroulent l'ADN, dues par exemple aux attaques par les rayons UV. La voie NER est subdivisée en deux sous-voies : la voie TC-NER (Transcription-Coupled NER) et la voie GG-NER (Global Genome NER) qui diffèrent uniquement dans la première étape, celle de la reconnaissance de la lésion de l'ADN. En effet, durant le processus de la réparation par la voie NER, la lésion est reconnue, l'ADN est relâché à l'aide du complexe TFIIH et coupé de part et d'autre de la lésion par ERCC1-XPF et XPG, pour enfin laisser la place à la synthèse de l'ADN par une ADN polymérase et la ligation des bouts d'ADN (pour revue (Melis et al. 2013)).

D'autre part, les deux voies de DDR faisant face aux DSB sont la RH (recombinaison homologue) et le NHEJ (jonction d'extrémités non homologues), et le choix du mécanisme de réparation a lieu en fonction de la phase du cycle cellulaire **(Figure 15)**.

En effet, la RH requiert la chromatide sœur et agit exclusivement pendant les phases S et G2. En présence d'une matrice homologue, une résection de 5' en 3' autour de la DSB a lieu, générant des bouts simples brins qui vont envahir l'ADN de la matrice permettant ainsi à l'ADN polymérase de polymériser des nucléotides en copiant l'information génétique portée par la matrice (Moynahan & Jasin 2010). Parmi les protéines cruciales impliquées dans la RH se trouvent BRCA1 (pour Breast cancer type 1) et BRCA2 (pour Breast cancer type 2), gènes décrits comme étant suppresseurs de tumeur et dont la mutation est accompagnée d'une susceptibilité accrue à développer les cancers du sein et des ovaires (Friedenson 2007).

En absence d'une matrice homologue, la voie du NHEJ est favorisée. Cette voie est capable de réparer les DSB tout au long des phases du cycle cellulaire et agit donc plus rapidement que la RH. Une fois les DSB reconnues, des extrémités 3' hydroxyle et 5' phosphate de l'ADN sont rapprochées et liées par une ligase (van Gent & van der Burg 2007). Durant ce processus, une perte ou des modifications de nucléotides peuvent avoir lieu, pour cela le NHEJ est considéré comme une voie de réparation « imparfaite » qui génère des mutations de type insertions ou délétions.

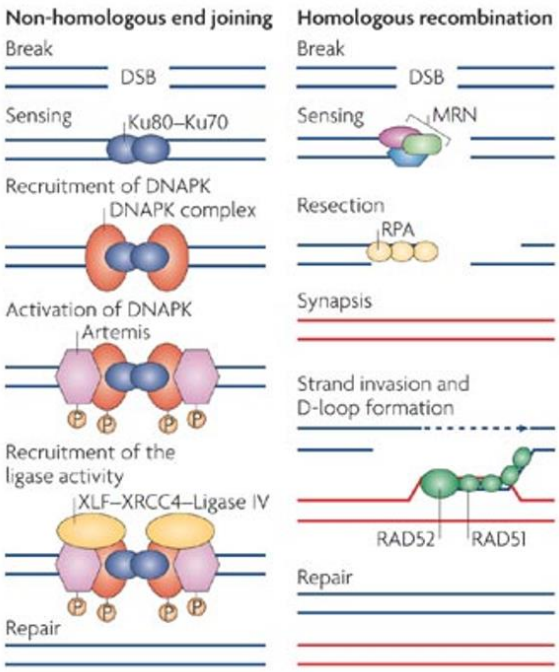


Figure 15. **Les mécanismes de réparation des cassures double brin de l'ADN.** Les étapes du NHEJ (à gauche) consistent à reconnaitre les DSB par l'hétérodimère Ku70/Ku80 qui recrute une protéine-kinase ADN dépendante (DNAPK). Grace à son activité kinase, le complexe DNAPK ainsi formé recrute la nucléase Artemis ainsi que le complexe MRN (MRE11/Rad50/NBS1) (non montré sur la figure). Ces protéines sont responsables du rapprochement des extrémités de l'ADN, suivi de la ligation des bouts 3'hydroxyle et 5'phosphate par le complexe XLF/XRCC4/ADN Ligase IV. Lorsque la cellule dispose d'une matrice homologue, les DSB sont réparés par la voie de la RH (à droite). Le complexe MRN reconnait la DSB par le complexe MRN et entame une résection de 5' en 3' autour de la DSB, générant de part et d'autre des bouts simples brins. La protéine de réplication A (RPA), RAD51 et RAD52 se lient aux bouts simples brins qui envahissent alors la matrice homologue et forment un D-loop. Cela permet à l'ADN polymérase de synthétiser l'ADN en copiant l'information génétique portée par la matrice. D'autres protéines importantes dans les voies du NHEJ et de la RH ne sont pas représentées sur la figure. Figure d'après Misteli et al. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009.

Des processus cellulaires essentiels tels que la transcription et la réplication de l'ADN sont affectés par les lésions de l'ADN ; une réplication qui a lieu en présence de ces lésions contournées génère des mutations et peut par conséquent être le point d'initiation de la carcinogenèse, et une transcription bloquée par les dommages de l'ADN cause la sénescence ou l'apoptose, accélérant ainsi le vieillissement cellulaire (Hoeijmakers 2009). Il est important de noter que les protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, notamment les protéines des voies BER, NER et NHEJ, peuvent être attaquées et leur activité compromise par les ROS, et cela peut être délétère pour la cellule (pour revue (Karran et al. 2016 & Radman et al. 2016)).

Ainsi, toute production excessive de ROS, ou déficience dans le système antioxydant ou même toute modification de l'efficacité de la détection et la réparation de l'ADN affectent le niveau de modifications oxydatives de l'ADN et modulent par conséquent la fréquence des mutations et le cas échéant l'incidence d'un cancer (Epe 2002; Jackson & Loeb 2001). Plusieurs maladies humaines liées à un défaut de la réparation de l'ADN telle que l'anémie de Fanconi, le syndrome de Bloom et *Xeroderma pigmentosum*, sont caractérisées par une déficience dans la réparation de l'ADN (Degan et al. 1995) (pour revue (Hoeijmakers 2009)) et sont susceptibles d'accumuler des dommages à l'ADN provoquant une instabilité génétique.

3.3 Le stress oxydant et l'homéostasie musculaire

La production de ROS est un évènement proéminent durant la contraction musculaire et influence la fonction et la santé du muscle squelettique. Les ROS proviennent de plusieurs sites au sein de la cellule musculaire ; les mitochondries, le réticulum sarcoplasmique, les tubules transverses et le sarcolemme (pour revue (Powers et al. 2011)). Toutefois, la source des ROS peut être extérieure aux cellules musculaires, telle que les cellules phagocytaires, suite à une lésion musculaire.

Longtemps considérés comme toxiques au tissu musculaire, les ROS se sont avérés utiles, à certaines concentrations, dans la régulation physiologique du muscle. En effet les ROS participent et déclenchent des voies de signalisation provoquant des réponses « positives » telles que l'adaptation ou des réponses « négatives » notamment l'endommagement des cellules et la mort cellulaire. Cette dualité accordée aux ROS est principalement dépendante de leur concentration et de leur durée, mais aussi de l'état du système antioxydant et de la capacité cellulaire de réparation de l'ADN **(Figure 16)**.

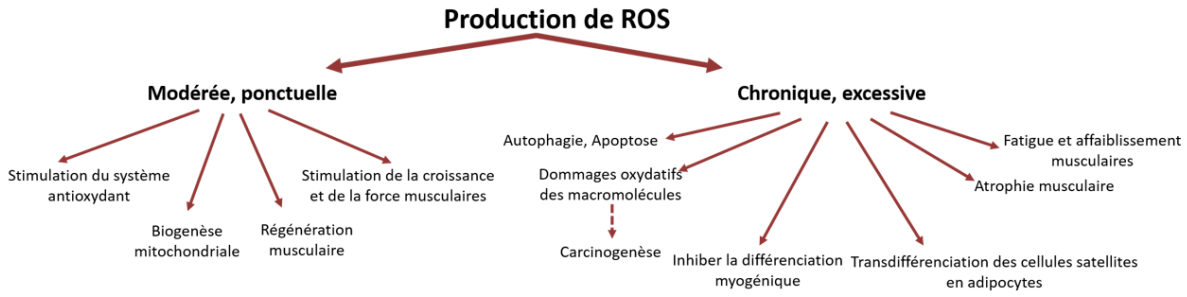


Figure 16. **Les effets cellulaires et tissulaires des ROS.** La quantité de ROS produits et le temps d'exposition induisent définissent les effets cellulaires et tissulaires au niveau du muscle squelettique.

3.3.1 Les rôles physiologiques des ROS dans le muscle squelettique

Lors d'un exercice physique modéré, les ROS produits sont bénéfiques ; Ils agissent en tant que molécules de signalisation et activent plusieurs voies de signalisation dont celle de NF-κB (Nuclear Factor –κB) et AP-1, qui stimulent directement l'expression de plusieurs gènes antioxydants tels que la GPX et la SOD (Gomez-Cabrera et al. 2008). De plus ils stimulent l'expression de IGF-1 (Insulin-like growth factor 1), facteur de croissance crucial pour la croissance musculaire (Barton-Davis et al. 1998). Aussi, les ROS s'avèrent être essentiels à la production de la force musculaire (Reid 2001) et une augmentation modérée de leur concentration musculaire est accompagnée d'une augmentation de la force musculaire (Powers & Jackson 2008). Cette réponse liée aux ROS s'inscrit dans l'adaptation du muscle à l'exercice. Il est important de noter que, suite à une lésion du tissu musculaire, les ROS libérés par les cellules phagocytaires recrutées au niveau d'un muscle endommagé sont importants pour la régénération des fibres musculaires (Tidball 2005).

En outre, les ROS agissent aussi sur la morphologie, la fonction et la biogenèse des mitochondries dans les muscles squelettiques (Irrcher et al. 2009; Musaro et al. 2010), organite essentiel au métabolisme énergétique et à la fonction musculaire. En effet, les ROS produits au-dessus du niveau physiologique suite, par exemple, à un entrainement physique, activent des voies de signalisation (Choi et al. 2008; Kang et al. 2009) menant à l'expression de gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales, de gènes nécessaires à l'activation de la transcription et la réplication de l'ADN mitochondrial (Kelly & Scarpulla 2004), ainsi que des gènes impliqués dans la défense antioxydante mitochondriale (Mn-SOD) et cytosolique (CAT et GPX). Prises ensemble, ces données mettent en évidence un aspect supplémentaire de l'adaptation des muscles squelettiques à la production de ROS, celui du métabolisme énergétique et de la biogenèse mitochondriale**.**

3.3.2 Les effets néfastes du stress oxydant sur le muscle squelettique

Le stress oxydant peut affecter la différenciation myogénique, le plus souvent en réduisant l'efficacité de ce processus. Par exemple, en altérant les mitochondries, organelles nécessaires pour le processus de la différenciation myogénique (Rochard et al. 2000), et en attaquant l'ADN

mitochondrial, les ROS affectent la différenciation et la régénération musculaire. De plus, les ROS peuvent altérer les interactions entre la cellule et la matrice extracellulaire et entre les cellules et inhiber la formation de myotubes (Goichberg et al. 2001; Langen et al. 2002).

Il a été démontré que les muscles âgés produisent plus de ROS et accumulent des dommages oxydatifs qui participent à plusieurs pathologies (Ames et al. 1993; Yu & Chung 2006). Une inactivité musculaire, le plus souvent observée chez les personnes âgées, provoque une production de ROS locale qui peut mener à l'atrophie musculaire (Powers et al. 2005; Powers et al. 2007). Dans le muscle âgé, l'adaptation musculaire antioxydante à la production des ROS est diminuée (Ji 2001). De plus, l'accumulation du fer avec l'âge accélère la production de ROS (Reardon & Allen 2009). Ainsi avec l'âge, les muscles deviennent plus susceptibles aux ROS, ce qui est alors traduit par une augmentation du niveau de la peroxydation lipidique, de l'oxydation protéique et des dommages oxydatifs de l'ADN. La perte de la résistance aux ROS et l'inactivité musculaire dans les muscles âgés pourraient être impliquées, respectivement, dans la progression de l'atteinte musculaire et l'atrophie chez les patients FSHD.

Une forte production de ROS est accompagnée d'une diminution de la force musculaire et d'une fatigue musculaire (Powers & Jackson 2008; Reid 2008).

Les ROS produits en excès peuvent avoir des effets pathologiques sur les mitochondries en induisant leur dysfonctionnement, l'autophagie et l'apoptose (Mammucari & Rizzuto 2010; Marzetti et al. 2010). En effet plusieurs conséquences liées à la surproduction de ROS telles que les dommages oxydatifs à l'ADN mitochondrial, notamment la délétion commune et spécifique d'un fragment de 4977 pb touchant l'ADN mitochondrial ((Liu et al. 2015; Koch et al. 2001; Shoffner et al. 1989)), la fragmentation mitochondriale et l'altération de la conformation des pores de transition de perméabilité mitochondriale facilitant la libération du Cytochrome c déclenchent l'apoptose (pour revue (Circu & Aw 2010)). Le stress oxydant peut aussi favoriser l'autophagie en stimulant la maturation des autophagosomes (Scherz-Shouval et al. 2007), et même la mitophagie (Lemasters 2005). D'une façon intéressante, les ROS mitochondriaux peuvent dévier le destin des cellules satellites en favorisant leur transdifférenciation en adipocytes (Vettor et al. 2009). Cela est probablement impliqué dans le

vieillissement musculaire, et pourrait être une cause expliquant l'envahissement des muscles FSHD par du tissu adipeux.

A part les flux de ROS produits par les cellules musculaires squelettiques elles-mêmes en réponse à plusieurs stimuli internes et externes, les ROS peuvent provenir des cellules non musculaires. En effet, suite à une lésion musculaire suivie d'une inflammation locale, les ROS produits par les cellules inflammatoires participent à la régénération et la réparation du muscle, tandis que la présence constitutive de ROS maintenue par les neutrophiles devient une situation pathologique et promeut les lésions musculaires en endommageant les myoblastes et les myotubes et en ralentissant la régénération musculaire (Tidball 2005).

Enfin, les effets des ROS sur le muscle squelettique, tout comme sur d'autres types cellulaires, ne sont pas « noirs ou blancs » du fait de leur intervention dans plusieurs voies de signalisation et plusieurs processus cellulaires, et de leur dépendance de l'état du muscle (défense antioxydante, habilité à s'adapter au stress oxydant, la présence d'inflammation). Pour cela, il est difficile de fixer une valeur seuil de production de ROS séparant leurs effets bénéfiques de leurs effets néfastes. Pour simplifier, nous pouvons dire que les ROS sont nécessaires à la physiologie du muscle squelettique du fait de leur participation dans plusieurs voies de signalisation menant notamment à l'adaptation musculaire à l'endurance physique par exemple. Cependant, leur production massive ou modérée et continue peut endommager la morphologie et la fonction musculaire. Effectivement, les ROS ont été décrits comme impliqués dans la pathophysiologie de plusieurs pathologies musculaires, dont la DMD (Murphy & Kehrer 1986; Messina et al. 2006; Rodriguez & Tarnopolsky 2003), la dystrophie myotonique (Toscano et al. 2005), la dystrophie LGMD (Haslbeck et al. 2005) et la sarcopénie (Fulle & Fanò 2007). L'effet bénéfique des traitements antioxydants sur la dégénérescence musculaire observée dans des modèles de souris dystrophiques a été démontré (Dorchies et al. 2006; Burdi et al. 2009). Plusieurs aspects de la participation « contradictoire » des ROS dans la physiologie et la physiopathologie du tissu musculaire, décrits dans cette partie, peuvent être extrapolés à la FSHD.

3.4 L'influence des dommages de l'ADN sur la différenciation myogénique et la fonction musculaire

Plusieurs études ont démontré la présence transitoire de cassures de l'ADN lors du processus de la différenciation myogénique *in vitro* et durant la régénération musculaire *in vivo* (Dawson & Lough 1988; Coulton et al. 1992). Ces évènements sont décrits comme étant cruciaux pour le déroulement de la différenciation myogénique et constituent des évènements contrôlés, ciblant et activant notamment des gènes participant dans ce processus tels que *P21* (Larsen et al. 2010). Ainsi, tout comme pour les ROS, les dommages de l'ADN transitoires et contrôlés s'avèrent être « bénéfiques » aux cellules musculaires en participant activement au processus de la différenciation myogénique. Cependant leur sur-abondance n'est pas favorable ni à la différenciation myogénique, ni à la fonction musculaire.

Dans les cellules différenciées post-mitotiques ne répliquant plus l'ADN génomique, telles que les cellules musculaires, les mécanismes de réparation de l'ADN sont globalement atténués, suggérant une diminution de l'efficacité dans l'élimination les dommages de l'ADN qui peuvent survenir. Cependant, la réparation de l'ADN reste active au niveau des gènes activement exprimés dans ces cellules différenciées, ce qui permet de protéger l'intégrité de leurs séquences génomiques et par conséquent la fonction de leurs produits (par exemple les protéines structurales et les enzymes fonctionnelles), ainsi que la structure et le métabolisme cellulaires (Ho & Hanawalt 1991) (pour revue (Nouspikel & Hanawalt 2002)). Ces données suggèrent que les cellules musculaires différenciées, bien qu'elles peuvent accumuler des dommages de l'ADN au cours et après la différenciation myogénique, peuvent au moins maintenir l'intégrité génomique au niveau des gènes activement transcrits et nécessaires à leur fonction.

Les dommages de l'ADN, tout comme le stress oxydant, affectent la différenciation myogénique des cellules musculaires squelettiques. En effet, les dommages de l'ADN accumulés dans les myoblastes suite à un traitement génotoxique inhibent l'expression des gènes spécifiques aux muscles (la myogénine et MHC) et bloquent la formation des myotubes (Puri et al. 2002). Ce « checkpoint de la différenciation » induit par les dommages de l'ADN et décrit par Puri *et coll*. correspondait à l'arrêt du cycle cellulaire des myoblastes en G1 ou en G2 accompagné d'une inhibition de l'expression de *MyoD*, et du blocage de la différenciation myogénique. Cependant, ce blocage est réversible puisque

l'élimination de l'agent génotoxique était accompagnée du rétablissement de la différenciation myogénique *in vitro*. Ce checkpoint de la différenciation retarde donc la reprogrammation génique globale associée à la différenciation myogénique afin de laisser le temps à la réparation de l'ADN et constitue probablement une protection contre l'accumulation des lésions d'ADN dans les myotubes différenciés, qui pourront compromettre l'intégrité génomique des fibres musculaires. Ainsi ces données peuvent suggérer que la capacité régénérative des cellules satellites *in vivo* peut être compromise par la présence de dommages de l'ADN.

D'un autre côté, les mêmes auteurs ont montré que la présence maintenue de dommages de l'ADN par une exposition prolongée et répétée des myoblastes en cours de différenciation à des agents génotoxiques tels que les radiations ionisantes, menait à la formation de myotubes multi-nucléés géants à phénotype déformé (Puri et al. 2002). Ainsi, de ce dépassement du checkpoint de la différenciation découle des myotubes phénotypiquement anormaux, qui peuvent compromettre le remodelage et la fonction musculaire. Ce phénomène pourrait être impliqué dans la formation de myotubes FSHD à phénotype anormal *in vitro*.

D'une façon intéressante, des dommages à l'ADN et des aberrations du nombre de copies chromosomiques sont observés dans les tissus musculaires squelettiques et les cultures de myoblastes primaires de patients atteints de dystrophies musculaires, notamment la DMD et la LGMD, accompagnés d'une accumulation de foci de γH2AX (indicateurs de cassures double brins de l'ADN) suggérant l'activation des mécanismes DDR (Schmidt et al. 2011; Fanzani et al. 2013).

D'autre part, la théorie du vieillissement liée aux dommages de l'ADN fut aussi décrite dans le cadre du vieillissement musculaire chez les souris et chez l'Homme. Suivant cette théorie, le vieillissement serait la conséquence de l'accumulation avec l'âge de dommages à l'ADN non réparés (principalement nucléaires, mais aussi mitochondriaux) qui altèrent sa structure. Ces lésions de l'ADN contribuent directement au vieillissement en perturbant le fonctionnement cellulaire (surtout par la perte de l'expression génique), ou indirectement en induisant l'apoptose ou la sénescence cellulaire (Best 2009; Freitas & De Magalhães 2011). L'accumulation de ces dommages de l'ADN, surtout dans les tissus constitués de cellules non ou peu réplicatives, participe à leur vieillissement (le cerveau par exemple). L'attention est accordée aux dommages oxydatifs de l'ADN, liés aux ROS, qui semblent

être la forme principale de dommages de l'ADN avec l'âge (Ishchenko et al. 2003; Sinha et al. 2014). De nombreuses études ont mis en évidence l'accumulation des dommages oxydatifs de l'ADN nucléaire et mitochondrial dans les muscles squelettiques âgés de souris et de rats (Hamilton et al. 2001; Short et al. 2005) ainsi que chez l'Homme (Mecocci et al. 1999). Plusieurs pathologies sont associées à un vieillissement accéléré (par exemple *Xeroderma pigmentosum*, le syndrome de Werner) et la déficience de la réparation de l'ADN en est la cause (Ariyoshi et al. 2007) (pour revue (Niedernhofer 2008; Best 2009; Hoeijmakers 2009)).

Les dommages de l'ADN accumulés avec l'âge peuvent bloquer la transcription des gènes et ainsi diminuer la synthèse et la dégradation protéiques ; une synthèse atténuée de protéines clés telles que l'actine et la myosine affaiblit la fonction et la force musculaires (Piec et al. 2005; Vermeij et al. 2016). L'ensemble de ces données consolident la théorie du vieillissement liée aux dommages de l'ADN, pouvant toucher l'ensemble des tissus et organes, dont les muscles squelettiques. Dans le cadre de la FSHD, un vieillissement musculaire « accéléré », caractérisé par une atrophie et une fonte musculaires et par l'affaiblissement de la fonction musculaire, pourrait être attribué aux muscles squelettiques affectés par la maladie, surtout chez les patients jeunes sévèrement affectés et contraints de se déplacer à l'aide d'un fauteuil roulant. Cependant, la présence de dommages à l'ADN accumulés dans les cellules des patients n'a jamais été démontrée et fait l'objet du premier objectif de ma thèse.

3.5 Les dommages de l'ADN dans les maladies neuromusculaires

Plusieurs études ont montré la présence de dommages à l'ADN dans des maladies musculaires, ainsi que leur contribution à l'instabilité génétique et la survenue des cancers.

En effet, Schmidt *et coll*. ont révélé une accumulation de foci de γH2AX, indicateurs de cassures double brins de l'ADN, et, avec l'âge, d'aneusomies dans les tissus musculaires et les cultures primaires de myoblastes issus de patients atteints de la dystrophie de Duchenne (DMD) et la dystrophie musculaires des ceintures de type 2B (LGMD2B). Les dommages de l'ADN étaient également détectés dans les muscles non encore atteints d'un fœtus et de jeunes patients DMD et étaient donc considérés comme étant des évènements précoces dans la pathologie (Schmidt et al. 2011). De plus, l'invalidation génétique des gènes responsables des dystrophies musculaires (gène de

la dystrophine pour la DMD, gène de la dysferline pour la LGMD) dans des modèles murins était accompagnée de dommages à l'ADN, d'une accumulation de foci de γH2AX, d'une instabilité génétique marquée par des duplications et des amplifications d'oncogènes, d'une activation de la voie de réponse aux dommages de l'ADN, et enfin d'une susceptibilité accrue à développer des sarcomes (Schmidt et al. 2011).

Par ailleurs, une déficience de la réparation des dommages de l'ADN a été décrite dans la dystrophie musculaire Emery-Dreifuss (causée par la mutation des gènes de l'émérine ou de la lamine A/C), et dans plusieurs laminopathies (causées par des mutations des gènes des lamines). En effet, les mutations touchant le gène de la lamine A/C, gène impliqué dans la réparation de l'ADN et la maintenance de l'intégrité génomique, perturbent les mécanismes de réponse et de réparation des dommages de l'ADN, menant ainsi à une instabilité génomique et à un vieillissement précoce (Liu et al. 2005; Capell & Collins 2006; Camozzi et al. 2014).

Ces caractéristiques communes à certaines dystrophies musculaires suggèrent la participation des dommages de l'ADN et de l'instabilité génétique à la pathophysiologie de ces maladies et à leur susceptibilité de développer des cancers (pour revue (Fanzani et al. 2013)). Mises à part la présence et la potentielle participation des dommages de l'ADN dans les myopathies décrites dans cette partie, leur contribution dans d'autres maladies génétiques telles que la progéria et les syndromes progéroides, maladies à vieillissement accéléré comme le syndrome de Bloom et *Xeroderma pigmentosum*, a été largement étudiée (pour revue (Lattanzi et al. 2012; Vermeij et al. 2016)).

3.6 Les marqueurs du stress oxydant dans la FSHD

La première étude introduisant la notion de stress oxydant dans la FSHD a été celle de Winokur *et coll*. en 2003 qui a démontré la vulnérabilité des myoblastes FSHD face au traitement au Paraquat qui compromettait leur viabilité à des doses plus faibles que les myoblastes normaux (Winokur, Barrett, et al. 2003). Cette différence de viabilité n'était pas observée lors de la différenciation myogénique, suggérant donc que l'hypersensibilité au stress oxydant était un évènement précoce dans la myogenèse FSHD, précédant la différenciation des myoblastes. Parallèlement à cela, une analyse sur puces du profil d'expression génique des myoblastes FSHD a révélé une sous-expression d'un isoforme de la

Glutathion S-transférase (GST-T2) qui catalyse la liaison du glutathion réduit GSH aux composants électrophiles (notamment les produits du stress oxydant). Des résultats similaires furent obtenus cette fois-ci sur des myoblastes primaires issus de biopsies de muscles affectés et non affectés de plusieurs patients FSHD (Barro et al. 2010). En effet une hypersensibilité des myoblastes FSHD au stress oxydant induit par un traitement au H_2O_2 a été démontrée, traduite par une mortalité cellulaire au bout de 24 heures des myoblastes FSHD à partir de 500 µM de H_2O_2, contrairement aux myoblastes normaux dont la viabilité était compromise à partir de 700µM de H_2O_2. Cette hypersensibilité au stress oxydant exogène était similaire dans les myoblastes issus de muscles affectés et non affectés des patients FSHD, suggérant ainsi un mécanisme indépendant de l'atteinte musculaire.

Une étude plus récente a révélé la présence de plusieurs marqueurs du stress oxydant dans des biopsies de muscles squelettiques de patients FSHD, notamment des protéines carbonylées, des lipides peroxydés et une surexpression de plusieurs enzymes antioxydantes (la CAT, la SOD et la glutathion réductase GR) (Turki et al. 2012). L'analyse des échantillons sanguins de ces patients a montré une accumulation du GSSG sous sa forme oxydée, traduite par une diminution du ratio GSH/GSSG, et une production réduite de molécules systémiques antioxydantes telles que la vitamine C.

Le stress oxydant et les dommages de l'ADN peuvent affecter la progression du cycle cellulaire, se traduisant par une diminution de la vitesse de prolifération (Markovic et al. 2007). Plusieurs études traitant la question de la prolifération des myoblastes FSHD ont été effectuées. La vitesse de prolifération des myoblastes FSHD isolés à partir de muscles non-atteints, évaluée à partir du temps de dédoublement des cellules, était équivalente à celle des myoblastes normaux et aucun raccourcissement précoce des télomères, dont la taille est un indicateur de la prolifération cellulaire reflétant la capacité proliférative restante, n'a été observé (Vilquin et al. 2005). En concordance avec cette observation, une autre étude effectuée sur des myoblastes en stade précoce de culture et issues de muscles atteints et non-atteints de plusieurs patients FSHD a démontré une vitesse de prolifération similaire à celle des myoblastes normaux avec un temps de dédoublement de 43 heures en moyenne (Barro et al. 2010). De même, des mésangioblastes en culture, cellules souches adultes d'origine mésodermique (Cossu & Bianco 2003), issus de muscles atteints et non atteints de plusieurs patients

FSHD, proliféraient à la même vitesse que les mésangioblastes issus de muscles d'individus sains (Morosetti et al. 2007).

Encore une fois, les études de l'effet de l'expression de *DUX4* sur des modèles cellulaires en culture ont démontré la présence de plusieurs similarités avec les myoblastes FSHD quant à la sensibilité au stress oxydant et la dérégulation du système de détoxification des ROS (Bosnakovski, Xu, et al. 2008; Sharma et al. 2013). En effet, les cellules C2C12 surexprimant *DUX4* sous-exprimaient la GPX et la GST et étaient hypersensibles au stress oxydant induit par des agents oxydants tels que le Paraquat (Bosnakovski, Xu, et al. 2008).

Un essai clinique récent traitant l'effet d'une supplémentation en antioxydants naturels à des patients FSHD est venu appuyer sur le fait que le stress oxydant contribue à la pathophysiologie de cette myopathie. En effet la supplémentation orale de la vitamine C, la vitamine E, le zinc ou le sélénium à une cohorte de patients FSHD était suivie d'une amélioration de la contraction volontaire maximale ainsi que l'endurance des quadriceps. Toutefois, le test de la marche pendant 2 minutes n'a pas été amélioré suite à ce traitement (Passerieux 2015). Cet essai clinique montre ainsi qu'une supplémentation en antioxydants naturels peut améliorer, à un certain niveau, la fonction musculaire. Tester d'autres doses de ces antioxydants et leurs effets à long-terme sur la fonction musculaire pourraient dévoiler à quel point ce traitement symptomatique est bénéfique aux muscles.

L'ensemble de ces données suggèrent que le stress oxydant est un composant intrinsèque à la FSHD contribuant à sa pathophysiologie. Toutefois la cause initiale de cette perte d'homéostasie redox dans la FSHD, et *in vivo* et *in vitro*, n'est pas encore élucidée. La génétique de la FSHD ne touchant pas un gène spécifiquement lié au stress oxydant, elle ne constitue pas la cause directe du déséquilibre redox. Est-ce que le facteur de transcription DUX4 se lie aux promoteurs des gènes impliqués dans la protection cellulaire des ROS et affecte leur expression, provoquant de ce fait la rupture de l'équilibre redox ? Est-ce que l'inflammation au niveau des muscles des patients FSHD provoque un stress oxydant *in vivo* auquel les muscles se sont adaptés en modifiant l'expression de plusieurs gènes, et que les myoblastes FSHD cultivés *in vitro* en gardent « mémoire » ?

4 Stratégies thérapeutiques de la FSHD : interférence par ARN, transplantation autologue et ingénierie génétique *in vitro*

La complexité génétique de la FSHD rend le développement d'une thérapie ciblée adéquate difficile, faisant de la FSHD une myopathie jusque-là incurable. Des essais cliniques ayant pour but de tester divers traitements pharmacologiques tels que les corticostéroïdes ou l'administration d'un inhibiteur de la myostatine, régulateur négatif de la croissance musculaire, ont échoué. Face à cela, la prise en charge des patients FSHD se limite à l'apaisement de la douleur musculaire et articulaire et de l'inflammation par prise de médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens et le cas échéant d'antidépresseurs, à la kinésithérapie ainsi qu'aux interventions chirurgicales pour notamment fixer la scapula et rétablir la mobilité du bras (pour revue (Tawil 2008)). Maintenir un régime alimentaire sain et une activité physique contrôlée sont aussi recommandés. L'échec du développement d'un modèle animal pré-clinique représentatif de la FSHD limite la possibilité de criblage de molécules et l'application des stratégies d'ingénierie génétique (voir les **Tableaux 1 et 2** récapitulant les modèles animaux actuellement disponibles).

Les avancées technologiques ont toutefois permis l'achèvement de modifications génétiques dans le cadre d'autres myopathies, en particulier la myopathie de Duchenne, selon des protocoles et des approches différents, qui pourraient potentiellement être une source d'inspiration pour les futures applications dans le domaine de la FSHD.

4.1 Les stratégies de thérapies cellulaires et génétiques développées dans le cadre des dystrophies musculaires : principes, applications et limitations

Bou Saada Y*, Dib C*, Lipinski M, Vassetzky Y.S. Genome- and cell-based strategies in therapy of muscular dystrophies. *Biochemistry (Moscow)*. 2016, Vol. 81, No. 7, pp 678-690.

La plupart des dystrophies musculaires font partie des maladies génétiques encore incurables. Cela n'est pas faute de tentatives de développement de stratégies thérapeutiques, mais des maintes limitations jusqu'à maintenant techniquement infranchissables. Dans la revue présentée dans cette

partie, les avancées dans les thérapies cellulaires et génétiques des myopathies, et plus spécifiquement de la myopathie de Duchenne (DMD), sont décrites et commentées.

En effet, la découverte du gène de la dystrophine muté et responsable de la DMD a permis en premier temps de développer des modèles animaux dont le plus connu est le modèle murin *mdx*. Des stratégies de thérapie génique ont été, dans un second temps, élaborées pour introduire le gène de la dystrophine (par l'approche de saut d'exon à l'aide d'oligonucléotides antisens) et de thérapie cellulaire (transplantation de myoblastes ou de cellules souches) et plus récemment l'édition génomique utilisant les nucléases modifiées, et de les appliquer sur les modèles animaux. Toutes ces avancées sont possibles du fait que la DMD, comme la plupart des dystrophies musculaires, est une maladie monogénique dans laquelle la mutation du gène causal altère son expression et/ou la fonction de la protéine résultante.

Les stratégies thérapeutiques de la DMD se sont multipliées suite à la découverte des outils de l'édition génomique, depuis les méganucléases jusqu'au système de CRISPR/Cas9. En effet, ces outils ont la capacité d'induire des coupures double brins spécifiques au niveau de la séquence génomique cible, et sont adaptés pour des stratégies d'invalidation génique (knock-out) et d'introduction de gène d'intérêt (knock-in).

Dans le cadre de la FSHD, la recherche translationnelle n'est pas aussi évidente que celle de la DMD, du fait de la complexité génétique, du manque de compréhension totale de la pathogenèse de la maladie et par conséquent du manque d'un modèle animal adéquat. L'espoir n'est tout de même pas perdu surtout avec la facilité de la conception et de l'utilisation des outils de l'édition génomique qui a récemment permis le développement de stratégies d'édition génomique « multiplexe » (Cong et al. 2013), dont une pour la DMD (Ousterout et al. 2015), ouvrant ainsi la voie vers une possibilité de correction multigénique qui pourrait s'avérer intéressante pour la FSHD.

Toutefois, ces réussites se heurtent souvent à des limitations majeures, notamment la faible fréquence de coupure au niveau du site cible et le risque de mutations « off-targets » non spécifiques dans d'autres endroits du génome pouvant être dangereuses, remettant ainsi en question l'application clinique des stratégies d'édition génomique actuelles (Liang et al. 2015).

ISSN 0006-2979, Biochemistry (Moscow), 2016, Vol. 81, No. 7, pp. 678-690. © Pleiades Publishing, Ltd., 2016.
Published in Russian in Biokhimiya, 2016, Vol. 81, No. 7, pp. 899-914.

REVIEW

Genome- and Cell-Based Strategies in Therapy of Muscular Dystrophies

Y. B. Saada[1#], Carla Dib[1#], M. Lipinski[1], and Y. S. Vassetzky[1,2*]

[1]*UMR 8126, CNRS, Université Paris-Sud, Université Paris Saclay, Institut de Cancérologie Gustave-Roussy, F-94805 Villejuif, France; E-mail: vassetzky@igr.fr*
[2]*Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

Received February 24, 2016
Revision received April 4, 2016

Abstract—Muscular dystrophies are a group of heterogeneous genetic disorders characterized by progressive loss of skeletal muscle mass. Depending on the muscular dystrophy, the muscle weakness varies in degree of severity. The majority of myopathies are due to genetic events leading to a loss of function of key genes involved in muscle function. Although there is until now no curative treatment to stop the progression of most myopathies, a significant number of experimental gene- and cell-based strategies and approaches have been and are being tested *in vitro* and in animal models, aiming to restore gene function. Genome editing using programmable endonucleases is a powerful tool for modifying target genome sequences and has been extensively used over the last decade to correct *in vitro* genetic defects of many single-gene diseases. By inducing double-strand breaks (DSBs), the engineered endonucleases specifically target chosen sequences. These DSBs are spontaneously repaired either by homologous recombination in the presence of a sequence template, or by nonhomologous-end joining error prone repair. In this review, we highlight recent developments and challenges for genome-editing based strategies that hold great promise for muscular dystrophies and regenerative medicine.

DOI: 10.1134/S000629791607004X

Key words: muscular dystrophies, gene editing, cell therapy

Many genetic diseases still do not have curative therapies. Hence, genome editing as a novel strategy is a must to improve therapeutic implications. Genome editing utilizes engineered nucleases to discard, substitute, or incorporate DNA into a genome. Cells can be repaired *ex vivo* and then delivered into the body, or repaired *in vivo* where genes can be changed in cells still in the body. The repair is based on two steps: (i) introducing a double-strand break (DSB) in the desired location in the genome by nucleases; (ii) repairing the DSB making use of the cellular DNA repair machinery.

INTRODUCTION OF SITE-SPECIFIC DOUBLE-STRAND BREAKS

Engineered nucleases are now divided into four classes: meganucleases, zinc finger nucleases (ZFNs), transcription activator-like effector nucleases (TALENs), and the CRISPR/Cas system (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated nucleases).

Meganucleases have been found in bacteria, eukaryotes, and Archaea [1]. These homing endonucleases (HEs) generate DNA DSBs at a determined locus using their sizeable cut domain (14-40 bp) [2]. Meganucleases are characterized by a strict DNA sequence identification, which makes them less toxic than other endonucleases like ZFNs. Despite the high number of discovered HEs, they

Abbreviations: Cas, CRISPR-associated nucleases; CMD, congenital muscular dystrophy; CRISPR, clustered regularly interspaced short palindromic repeats; crRNA, mature CRISPR RNA; DMD, Duchenne muscular dystrophy; DSB, double-strand break; FSHD, facioscapulohumeral muscular dystrophy; HDR, homology directed repair; INDEL, insertion or deletion; iPSC, induced pluripotent stem cells; NHEJ, nonhomologous end joining; ODN, oligodeoxynucleotide; PAM, protospacer adjacent motif; PNA, peptide nucleic acids; rAAV, recombinant adeno-associated virus; RVD, repeat-variable diresidues; TALEN, transcription activator-like effector nuclease; tracrRNA, transactivating crRNA; ZFN, zinc finger nuclease; ZFP, zinc-finger protein.

# These authors contributed equally to this work.
* To whom correspondence should be addressed.

are sequence specific-endonucleases and unable to complement all the variety of genome sequences, which decreases the chance of finding an analogous locus in a target gene. This led many researchers to engineer specific endonucleases using mutagenesis and high-throughput screening methods [3, 4]; however, creating HEs for all genome sequences is costly and time consuming. Moreover, chromatin structure strongly influences access to its recognition sites [5]. Indeed, the efficacy of 42 newly generated nucleases at targeted mutagenesis was not correlated with their activity in transiently transfected cells, suggesting that epigenetic mechanisms control the efficacy of genome editing [3].

Zinc finger nucleases result from the fusion of zinc-finger proteins (ZFPs) to the FokI nuclease cleavage domain [6]. FokI is a bacterial enzyme that contains two domains: the first ensures the binding to DNA, and the second catalyzes cleavage. The FokI cleavage site requires dimerization [7, 8] and the binding of the endonuclease to the DNA to cut it upstream from the recognition site, without additional sequence particularity [9]. Since FokI is a nonspecific nuclease, engineering of ZFNs that are able to target specific sites in the genome is totally determined by the efficacy of the created ZFPs.

The ZF (zinc finger) motif contains ~30 a.a. that form a ββα structure; the α-helix insures the DNA binding of ZF motifs via its insertion to the major DNA groove [10]. Theoretically, each "finger" binds to three nucleotides. Six amino acids of each ZF motif play a main role in the specific recognition of the DNA target sequence [10-12]. Therefore, to create ZF motifs, these amino acid residues can be changed, while the rest can be kept as a backbone [13, 14]. The binding of two ZFN "arms" to the analogous DNA sequence permits FokI activation by dimerization. Studies have demonstrated a lack of specificity of ZFNs. In fact, engineered ZFNs were able to cut into a trinucleotide repeat region by a simple homodimerization using just one ZFN "arm" [15-17]. To avoid the possibility of undesirable homodimer activity and to reduce occurrences of genome-wide off-target cleavage, new ZFs with four fingers instead of three and a new FokI architecture, which only functions as an obligate heterodimer, have been engineered [18].

Similarly to ZFNs, TALENs are based on a nonspecific DNA cutting enzyme, the FokI nuclease domain, linked to transcription activator-like effectors (TALEs), a precise DNA sequence identifying amino acids [19]. TALEs have been found in the plant pathogen *Xanthomonas* [20]. Their DNA-binding domain is constituted of several repeats of ~34 a.a.; these repeats are identical for all the residues except the 12th and 13th ones, which are variable in each repeat. Studies have decoded a correlation between the repeat-variable diresidues (RVD) sequence and target DNA bases. In fact, each RVD recognizes more or less specifically the four DNA bases [21, 22]. The TALE-repeat models constitute a benefit to theses nucleases, and they permit the designing of a large number of specific proteins by simply changing the repeats combinations.

In TALEN also, two arms should bind to the DNA target sequence to enable FokI catalyzing domain dimerization, and thus its activation. Although ZFNs and TALENs are comparable on the nuclease level, they have distinct peptide sequences and consequently different DNA recognition interactions. Each TALE DNA-binding domain recognizes one nucleotide, whereas ZFNs interact with trinucleotides, which makes it a more complex recognition. These two technologies can be used in a variety of organisms: ZFN and TALEN modifications have been used in yeast [23, 24], zebrafish [25, 26], fruit flies [27, 28], plants [29, 30], rats [31, 32], and in human cells [33-36].

The latest developed genome editing technology is the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) and CRISPR-associated nuclease (Cas) system. CRISPR/Cas, discovered in bacteria and Archaea [37], is a form of acquired immunity that grants to prokaryotes the ability for defense against any foreign DNA [38-40]. The three CRISPR systems discovered to date are designated as type I, II, and III [41].

Type II, referred to as CRISPR, is the fundamental system for current genome-editing technology. It consists of a nuclease (Cas9) and two RNA molecules: a mature CRISPR RNA (crRNA) and a transactivating crRNA (tracrRNA) that couples with crRNA [42]. The crRNA targeting sequences are transcribed from DNA sequences known as protospacers [43]. Protospacers are short sequences (~20 bp) of previously encountered foreign DNA, separated by a short palindromic repeat and kept to confer protection against other possible invaders [44, 45]. These protospacers are clustered in the bacterial genome in a group called a CRISPR array. This array is transcribed into a long RNA precursor that is processed by the bacterial ribonuclease RNase III [46]. This produces short mature crRNA, each analogous to a specific foreign sequence [47, 48]. In fact, it is the tracrRNA hybridization to the short palindromic repeat that activates RNase III [46].

Later on, the CRSIPR system was modified by fusing both RNAs (crRNA and tracrRNA) into a single chimeric guide RNA (sgRNA or gRNA) executing both functions [49]. However, this genome engineering system has a critical limitation in application. Every potential genomic target sequence must have a short nucleotide sequence, termed a protospacer adjacent motif (PAM), on its 3′-end [49-52]. This condition makes the type II CRISPR system restricted to target sequences followed by NGG, the PAM sequence.

One of the most important advantages of CRISPR/Cas9 over the nuclease families mentioned above is the extreme simplicity of designing it, as only 20 nucleotides recognizing the targeted region need to be synthesized. Veres et al. showed that Cas9 has much high-

er efficacy than TALEN in a study where the *SORT1* human gene was targeted by both genome editing tools in human stem cells. Still, a very low number of unwanted mutations have been shown for both of the engineered nucleases [53].

DOUBLE-STRAND BREAKS AND THEIR REPAIR

Once the nuclease has created a DSB in the genome, cells employ two main mechanisms to repair it: nonhomologous end joining (NHEJ) and homology directed repair (HDR). NHEJ by directly joining the DNA ends in a DSB causes deletions and/or insertions at the target site. It was shown responsible for mutations in 50% of DSB at the repair site in mycobacteria [54]. NHEJ may also generate dangerous chromosomal translocations (reviewed in [55]). However, HDR can be exploited to limit sequence changes by introducing an exogenous template that includes the desired sequence change into the same cell along with the nuclease, and this DNA template will trigger HDR-specific and precise modifications at the targeted locus.

MUSCULAR DYSTROPHIES

Myopathies can be either genetically inherited or occur because of endocrine defects, inflammation, or other abnormalities. Some are classified as single gene disorders, and they are the most amenable to gene therapy among other genetic disease categories.

Muscular dystrophies (MDs) constitute a class of myopathies that occur by mutations affecting genes having a critical role in skeletal muscle. These gene alterations are often the origin of skeletal muscle loss and weakness.

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a severe inherited disorder triggered by mutations of a gene that codes for dystrophin [56]. These mutations can also occur in a sporadic way, constituting a third of cases [57, 58]. Dystrophin has an important role as it links the muscle cell cytoskeleton to the adjacent extracellular matrix [59]. Men are predominantly affected in DMD because it is an X-linked recessive disease.

The dystrophin gene is also affected in Becker muscular dystrophy (BMD), but in this disorder the mutated gene generates a shortened protein that is still partially functional, which makes BMD a less grave disorder than DMD [60]. Dystrophin is a component of a protein complex. Alterations affecting genes encoding components of this dystrophin–glycoprotein complex generate congenital muscular dystrophy (CMD) and limb-girdle muscular dystrophies.

Many types of congenital muscular dystrophies (CMD) probably arise due to alterations in α-dystroglycan glycosylation, which is a component of the dystrophin complex. This complex has a crucial role in transmembrane linkage between muscle cell cytoskeleton and the basal lamina [61]. Different types of CMDs are classified based on the defects occurring in these disorders. They could be alterations of glycosylation, mutations of genes encoding for structural muscular proteins, or the endoplasmic reticulum proteins and mitochondrial membrane proteins [62, 63].

Myotonic dystrophy (DM) is an autosomal-dominant disorder characterized by multisystemic clinical features. Two types of this myopathy, DM1, termed Steinert's disease, and DM2 result from expansion of trinucleotide repeats. In the first type, the alteration occurs in the *DMPK* gene [64] that maps to the long arm of chromosome 19 [65]. The *DMPK* gene encodes a protein expressed mainly in skeletal muscles [66]. Whereas in proximal myotonic myopathy (PROMM), the DM2 type, it is the *ZNF9* (zinc finger protein 9) gene on chromosome 3 that is affected [67]. Both DM types have similarities in clinical symptoms such as diabetes, muscular weakness, and cardiac failure [68, 69].

Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) is an autosomal dominant neuromuscular disease with prevalence that can reach 1 in 8000 [70]. Clinically, FSHD is characterized by a progressive weakness and atrophy of facial muscles and the shoulder girdle. The major genetic form of FSHD has been mapped to the subtelomeric region of the long arm of chromosome 4 [71]. In this region, three abnormalities have been specifically associated with FSHD: a partial deletion within D4Z4, a polymorphic macrosatellite repeat array; the presence of SSLP-161, a specific simple sequence length polymorphism; and that of the 4qA allele [72]. This three-feature combination causes chromatin organization modification in the 4q35 chromosomal region in FSHD patients [73-76], which releases the inhibition otherwise imposed on the expression of *DUX4*, a gene contained in the D4Z4 repeat. This change in chromatin organization possibly also leads to the overexpression of *ANT1*, *FRG1*, *DUX4c*, and *FRG2*, five genes positioned centromerically to D4Z4, and each has been implicated in FSHD [77-80].

Other disorders classified as muscular dystrophies subgroups like distal muscular dystrophy (DMD) [81], Emery–Dreifuss muscular dystrophy (EDMD) [82], limb-girdle muscular dystrophy (LGMD) [83], and oculopharyngeal muscular dystrophy (OMD) [84] also arise due to gene defects.

DEFINITIONS OF GENE AND CELLULAR THERAPIES

Many strategies of gene therapy have been tested trying to modify expression of genes of interest to trigger

alterations of certain biological functions. Gene therapy, initially devised by Friedmann and Roblin in 1972 [85], is defined as the delivery of nucleic acids, including DNA, RNA, and their analogs to cells of a living organism to treat diseases via the use of viral, nonviral, or cell-based vectors.

Cell therapy is a form of gene therapy itself, if a functional gene of natural or exogenous origins is delivered using cells as vectors. In fact, cell therapy is based on the delivery of precursor cells that are supposed to regenerate muscle fibers in myopathies.

GENE AND CELLULAR THERAPY IN MUSCULAR DYSTROPHIES

So far, there is no cure for most muscular dystrophies, but some gene and cellular therapy methods have been explored to treat different types of MDs to express a defective gene or inhibit the expression of a faulty gene.

In Duchenne muscular dystrophy (DMD), the patients lack dystrophin, so the main goal of its therapy is to express this crucial muscle protein. One approach that has been exploited by researchers consists of using molecules that prompt exon skipping. Patients with DMD caused by RNA reading frame mutations have shown clinical improvement using these antisense oligonucleotides. With this approach, a shortened but more functional dystrophin protein is produced [86, 87]. Other antisense oligonucleotides have been evaluated and showed some dystrophin expression repair in patients' muscles (NCT01803412, NCT02255552).

Recombinant adeno-associated viruses (rAAVs) have also been investigated for gene addition in DMD animal models. rAAVs have the promoter/transgene of interest bordered by the viral inverted terminal repeats (ITRs) and all viral genes discarded. Even though rAAV vectors have demonstrated limited immunogenicity in small animal studies, it has been shown that they can elicit variable immunological outcomes in large animal models [88, 89]. However, transient immunosuppression effect has been evaluated in canine models and demonstrated micro-dystrophin expression for several months [90, 91]. rAAV8 vector systemic and intramuscular delivery allowed robust dystrophin expression in muscles of macaque models, although the outcome efficiency was affected by preexisting AAV8 antibodies [92].

In a rAAV trial for DMD, patients received AAV2.5 CMV microdystrophin to avoid preexisting antibodies. AAV2.5 is a variant of AAV2 that retains the properties of easy purification from AAV2 and improvement in transduction efficiency in muscle from AAV1. Nevertheless, patients who had preexisting immunity to AAV2 and were able to neutralize rAAV2.5 showed fewer detected vector genomes than other patients did. Moreover, dystrophin-specific T-cells were detected in four patients; this may provide an explanation for the low detected levels of dystrophin expression [93].

In mdx mice (a mouse model of DMD), promising work has been done: intramuscular delivery of normal mouse donor myoblasts converted dystrophic mdx myofibers from dystrophin-negative to dystrophin-positive [94], but clinical trials of transplantation of myoblasts in DMD patients have shown discouraging results [95-97]. They failed to provide the patients any sustained clinical benefit for several reasons, including low survival and migration from the injection site of grafted myoblasts and immunological rejection by the host [98]. The objective was then to find a cell that harbors myogenic potential, can be systemically delivered, and functionally reconstitute the muscle stem cell niche to provide long-term production of dystrophin-positive muscle fibers. Pericytes seem to be the most promising cell type for DMD cell therapy. Delvalle et al. showed that human muscle-derived pericytes promote significant muscle regeneration in immunodeficient, dystrophin-deficient mice (SCID mdx) [99].

A gene therapy trial for limb-girdle muscular dystrophy type 2D (LGMD2D) was carried out in the US by Professor Jerry Mendell. In this trial, an adeno-associated viral vectors (AAV1) virus containing a functional α-sarcoglycan gene, which is affected in this myopathy, was injected into a muscle in the patients' feet. The injected muscles generated the alpha-sarcoglycan protein in many muscle fibers [100] without evidence of cytotoxicity. These findings are very promising, but systemic delivery of the healthy gene copy is required for improvement in symptoms to be seen in patients. Liu et al. carried out a preclinical trial in LGMD1A mice targeting mutant myotilin (MYOT), the principal cause of LGMD type 1A [101]. Therapeutic microRNAs containing AAV6 that were used reduced significantly the level of altered myotilin mRNA and the respective generated protein [102].

Based on the consensus model of facioscapulohumeral dystrophy pathophysiology, most of the proposed therapeutic approaches aim to repress the *DUX4* gene by targeting DUX4 mRNA, DUX4 protein, or DUX4-induced processes implicated in FSHD. Wallace et al. adopted a gene silencing approach utilizing RNA molecules that inhibited *DUX4*. This led to correction of DUX4-associated-myopathy in mouse muscle [103]. Even in mice over-expressing FSHD region gene 1 (FRG1), the RNA interference approach demonstrated amelioration in myopathic phenotypes [104, 105].

GENOME EDITING IN MYOPATHIES

Duchenne muscular dystrophy. DMD is the most common myopathy and one of the most recessive disorders in the human population, with incidence of 1 : 5000

[106]. DMD is a recessive X-linked disorder with symptoms appearing in boys at the age of approximately four. It is characterized by progressive muscle wasting and weakness, most DMD patients becoming wheelchair-dependent and ventilation-assisted. Due to its aggressiveness, DMD is lethal, and death occurs between the second and fourth decade of life. The dystrophin (*DMD*) gene was mapped to the short arm of the X-chromosome (RefSeq NG_012232.1); the locus covering approximately 1% of the X-chromosome is large and is thus subject to deletion mutations predominantly (65%) or duplications (11%) and to a lesser extent for mutations affecting the coding sequence and splice sites. The resulting out-of-frame mutations or nonsense mutations found in DMD patients result in prematurely truncated and nonfunctional dystrophin protein [107].

Efforts have been made to develop animal models carrying the genetic mutation associated with DMD and recapitulating the disease pathophysiology; more than 60 dystrophin-deficient animal models have been developed including rodent models [108-112], canine models [113, 114], a porcine model [115], and non-mammalian models such as *dmDys Drosophila* [116], zebrafish [117], and *Caenorhabditis elegans* [118].

Several therapeutic approaches have been extensively investigated, from cellular and stem cell therapies to pharmacological strategies and gene therapy. Currently, stem cell therapy studies are challenging and are being optimized to ameliorate the stem cell isolation, culture, and delivery on one hand, and to improve muscle quality and environment on the other hand. Dystrophin-based gene therapies consist of the addition of the dystrophin gene. Due to difficulties regarding the delivery of the large-sized dystrophin gene into myogenic cells and with the discovery and development of genome editing tools, a new era of gene therapy for DMD was opened, and the possibility of permanently correcting the *DMD* gene became viable.

Genome editing for DMD using single-stranded oligonucleotides. A number of strategies have focused on editing the dystrophin gene. Notably, Bertoni et al. employed an oligonucleotide-mediated genome repair strategy where an oligonucleotide vector containing single base-pair alterations specifically targeting the genome sequence of interest, creating a mismatch that is then repaired by the endogenous DNA repair mechanisms with the probability of single-base changes in the dystrophin gene sequence [119]. By using chimeric RNA/DNA oligonucleotides (RDOs) and oligodeoxynucleotides (ODNs), point mutations were successfully corrected in *in vitro* and *in vivo* studies. Later Maguire et al. repeated the correction of the dystrophin gene by means of modified single-stranded oligonucleotides coupled with an RNAi against an inhibitor of gene repair, Msh2, which increased the level of gene repair in myoblasts [120]. In another approach, Kayali et al. designed single-stranded ODNs made of peptide nucleic acids (PNAs) bases that are DNA mimics having a stronger binding affinity to DNA than that of DNA–DNA interaction. These PNA-ssODNs harboring single mismatches were able to induce stable alterations in the dystrophin gene and to subsequently restore dystrophin protein expression *in vitro* and *in vivo* [121]. All these studies focused on correcting muscle cells *in vitro* and correction of mature myofibers in treated mice. These approaches were not able to provide long-term dystrophin expression; it was not sufficient to protect muscles from degeneration. To overcome this limitation, PNA-ssODNs targeting the dystrophin gene were later successfully tested on satellite cells isolated from a DMD mouse, and when transplanted into skeletal muscle of dystrophin-deficient mice, the corrected-satellite cells had long-term ability to restore dystrophin expression in myofibers [122].

Genome editing for DMD: from meganucleases to CRISPR-Cas9 technologies. Many scientists have focused particularly on DMD as a model for myopathies associated with single-gene mutations and loss of function. By inducing site-specific double-strand breaks (DSBs), endonucleases increase the rate of homologous recombination (HR) up to 10,000-fold *in vitro* [123, 124]; thus, several gene correction modes can be considered: gene correction by insertion of the correct sequence (template), induction of exon skipping by introducing mutations at splice sites, and removal of exons [125, 126].

Rousseau et al. tested the relevance of using meganucleases and zinc-finger nucleases for targeting and introducing INDELs (insertions or deletions) in different introns and in exon 50 of the dystrophin gene [127]. The mutations frequency was 10- and 300-fold more abundant in 293T cells transfected with dystrophin-targeting meganucleases and ZFNs, respectively, as compared to mock-transfected cells. They were also tested on human primary myoblasts, and ZFNs induced 30 times more INDELs than mock-transfected myoblasts. Interestingly, the rate of INDELs was increased when ZFN-transfected primary myoblasts were induced to differentiate into myotubes, which triggers the expression of the dystrophin gene. In this study, Rousseau et al. were able, by means of meganucleases and ZFNs, to induce INDELs by triggering NHEJ-based DSB repair, with some of these INDELs indirectly changing the reading frame of the dystrophin gene. Although the efficiency was low, these promising results created solid ground for further utilization of genome editing tools for optimizations and experiments.

In 2013 Ousterout et al. investigated the use of TALENs to restore the reading frame of the dystrophin gene by introducing INDELs into exon 51 and inducing frameshifting by TALEN-mediated NHEJ in human immortalized DMD cells [128]. They successfully isolated clonal populations of myoblasts harboring corrected dystrophin gene and producing, once differentiated, the dystrophin protein. Interestingly, the introduction of

TALEN in DMD patient-derived primary dermal fibroblasts carrying exon 46-50 deletion efficiently led to gene modification and frameshifting, and when these corrected dermal fibroblasts were induced to transdifferentiate into the myogenic lineage, the expression of dystrophin was rescued, similarly to corrected human immortalized DMD myoblasts. This approach could be interesting for cell-based therapies since MyoD-transduced dermal fibroblasts are investigated for *ex vivo* gene therapy of other myopathies [129].

Later, a study from Dickson's team proved for the first time the feasibility of meganuclease-dependent knock-in for correcting the dystrophin gene in *in vitro*-cultured human DMD myoblasts [130]. This study focused on targeting intron 44 of the dystrophin gene in human DMD myoblasts carrying exon 45-52 deletion (del45-52 DMD cells), since 25% of the mutations causing DMD arise from this intron. Specific I-CreI-meganuclease and repair template with long arms of homology were designed and cloned into lentiviral vectors. The meganucleases successfully induced a DSB at the specific target site on intron 44 in del45-52 DMD myoblasts, and when the cells were co-transduced with the lentiviral vector containing the repair matrix, they successfully produced a corrected dystrophin transcript harboring exon 45-52 cDNA. This successful knock-in approach based on specific homologous recombination proved the feasibility of this genome editing strategy applied on *in vitro* primary DMD myoblasts, the dystrophin gene being permanently corrected, but the production of dystrophin protein remained to be verified.

Another genome editing strategy was then described by Ousterout et al. [126] that is aimed at permanently skipping exon 51 and restoring the reading frame of dystrophin gene, similar to the oligonucleotide-mediated exon skipping approach, which concerns around 13% of all DMD deletions. In this study, a pair of ZFNs was designed to target two sites flanking the exon 51 splice acceptor sequence, thus to permanently delete exon 51 from the mRNA transcript in DMD myoblasts. Instead of introducing random INDELs leading to unpredictable changes in the final protein, this strategy has the advantage of introducing specific and nonrandom INDELs by the means of two ZFNs, resulting in the loss of exon 51 and precise and reproducible frameshifts. Thus, these nonrandom events result in a predictable function of derived-dystrophin transcript. Indeed, transplantation of these genetically corrected DMD myoblasts into immunodeficient mice led to dystrophin expression at the sarcolemma membrane of muscle cells.

With the validation of TALENs and CRISPR-Cas9 effectiveness for gene correction in human induced pluripotent stem cells (iPSCs), Li et al. conducted a study for targeting and correcting dystrophin gene mutation in DMD in iPSCs [125]. The advantage for working on iPSCs is their unlimited self-renewal capacity and their ability to differentiate into myoblasts, which offer a good model for eventual autologous transplantation. They authors generated iPSCs derived from a DMD patient lacking exon 44 and applied three different approaches for restoring the dystrophin protein using their own designed TALENs and CRISPR-Cas9: exon 45 skipping, frameshifting by small INDELs, and exon 44 knock-in. All three approaches worked successfully on patient-derived iPSCs with both TALENs and CRISPR-Cas9, with no severe off-target mutagenesis. By differentiating corrected iPSC clones into skeletal muscle cells, the dystrophin protein expression was restored, with restoration of the full amino acid sequence of dystrophin only in knocked-in clones.

With the emergence and expansion of CRISPR-Cas9 in the field of genome editing, Ousterout et al. took advantage of the multiplex gene editing capability and facility of this system to target multiple genes simultaneously [131, 132]. They successfully targeted exons 45-55 of the dystrophin gene and induced frameshifts and large deletions covering common mutational hotspots found in more than 60% of all DMD patients [133]. First, they used a multiplex CRISPR-Cas9 system to delete exon 51 in DMD myoblasts by introducing Cas9 along with two sgRNAs flanking exon 51; this genomic deletion restored dystrophin expression at the RNA and protein levels in differentiated corrected-myoblasts. In a second approach, Ousterout et al. focused on creating a multiplexing CRISPR-Cas9 system in which exons 45-55, a region containing more than 60% of DMD patients' mutations, are entirely deleted. Interestingly, this multiplexing system led to a large genomic deletion of 336 kb, excluding exons 45-55 region, and it was accompanied by restored dystrophin mRNA and protein expression. Although a major concern of this approach is the increased probability of chromosomal rearrangements due to the multiple induced DSBs, this single genome editing strategy offers a solid ground for gene therapy applicable for hereditary diseases with single- or multiple-mutations.

The first use of the CRISPR-Cas9 editing system in the germline of *mdx* mice was recently described [134]. To rescue respiratory, cardiac, and skeletal muscles and to encounter challenges regarding *in vivo* delivery systems, Long et al. demonstrated the feasibility of genetic repair in the germline of dystrophin-deficient mice by co-injecting Cas9, sgRNA, and a repair-template into mouse zygotes, hoping to correct dystrophin mutation in all cells of a *mdx* mouse harboring a nonsense mutation in exon 23. This strategy resulted in a wide range of genetically mosaic mice containing 2 to 100% correction of the dystrophin gene, since genome editing can occur in a subset of embryonic stem cells. Interestingly, only 17% of gene correction is sufficient to obtain a level of dystrophin expression in myofibers similar to that of wild-type mice, and to prevent muscular dystrophy.

More recently, three research teams simultaneously tested the CRISPR-Cas9 genome editing system on a

postnatal mouse model of DMD; the dystrophin reading frame was rescued, and dystrophin protein expression was restored in cardiac and skeletal muscle after the delivery of AAV9 carrying gene editing components into postnatal *mdx* mice. Dystrophin expression increased with time and was accompanied with enhanced skeletal muscle function [135-137].

These studies demonstrated the large and variable options scientists have when manipulating genome editing tools. Endonucleases can be designed to specifically target every mutation causing DMD, thus giving hope to correct all forms of DMD. The majority of studies focused on proving the feasibility of genome editing primarily for treating DMD. Genome editing tools are driving innovative applications from basic biology to medicine, and advances in correcting genetic defects of other dystrophies have been made.

Genome editing in other dystrophies. *Spinal muscular atrophy* (SMA) is an autosomal recessive genetic disease originating from alteration of the survival motor neuron 1 (*SMN1*) gene, resulting in progressive loss of motor neurons and progressive muscle wasting characteristic of SMA patients. To recover motor neuron loss, an ssODN targeting the *SMN2* gene, a gene paralog to *SMN1*, was able to redirect its splicing. Thus, the resulting protein is similar to SMN1 and is able to partially rescue motor neuron loss and to ameliorate defects in neuromuscular function in a SMA mouse model [138].

Facioscapulohumeral dystrophy. In vertebrates, the muscle differentiation process is highly regulated and is activated when muscle tissue damage occurs. This requires proliferation and fusion of muscle satellite cells and implies the coordination and regulation of several pathways by MyoD, Myf5, and specific miRNAs expression [139].

Myoblasts from FSHD patients exhibit defects in their morphological differentiation. Unlike normal myoblasts that fuse and form branched myotubes with aligned nuclei, FSHD myotubes are either atrophic, or disorganized with a random distribution of nuclei [140]. A recent study from our laboratory successfully tested the feasibility of cell therapy in FSHD by correcting these defects at the morphological and functional levels by adding normal myoblasts in the FSHD cell culture in different proportions, and inducing myogenic differentiation *in vitro*. The number of hybrid myotubes with normal phenotype was directly linked to the amount of normal myoblasts initially present in the myoblast mix. The presence of >50% of normal myoblasts led to hybrid myotubes mostly with normal phenotype. We also observed the normalization of the transcription profile of the hybrid myotubes [141].

A recent work reported the use of the nuclease-deficient CRISPR-dCas9 system to target and manipulate gene expression in *in vitro* cultured myocytes derived from FSHD patients. The catalytically inactive dCas9 does not generate double-strand breaks, but it can be fused to transcriptional regulators that can be therefore brought to the target locus. Targeting transcriptional effectors fused to CRISPR-dCas9 to the DUX4 promoter resulted in enhanced chromatin repression of the FSHD pathogenic locus and a decrease in DUX4 expression [142].

GENOME EDITING IN MYOPATHIES: LIMITATIONS AND CHALLENGES

Although proof-of-concepts and encouraging results have been obtained with genome editing tools studied on *in vitro* systems and animal models, several limitations still have to be overcome before genome editing can be applied in the context of clinical applications. Whether correcting genetic mutations *ex vivo* or specific cell type *in situ* remains the major question. The most challenging hurdles that need to be addressed are the limited level of gene editing frequencies, the risk of off-target mutations, the use of viral vectors to carry nucleases, the choice of an appropriate cell type in case of cell therapy, and the mode of delivery into the organism.

PERSPECTIVES

To date, the most promising and safest strategy is to correct the patient's muscle stem cells *ex vivo*. Although optimizing culture techniques to maintain their regenerative potential, characterization of their stem-cell properties and regulations, and additional parameters are prerequisite for using muscle stem cells for clinical applications, several discoveries and trials during the past decade have achieved great advances in the field of genome editing strategies in muscle stem cells.

Gene-editing technologies hold great promise for improving human health as they can be used to investigate new gene functions and regulations and they are capable of correcting or introducing point mutations and regulating transcription and epigenetics. They have also accelerated and expanded researchers' ability to generate genetic models. They can be used to directly treat deleterious genetic diseases in somatic cells. However, establishing appropriate delivery, specificity, and repair strategies are prerequisites for clinical use. Recently, a Chinese research team used CRISPR-Cas9 technology on human embryos and obtained mosaic embryos harboring a large number of off-targets that can be potentially harmful if the embryos were viable [143]. Social and ethical aspects for editing human embryos should be carefully taken into consideration.

This work was supported by grants from the AFM (MEGAFSHD) and by the Russian Science Foundation (project No. 14-15-00199)

REFERENCES

1. Chevalier, B. S., and Stoddard, B. L. (2001) Homing endonucleases: structural and functional insight into the catalysts of intron/intein mobility, *Nucleic Acids Res.*, **29**, 3757-3774.
2. Thierry, A., and Dujon, B. (1992) Nested chromosomal fragmentation in yeast using the meganuclease I-Sce I: a new method for physical mapping of eukaryotic genomes, *Nucleic Acids Res.*, **20**, 5625-5631.
3. Smith, J., Grizot, S., Arnould, S., Duclert, A., Epinat, J. C., Chames, P., Prieto, J., Redondo, P., Blanco, F. J., Bravo, J., Montoya, G., Paques, F., and Duchateau, P. (2006) A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences, *Nucleic Acids Res.*, **34**, e149.
4. Chevalier, B. S., Kortemme, T., Chadsey, M. S., Baker, D., Monnat, R. J., and Stoddard, B. L. (2002) Design, activity, and structure of a highly specific artificial endonuclease, *Mol. Cell*, **10**, 895-905.
5. Daboussi, F., Zaslavskiy, M., Poirot, L., Loperfido, M., Gouble, A., Guyot, V., Leduc, S., Galetto, R., Grizot, S., Oficjalska, D., Perez, C., Delacote, F., Dupuy, A., Chion-Sotinel, I., Le Clerre, D., Lebuhotel, C., Danos, O., Lemaire, F., Oussedik, K., Cedrone, F., Epinat, J. C., Smith, J., Yanez-Munoz, R. J., Dickson, G., Popplewell, L., Koo, T., Vandendriessche, T., Chuah, M. K., Duclert, A., Duchateau, P., and Paques, F. (2012) Chromosomal context and epigenetic mechanisms control the efficacy of genome editing by rare-cutting designer endonucleases, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 6367-6379.
6. Kim, Y. G., Cha, J., and Chandrasegaran, S. (1996) Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to FokI cleavage domain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 1156-1160.
7. Wah, D. A., Bitinaite, J., Schildkraut, I., and Aggarwal, A. K. (1998) Structure of FokI has implications for DNA cleavage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 10564-10569.
8. Bitinaite, J., Wah, D. A., Aggarwal, A. K., and Schildkraut, I. (1998) FokI dimerization is required for DNA cleavage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 10570-10575.
9. Wah, D. A., Hirsch, J. A., Dorner, L. F., Schildkraut, I., and Aggarwal, A. K. (1997) Structure of the multimodular endonuclease FokI bound to DNA, *Nature*, **388**, 97-100.
10. Pavletich, N. P., and Pabo, C. O. (1991) Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268–DNA complex at 2.1 E, *Science*, **252**, 809-817.
11. Shi, Y., and Berg, J. M. (1995) A direct comparison of the properties of natural and designed zinc-finger proteins, *Chem. Biol.*, **2**, 83-89.
12. Elrod-Erickson, M., and Pabo, C. O. (1999) Binding studies with mutants of Zif268. Contribution of individual side chains to binding affinity and specificity in the Zif268 zinc finger–DNA complex, *J. Biol. Chem.*, **274**, 19281-19285.
13. Desjarlais, J. R., and Berg, J. M. (1993) Use of a zinc-finger consensus sequence framework and specificity rules to design specific DNA binding proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 2256-2260.
14. Wolfe, S. A., Greisman, H. A., Ramm, E. I., and Pabo, C. O. (1999) Analysis of zinc fingers optimized via phage display: evaluating the utility of a recognition code, *J. Mol. Biol.*, **285**, 1917-1934.
15. Mittelman, D., Moye, C., Morton, J., Sykoudis, K., Lin, Y., Carroll, D., and Wilson, J. H. (2009) Zinc-finger directed double-strand breaks within CAG repeat tracts promote repeat instability in human cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 9607-9612.
16. Santillan, B. A., Moye, C., Mittelman, D., and Wilson, J. H. (2014) GFP-based fluorescence assay for CAG repeat instability in cultured human cells, *PLoS One*, **9**, e113952.
17. Liu, G., Chen, X., Bissler, J. J., Sinden, R. R., and Leffak, M. (2010) Replication-dependent instability at (CTG) Ч (CAG) repeat hairpins in human cells, *Nat. Chem. Biol.*, **6**, 652-659.
18. Miller, J. C., Holmes, M. C., Wang, J., Guschin, D. Y., Lee, Y. L., Rupniewski, I., Beausejour, C. M., Waite, A. J., Wang, N. S., Kim, K. A., Gregory, P. D., Pabo, C. O., and Rebar, E. J. (2007) An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing, *Nat. Biotechnol.*, **25**, 778-785.
19. Christian, M., Cermak, T., Doyle, E. L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A. J., and Voytas, D. F. (2010) Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases, *Genetics*, **186**, 757-761.
20. Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G., and Bonas, U. (2007) A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator, *Science*, **318**, 648-651.
21. Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., and Bonas, U. (2009) Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors, *Science*, **326**, 1509-1512.
22. Moscou, M. J., and Bogdanove, A. J. (2009) A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors, *Science*, **326**, 1501.
23. Li, T., Huang, S., Jiang, W. Z., Wright, D., Spalding, M. H., Weeks, D. P., and Yang, B. (2011) TAL nucleases (TALNs): hybrid proteins composed of TAL effectors and FokI DNA-cleavage domain, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 359-372.
24. Ren, C., Yan, Q., and Zhang, Z. (2014) Minimum length of direct repeat sequences required for efficient homologous recombination induced by zinc finger nuclease in yeast, *Mol. Biol. Rep.*, **41**, 6939-6948.
25. Sander, J. D., Cade, L., Khayter, C., Reyon, D., Peterson, R. T., Joung, J. K., and Yeh, J. R. (2011) Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs, *Nat. Biotechnol.*, **29**, 697-698.
26. McCammon, J. M., Doyon, Y., and Amacher, S. L. (2011) Inducing high rates of targeted mutagenesis in zebrafish using zinc finger nucleases (ZFNs), *Methods Mol. Biol.*, **770**, 505-527.
27. Bibikova, M., Golic, M., Golic, K. G., and Carroll, D. (2002) Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases, *Genetics*, **161**, 1169-1175.
28. Enya, S., Daimon, T., Igarashi, F., Kataoka, H., Uchibori, M., Sezutsu, H., Shinoda, T., and Niwa, R. (2015) The silkworm glutathione S-transferase gene noppera-bo is required for ecdysteroid biosynthesis and larval development, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **61**, 1-7.
29. Mahfouz, M. M., Li, L., Shamimuzzaman, M., Wibowo, A., Fang, X., and Zhu, J. K. (2011) *De novo*-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 2623-2628.

30. Cai, C. Q., Doyon, Y., Ainley, W. M., Miller, J. C., Dekelver, R. C., Moehle, E. A., Rock, J. M., Lee, Y. L., Garrison, R., Schulenberg, L., Blue, R., Worden, A., Baker, L., Faraji, F., Zhang, L., Holmes, M. C., Rebar, E. J., Collingwood, T. N., Rubin-Wilson, B., Gregory, P. D., Urnov, F. D., and Petolino, J. F. (2009) Targeted transgene integration in plant cells using designed zinc finger nucleases, *Plant Mol. Biol.*, **69**, 699-709.
31. Tesson, L., Usal, C., Menoret, S., Leung, E., Niles, B. J., Remy, S., Santiago, Y., Vincent, A. I., Meng, X., Zhang, L., Gregory, P. D., Anegon, I., and Cost, G. J. (2011) Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs, *Nat. Biotechnol.*, **29**, 695-696.
32. Hamilton, S. M., Green, J. R., Veeraragavan, S., Yuva, L., McCoy, A., Wu, Y., Warren, J., Little, L., Ji, D., Cui, X., Weinstein, E., and Paylor, R. (2014) *Fmr1* and *Nlgn3* knockout rats: novel tools for investigating autism spectrum disorders, *Behav. Neurosci.*, **128**, 103-109.
33. Miller, J. C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K. A., Wang, J., Xia, D. F., Meng, X., Paschon, D. E., Leung, E., Hinkley, S. J., Dulay, G. P., Hua, K. L., Ankoudinova, I., Cost, G. J., Urnov, F. D., Zhang, H. S., Holmes, M. C., Zhang, L., Gregory, P. D., and Rebar, E. J. (2011) A TALE nuclease architecture for efficient genome editing, *Nat. Biotechnol.*, **29**, 143-148.
34. Zhang, F., Cong, L., Lodato, S., Kosuri, S., Church, G. M., and Arlotta, P. (2011) Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription, *Nat. Biotechnol.*, **29**, 149-153.
35. Geissler, R., Scholze, H., Hahn, S., Streubel, J., Bonas, U., Behrens, S. E., and Boch, J. (2011) Transcriptional activators of human genes with programmable DNA-specificity, *PLoS One*, **6**, e19509.
36. Wang, J., Exline, C. M., DeClercq, J. J., Llewellyn, G. N., Hayward, S. B., Li, P. W., Shivak, D. A., Surosky, R. T., Gregory, P. D., Holmes, M. C., and Cannon, P. M. (2015) Homology-driven genome editing in hematopoietic stem and progenitor cells using ZFN mRNA and AAV6 donors, *Nat. Biotechnol.*, **33**, 1256-1263.
37. Marraffini, L. A., and Sontheimer, E. J. (2010) CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea, *Nat. Rev. Genet.*, **11**, 181-190.
38. Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., and Horvath, P. (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes, *Science*, **315**, 1709-1712.
39. Marraffini, L. A., and Sontheimer, E. J. (2008) CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA, *Science*, **322**, 1843-1845.
40. Louwen, R., Staals, R. H., Endtz, H. P., Van Baarlen, P., and Van der Oost, J. (2014) The role of CRISPR-Cas systems in virulence of pathogenic bacteria, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **78**, 74-88.
41. Makarova, K. S., Haft, D. H., Barrangou, R., Brouns, S. J., Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J., Wolf, Y. I., Yakunin, A. F., Van der Oost, J., and Koonin, E. V. (2011) Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems, *Nat. Rev. Microbiol.*, **9**, 467-477.
42. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., and Charpentier, E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity, *Science*, **337**, 816-821.
43. Tang, T. H., Bachellerie, J. P., Rozhdestvensky, T., Bortolin, M. L., Huber, H., Drungowski, M., Elge, T., Brosius, J., and Huttenhofer, A. (2002) Identification of 86 candidates for small non-messenger RNAs from the archaeon *Archaeoglobus fulgidus*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 7536-7541.
44. Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., and Ehrlich, S. D. (2005) Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin, *Microbiology*, **151**, 2551-2561.
45. Mojica, F. J., Diez-Villasenor, C., Garcia-Martinez, J., and Soria, E. (2005) Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements, *J. Mol. Evol.*, **60**, 174-182.
46. Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., Eckert, M. R., Vogel, J., and Charpentier, E. (2011) CRISPR RNA maturation by *trans*-encoded small RNA and host factor RNase III, *Nature*, **471**, 602-607.
47. Brouns, S. J., Jore, M. M., Lundgren, M., Westra, E. R., Slijkhuis, R. J., Snijders, A. P., Dickman, M. J., Makarova, K. S., Koonin, E. V., and Van der Oost, J. (2008) Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes, *Science*, **321**, 960-964.
48. Haurwitz, R. E., Jinek, M., Wiedenheft, B., Zhou, K., and Doudna, J. A. (2010) Sequence- and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease, *Science*, **329**, 1355-1358.
49. Doudna, J. A., and Charpentier, E. (2014) Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9, *Science*, **346**, 1258096.
50. Hsu, P. D., Lander, E. S., and Zhang, F. (2014) Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering, *Cell*, **157**, 1262-1278.
51. Szczelkun, M. D., Tikhomirova, M. S., Sinkunas, T., Gasiunas, G., Karvelis, T., Pschera, P., Siksnys, V., and Seidel, R. (2014) Direct observation of R-loop formation by single RNA-guided Cas9 and Cascade effector complexes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 9798-9803.
52. Sternberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C., and Doudna, J. A. (2014) DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9, *Nature*, **507**, 62-67.
53. Veres, A., Gosis, B. S., Ding, Q., Collins, R., Ragavendran, A., Brand, H., Erdin, S., Cowan, C. A., Talkowski, M. E., and Musunuru, K. (2014) Low incidence of off-target mutations in individual CRISPR-Cas9 and TALEN targeted human stem cell clones detected by whole-genome sequencing, *Cell Stem Cell*, **15**, 27-30.
54. Gong, C., Bongiorno, P., Martins, A., Stephanou, N. C., Zhu, H., Shuman, S., and Glickman, M. S. (2005) Mechanism of nonhomologous end-joining in mycobacteria: a low-fidelity repair system driven by Ku, ligase D and ligase C, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 304-312.
55. Iarovaia, O. V., Rubtsov, M., Ioudinkova, E., Tsfasman, T., Razin, S. V., and Vassetzky, Y. S. (2014) Dynamics of double strand breaks and chromosomal translocations, *Mol. Cancer*, **13**, 249.
56. Hoffman, E. P., Brown, R. H., Jr., and Kunkel, L. M. (1987) Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus, *Cell*, **51**, 919-928.
57. Mukherjee, M., Chaturvedi, L. S., Srivastava, S., Mittal, R. D., and Mittal, B. (2003) *De novo* mutations in sporadic

deletional Duchenne muscular dystrophy (DMD) cases, *Exp. Mol. Med.*, **35**, 113-117.
58. Zhu, H. Y., Li, J., Yang, Y., Wu, X., Zhu, X. Y., Zhu, R. F., Zhang, Y., Duan, H. L., and Hu, Y. L. (2009) Mutation analysis and prenatal diagnosis of sporadic DMD/BMD families, *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, **89**, 1753-1756.
59. Sharma, P., Tran, T., Stelmack, G. L., McNeill, K., Gosens, R., Mutawe, M. M., Unruh, H., Gerthoffer, W. T., and Halayko, A. J. (2008) Expression of the dystrophin–glycoprotein complex is a marker for human airway smooth muscle phenotype maturation, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **294**, L57-68.
60. Kingston, H. M., Harper, P. S., Pearson, P. L., Davies, K. E., Williamson, R., and Page, D. (1983) Localisation of gene for Becker muscular dystrophy, *Lancet*, **2**, 1200.
61. Blake, D. J., Weir, A., Newey, S. E., and Davies, K. E. (2002) Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle, *Physiol. Rev.*, **82**, 291-329.
62. Sparks, S. E., and Escolar, D. M. (2011) Congenital muscular dystrophies, *Handb. Clin. Neurol.*, **101**, 47-79.
63. Mercuri, E., and Muntoni, F. (2012) The ever-expanding spectrum of congenital muscular dystrophies, *Ann. Neurol.*, **72**, 9-17.
64. Mahadevan, M., Tsilfidis, C., Sabourin, L., Shutler, G., Amemiya, C., Jansen, G., Neville, C., Narang, M., Barcelo, J., O'Hoy, K., Leblond, S., Earle-Macdonald, J., De Jong, P., Wieringa, B., and Korneluk, R. G. (1992) Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3′-untranslated region of the gene, *Science*, **255**, 1253-1255.
65. Harley, H. G., Walsh, K. V., Rundle, S., Brook, J. D., Sarfarazi, M., Koch, M. C., Floyd, J. L., Harper, P. S., and Shaw, D. J. (1991) Localization of the myotonic dystrophy locus to 19q13.2-19q13.3 and its relationship to twelve polymorphic loci on 19q, *Hum. Genet.*, **87**, 73-80.
66. Van der Ven, P. F., Jansen, G., Van Kuppevelt, T. H., Perryman, M. B., Lupa, M., Dunne, P. W., Ter Laak, H. J., Jap, P. H., Veerkamp, J. H., Epstein, H. F., and Wieringa, B. (1993) Myotonic dystrophy kinase is a component of neuromuscular junctions, *Hum. Mol. Genet.*, **2**, 1889-1894.
67. Liquori, C. L., Ricker, K., Moseley, M. L., Jacobsen, J. F., Kress, W., Naylor, S. L., Day, J. W., and Ranum, L. P. (2001) Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9, *Science*, **293**, 864-867.
68. Day, J. W., Ricker, K., Jacobsen, J. F., Rasmussen, L. J., Dick, K. A., Kress, W., Schneider, C., Koch, M. C., Beilman, G. J., Harrison, A. R., Dalton, J. C., and Ranum, L. P. (2003) Myotonic dystrophy type 2: molecular, diagnostic and clinical spectrum, *Neurology*, **60**, 657-664.
69. Liu, Q., Zheng, Y. F., Zhu, Y. P., Ling, S. Q., and Li, W. R. (2015) Clinical, pathological and genetic characteristics of a pedigree with myotonic dystrophy type 1, *Exp. Ther. Med.*, **10**, 1931-1936.
70. Deenen, J. C., Arnts, H., Van der Maarel, S. M., Padberg, G. W., Verschuuren, J. J., Bakker, E., Weinreich, S. S., Verbeek, A. L., and Van Engelen, B. G. (2014) Population-based incidence and prevalence of facioscapulohumeral dystrophy, *Neurology*, **83**, 1056-1059.
71. Wijmenga, C., Padberg, G. W., Moerer, P., Wiegant, J., Liem, L., Brouwer, O. F., Milner, E. C., Weber, J. L., Van Ommen, G. B., Sandkuyl, L. A., and Frants, R. R. (1991) Mapping of facioscapulohumeral muscular dystrophy gene to chromosome 4q35-qter by multipoint linkage analysis and *in situ* hybridization, *Genomics*, **9**, 570-575.
72. Tawil, R., Van der Maarel, S. M., and Tapscott, S. J. (2014) Facioscapulohumeral dystrophy: the path to consensus on pathophysiology, *Skelet. Muscle*, **4**, 12.
73. Cabianca, D. S., Casa, V., Bodega, B., Xynos, A., Ginelli, E., Tanaka, Y., and Gabellini, D. (2012) A long ncRNA links copy number variation to a polycomb/trithorax epigenetic switch in FSHD muscular dystrophy, *Cell*, **149**, 819-831.
74. Kisseljova, N. P., Dmitriev, P., Katargin, A., Kim, E., Ezerina, D., Markozashvili, D., Malysheva, D., Planche, E., Lemmers, R. J., Van der Maarel, S. M., Laoudj-Chenivesse, D., Lipinski, M., and Vassetzky, Y. S. (2014) DNA polymorphism and epigenetic marks modulate the affinity of a scaffold/matrix attachment region to the nuclear matrix, *Eur. J. Hum. Genet.*, **22**, 1117-1123.
75. Van Overveld, P. G., Lemmers, R. J., Sandkuijl, L. A., Enthoven, L., Winokur, S. T., Bakels, F., Padberg, G. W., Van Ommen, G. J., Frants, R. R., and Van der Maarel, S. M. (2003) Hypomethylation of D4Z4 in 4q-linked and non-4q-linked facioscapulohumeral muscular dystrophy, *Nat. Genet.*, **35**, 315-317.
76. Petrov, A., Allinne, J., Pirozhkova, I., Laoudj, D., Lipinski, M., and Vassetzky, Y. S. (2008) A nuclear matrix attachment site in the 4q35 locus has an enhancer-blocking activity *in vivo*: implications for the facio-scapulo-humeral dystrophy, *Genome Res.*, **18**, 39-45.
77. Dmitriev, P., Petrov, A., Ansseau, E., Stankevicins, L., Charron, S., Kim, E., Bos, T. J., Robert, T., Turki, A., Coppee, F., Belayew, A., Lazar, V., Carnac, G., Laoudj, D., Lipinski, M., and Vassetzky, Y. S. (2011) The Kruppel-like factor 15 as a molecular link between myogenic factors and a chromosome 4q transcriptional enhancer implicated in facioscapulohumeral dystrophy, *J. Biol. Chem.*, **286**, 44620-44631.
78. Gabellini, D., Green, M. R., and Tupler, R. (2002) Inappropriate gene activation in FSHD: a repressor complex binds a chromosomal repeat deleted in dystrophic muscle, *Cell*, **110**, 339-348.
79. Masny, P. S., Chan, O. Y., De Greef, J. C., Bengtsson, U., Ehrlich, M., Tawil, R., Lock, L. F., Hewitt, J. E., Stocksdale, J., Martin, J. H., Van der Maarel, S. M., and Winokur, S. T. (2010) Analysis of allele-specific RNA transcription in FSHD by RNA–DNA FISH in single myonuclei, *Eur. J. Hum. Genet.*, **18**, 448-456.
80. Rijkers, T., Deidda, G., Van Koningsbruggen, S., Van Geel, M., Lemmers, R. J., Van Deutekom, J. C., Figlewicz, D., Hewitt, J. E., Padberg, G. W., Frants, R. R., and Van der Maarel, S. M. (2004) FRG2, an FSHD candidate gene, is transcriptionally upregulated in differentiating primary myoblast cultures of FSHD patients, *J. Med. Genet.*, **41**, 826-836.
81. Udd, B. (2014) Distal myopathies, *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, **14**, 434.
82. Bonne, G., Di Barletta, M. R., Varnous, S., Becane, H. M., Hammouda, E. H., Merlini, L., Muntoni, F., Greenberg, C. R., Gary, F., Urtizberea, J. A., Duboc, D., Fardeau, M., Toniolo, D., and Schwartz, K. (1999) Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery–Dreifuss muscular dystrophy, *Nat. Genet.*, **21**, 285-288.

83. Ghaoui, R., Cooper, S. T., Lek, M., Jones, K., Corbett, A., Reddel, S. W., Needham, M., Liang, C., Waddell, L. B., Nicholson, G., O'Grady, G., Kaur, S., Ong, R., Davis, M., Sue, C. M., Laing, N. G., North, K. N., MacArthur, D. G., and Clarke, N. F. (2015) Use of whole-exome sequencing for diagnosis of limb-girdle muscular dystrophy: outcomes and lessons learned, *JAMA Neurol.*, **72**, 1424-1432.
84. Van der Sluijs, B. M., Van Engelen, B. G., and Hoefsloot, L. H. (2003) Oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) due to a small duplication in the *PABPN1* gene, *Hum. Mutat.*, **21**, 553.
85. Friedmann, T., and Roblin, R. (1972) Gene therapy for human genetic disease? *Science*, **175**, 949-955.
86. Goemans, N. M., Tulinius, M., Van den Akker, J. T., Burm, B. E., Ekhart, P. F., Heuvelmans, N., Holling, T., Janson, A. A., Platenburg, G. J., Sipkens, J. A., Sitsen, J. M., Aartsma-Rus, A., Van Ommen, G. J., Buyse, G., Darin, N., Verschuuren, J. J., Campion, G. V., De Kimpe, S. J., and Van Deutekom, J. C. (2011) Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy, *N. Engl. J. Med.*, **364**, 1513-1522.
87. Hammond, S. M., and Wood, M. J. (2010) PRO-051, an antisense oligonucleotide for the potential treatment of Duchenne muscular dystrophy, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **12**, 478-486.
88. Yuasa, K., Yoshimura, M., Urasawa, N., Ohshima, S., Howell, J. M., Nakamura, A., Hijikata, T., Miyagoe-Suzuki, Y., and Takeda, S. (2007) Injection of a recombinant AAV serotype 2 into canine skeletal muscles evokes strong immune responses against transgene products, *Gene Ther.*, **14**, 1249-1260.
89. Ohshima, S., Shin, J. H., Yuasa, K., Nishiyama, A., Kira, J., Okada, T., and Takeda, S. (2009) Transduction efficiency and immune response associated with the administration of AAV8 vector into dog skeletal muscle, *Mol. Ther.*, **17**, 73-80.
90. Wang, Z., Kuhr, C. S., Allen, J. M., Blankinship, M., Gregorevic, P., Chamberlain, J. S., Tapscott, S. J., and Storb, R. (2007) Sustained AAV-mediated dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy with a brief course of immunosuppression, *Mol. Ther.*, **15**, 1160-1166.
91. Shin, J. H., Yue, Y., Srivastava, A., Smith, B., Lai, Y., and Duan, D. (2012) A simplified immune suppression scheme leads to persistent microdystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy dogs, *Hum. Gene Ther.*, **23**, 202-209.
92. Rodino-Klapac, L. R., Montgomery, C. L., Bremer, W. G., Shontz, K. M., Malik, V., Davis, N., Sprinkle, S., Campbell, K. J., Sahenk, Z., Clark, K. R., Walker, C. M., Mendell, J. R., and Chicoine, L. G. (2010) Persistent expression of FLAG-tagged micro dystrophin in nonhuman primates following intramuscular and vascular delivery, *Mol. Ther.*, **18**, 109-117.
93. Bowles, D. E., McPhee, S. W., Li, C., Gray, S. J., Samulski, J. J., Camp, A. S., Li, J., Wang, B., Monahan, P. E., Rabinowitz, J. E., Grieger, J. C., Govindasamy, L., Agbandje-McKenna, M., Xiao, X., and Samulski, R. J. (2012) Phase 1 gene therapy for Duchenne muscular dystrophy using a translational optimized AAV vector, *Mol. Ther.*, **20**, 443-455.
94. Partridge, T. A., Morgan, J. E., Coulton, G. R., Hoffman, E. P., and Kunkel, L. M. (1989) Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts, *Nature*, **337**, 176-179.
95. Law, P. K., Goodwin, T. G., Fang, Q., Duggirala, V., Larkin, C., Florendo, J. A., Kirby, D. S., Deering, M. B., Li, H. J., Chen, M., Yoo, T. J., Cornett, J., LiL, M., Shirzad, A., Quinley, T., and Holcomb, R. L. (1992) Feasibility, safety, and efficacy of myoblast transfer therapy on Duchenne muscular dystrophy boys, *Cell Transplant.*, **1**, 235-244.
96. Tremblay, J. P., Malouin, F., Roy, R., Huard, J., Bouchard, J. P., Satoh, A., and Richards, C. L. (1993) Results of a triple blind clinical study of myoblast transplantations without immunosuppressive treatment in young boys with Duchenne muscular dystrophy, *Cell Transplant.*, **2**, 99-112.
97. Mendell, J. R. (1990) Immunosuppressive therapy in Duchenne muscular dystrophy: considerations for myoblast transfer studies, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **280**, 287-295.
98. Mendell, J. R., Kissel, J. T., Amato, A. A., King, W., Signore, L., Prior, T. W., Sahenk, Z., Benson, S., McAndrew, P. E., Rice, R., Nagaraja, H., Stephens, R., Lantry, L., Morris, G., and Burghes, A. (1995) Myoblast transfer in the treatment of Duchenne's muscular dystrophy, *N. Engl. J. Med.*, **333**, 832-838.
99. Dellavalle, A., Sampaolesi, M., Tonlorenzi, R., Tagliafico, E., Sacchetti, B., Perani, L., Innocenzi, A., Galvez, B. G., Messina, G., Morosetti, R., Li, S., Belicchi, M., Peretti, G., Chamberlain, J. S., Wright, W. E., Torrente, Y., Ferrari, S., Bianco, P., and Cossu, G. (2007) Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells, *Nat. Cell Biol.*, **9**, 255-267.
100. Rodino-Klapac, L. R., Lee, J. S., Mulligan, R. C., Clark, K. R., and Mendell, J. R. (2008) Lack of toxicity of alpha-sarcoglycan overexpression supports clinical gene transfer trial in LGMD2D, *Neurology*, **71**, 240-247.
101. Hauser, M. A., Horrigan, S. K., Salmikangas, P., Torian, U. M., Viles, K. D., Dancel, R., Tim, R. W., Taivainen, A., Bartoloni, L., Gilchrist, J. M., Stajich, J. M., Gaskell, P. C., Gilbert, J. R., Vance, J. M., Pericak-Vance, M. A., Carpen, O., Westbrook, C. A., and Speer, M. C. (2000) Myotilin is mutated in limb girdle muscular dystrophy 1A, *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 2141-2147.
102. Liu, J., Wallace, L. M., Garwick-Coppens, S. E., Sloboda, D. D., Davis, C. S., Hakim, C. H., Hauser, M. A., Brooks, S. V., Mendell, J. R., and Harper, S. Q. (2014) RNAi-mediated gene silencing of mutant myotilin improves myopathy in LGMD1A mice, *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **3**, e160.
103. Wallace, L. M., Liu, J., Domire, J. S., Garwick-Coppens, S. E., Guckes, S. M., Mendell, J. R., Flanigan, K. M., and Harper, S. Q. (2012) RNA interference inhibits DUX4-induced muscle toxicity *in vivo*: implications for a targeted FSHD therapy, *Mol. Ther.*, **20**, 1417-1423.
104. Wallace, L. M., Garwick-Coppens, S. E., Tupler, R., and Harper, S. Q. (2011) RNA interference improves myopathic phenotypes in mice over-expressing FSHD region gene 1 (FRG1), *Mol. Ther.*, **19**, 2048-2054.
105. Bortolanza, S., Nonis, A., Sanvito, F., Maciotta, S., Sitia, G., Wei, J., Torrente, Y., Di Serio, C., Chamberlain, J. R.,

and Gabellini, D. (2011) AAV6-mediated systemic shRNA delivery reverses disease in a mouse model of facioscapulohumeral muscular dystrophy, *Mol. Ther.*, **19**, 2055-2064.
106. Mendell, J. R., Shilling, C., Leslie, N. D., Flanigan, K. M., Al-Dahhak, R., Gastier-Foster, J., Kneile, K., Dunn, D. M., Duval, B., Aoyagi, A., Hamil, C., Mahmoud, M., Roush, K., Bird, L., Rankin, C., Lilly, H., Street, N., Chandrasekar, R., and Weiss, R. B. (2012) Evidence-based path to newborn screening for Duchenne muscular dystrophy, *Ann. Neurol.*, **71**, 304-313.
107. Monaco, A. P., Bertelson, C. J., Liechti-Gallati, S., Moser, H., and Kunkel, L. M. (1988) An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus, *Genomics*, **2**, 90-95.
108. Bulfield, G., Siller, W. G., Wight, P. A., and Moore, K. J. (1984) X-chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1189-1192.
109. Cox, G. A., Phelps, S. F., Chapman, V. M., and Chamberlain, J. S. (1993) New mdx mutation disrupts expression of muscle and nonmuscle isoforms of dystrophin, *Nat. Genet.*, **4**, 87-93.
110. Chandrasekharan, K., Yoon, J. H., Xu, Y., deVries, S., Camboni, M., Janssen, P. M., Varki, A., and Martin, P. T. (2010) A human-specific deletion in mouse Cmah increases disease severity in the mdx model of Duchenne muscular dystrophy, *Sci. Transl. Med.*, **2**, 42ra54.
111. Sacco, A., Mourkioti, F., Tran, R., Choi, J., Llewellyn, M., Kraft, P., Shkreli, M., Delp, S., Pomerantz, J. H., Artandi, S. E., and Blau, H. M. (2010) Short telomeres and stem cell exhaustion model Duchenne muscular dystrophy in mdx/mTR mice, *Cell*, **143**, 1059-1071.
112. Larcher, T., Lafoux, A., Tesson, L., Remy, S., Thepenier, V., Francois, V., Le Guiner, C., Goubin, H., Dutilleul, M., Guigand, L., Toumaniantz, G., De Cian, A., Boix, C., Renaud, J. B., Cherel, Y., Giovannangeli, C., Concordet, J. P., Anegon, I., and Huchet, C. (2014) Characterization of dystrophin deficient rats: a new model for Duchenne muscular dystrophy, *PLoS One*, **9**, e110371.
113. Cooper, B. J., Winand, N. J., Stedman, H., Valentine, B. A., Hoffman, E. P., Kunkel, L. M., Scott, M. O., Fischbeck, K. H., Kornegay, J. N., Avery, R. J., Williams, J. R., Schmickel, R. D., and Sylvester, J. E. (1988) The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs, *Nature*, **334**, 154-156.
114. Shimatsu, Y., Katagiri, K., Furuta, T., Nakura, M., Tanioka, Y., Yuasa, K., Tomohiro, M., Kornegay, J. N., Nonaka, I., and Takeda, S. (2003) Canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ), *Exp. Anim.*, **52**, 93-97.
115. Klymiuk, N., Blutke, A., Graf, A., Krause, S., Burkhardt, K., Wuensch, A., Krebs, S., Kessler, B., Zakhartchenko, V., Kurome, M., Kemter, E., Nagashima, H., Schoser, B., Herbach, N., Blum, H., Wanke, R., Aartsma-Rus, A., Thirion, C., Lochmuller, H., Walter, M. C., and Wolf, E. (2013) Dystrophin-deficient pigs provide new insights into the hierarchy of physiological derangements of dystrophic muscle, *Hum. Mol. Genet.*, **22**, 4368-4382.
116. Greener, M. J., and Roberts, R. G. (2000) Conservation of components of the dystrophin complex in *Drosophila*, *FEBS Lett.*, **482**, 13-18.
117. Bassett, D. I., and Currie, P. D. (2003) The zebrafish as a model for muscular dystrophy and congenital myopathy, *Hum. Mol. Genet.*, **12**, Spec. No. 2, R265-270.
118. Bessou, C., Giugia, J. B., Franks, C. J., Holden-Dye, L., and Segalat, L. (1998) Mutations in the *Caenorhabditis elegans* dystrophin-like gene *dys-1* lead to hyperactivity and suggest a link with cholinergic transmission, *Neurogenetics*, **2**, 61-72.
119. Bertoni, C., Morris, G. E., and Rando, T. A. (2005) Strand bias in oligonucleotide-mediated dystrophin gene editing, *Hum. Mol. Genet.*, **14**, 221-233.
120. Maguire, K., Suzuki, T., DiMatteo, D., Parekh-Olmedo, H., and Kmiec, E. (2009) Genetic correction of splice site mutation in purified and enriched myoblasts isolated from mdx5cv mice, *BMC Mol. Biol.*, **10**, 15.
121. Kayali, R., Bury, F., Ballard, M., and Bertoni, C. (2010) Site-directed gene repair of the dystrophin gene mediated by PNA-ssODNs, *Hum. Mol. Genet.*, **19**, 3266-3281.
122. Nik-Ahd, F., and Bertoni, C. (2014) *Ex vivo* gene editing of the dystrophin gene in muscle stem cells mediated by peptide nucleic acid single stranded oligodeoxynucleotides induces stable expression of dystrophin in a mouse model for Duchenne muscular dystrophy, *Stem Cells*, **32**, 1817-1830.
123. Choulika, A., Perrin, A., Dujon, B., and Nicolas, J. F. (1995) Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 1968-1973.
124. Rouet, P., Smih, F., and Jasin, M. (1994) Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease, *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 8096-8106.
125. Li, H. L., Fujimoto, N., Sasakawa, N., Shirai, S., Ohkame, T., Sakuma, T., Tanaka, M., Amano, N., Watanabe, A., Sakurai, H., Yamamoto, T., Yamanaka, S., and Hotta, A. (2015) Precise correction of the dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9, *Stem Cell Rep.*, **4**, 143-154.
126. Ousterout, D. G., Kabadi, A. M., Thakore, P. I., Perez-Pinera, P., Brown, M. T., Majoros, W. H., Reddy, T. E., and Gersbach, C. A. (2015) Correction of dystrophin expression in cells from Duchenne muscular dystrophy patients through genomic excision of exon 51 by zinc finger nucleases, *Mol. Ther.*, **23**, 523-532.
127. Rousseau, J., Chapdelaine, P., Boisvert, S., Almeida, L. P., Corbeil, J., Montpetit, A., and Tremblay, J. P. (2011) Endonucleases: tools to correct the dystrophin gene, *J. Gene Med.*, **13**, 522-537.
128. Ousterout, D. G., Perez-Pinera, P., Thakore, P. I., Kabadi, A. M., Brown, M. T., Qin, X., Fedrigo, O., Mouly, V., Tremblay, J. P., and Gersbach, C. A. (2013) Reading frame correction by targeted genome editing restores dystrophin expression in cells from Duchenne muscular dystrophy patients, *Mol. Ther.*, **21**, 1718-1726.
129. Muir, L. A., Nguyen, Q. G., Hauschka, S. D., and Chamberlain, J. S. (2014) Engraftment potential of dermal fibroblasts following *in vivo* myogenic conversion in immunocompetent dystrophic skeletal muscle, *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, **1**, 14025.
130. Popplewell, L., Koo, T., Leclerc, X., Duclert, A., Mamchaoui, K., Gouble, A., Mouly, V., Voit, T., Paques, F., Cedrone, F., Isman, O., Yanez-Munoz, R. J., and Dickson, G. (2013) Gene correction of a duchenne muscular dystrophy mutation by meganuclease-enhanced exon knock-in, *Hum. Gene Ther.*, **24**, 692-701.

131. Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., and Zhang, F. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems, *Science*, **339**, 819-823.
132. Wang, H., Yang, H., Shivalila, C. S., Dawlaty, M. M., Cheng, A. W., Zhang, F., and Jaenisch, R. (2013) One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering, *Cell*, **153**, 910-918.
133. Ousterout, D. G., Kabadi, A. M., Thakore, P. I., Majoros, W. H., Reddy, T. E., and Gersbach, C. A. (2015) Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy, *Nat. Commun.*, **6**, 6244.
134. Long, C., McAnally, J. R., Shelton, J. M., Mireault, A. A., Bassel-Duby, R., and Olson, E. N. (2014) Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA, *Science*, **345**, 1184-1188.
135. Long, C., Amoasii, L., Mireault, A. A., McAnally, J. R., Li, H., Sanchez-Ortiz, E., Bhattacharyya, S., Shelton, J. M., Bassel-Duby, R., and Olson, E. N. (2016) Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy, *Science*, **351**, 400-403.
136. Nelson, C. E., Hakim, C. H., Ousterout, D. G., Thakore, P. I., Moreb, E. A., Castellanos Rivera, R. M., Madhavan, S., Pan, X., Ran, F. A., Yan, W. X., Asokan, A., Zhang, F., Duan, D., and Gersbach, C. A. (2016) *In vivo* genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy, *Science*, **351**, 403-407.
137. Tabebordbar, M., Zhu, K., Cheng, J. K., Chew, W. L., Widrick, J. J., Yan, W. X., Maesner, C., Wu, E. Y., Xiao, R., Ran, F. A., Cong, L., Zhang, F., Vandenberghe, L. H., Church, G. M., and Wagers, A. J. (2016) *In vivo* gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells, *Science*, **351**, 407-411.
138. Corti, S., Nizzardo, M., Simone, C., Falcone, M., Nardini, M., Ronchi, D., Donadoni, C., Salani, S., Riboldi, G., Magri, F., Menozzi, G., Bonaglia, C., Rizzo, F., Bresolin, N., and Comi, G. P. (2012) Genetic correction of human induced pluripotent stem cells from patients with spinal muscular atrophy, *Sci. Transl. Med.*, **4**, 165ra162.
139. Dmitriev, P., Barat, A., Polesskaya, A., O'Connell, M. J., Robert, T., Dessen, P., Walsh, T. A., Lazar, V., Turki, A., Carnac, G., Laoudj-Chenivesse, D., Lipinski, M., and Vassetzky, Y. S. (2013) Simultaneous miRNA and mRNA transcriptome profiling of human myoblasts reveals a novel set of myogenic differentiation-associated miRNAs and their target genes, *BMC Genomics*, **14**, 265; DOI: 10.1186/1471-2164-14-265.
140. Barro, M., Camac, G., Flavier, S., Mercier, J., Vassetzky, Y., and Laoudj-Chenivesse, D. (2010) Myoblasts from affected and non-affected FSHD muscles exhibit morphological differentiation defects, *J. Cell. Mol. Med.*, **14**, 275-289; DOI: 10.1111/j.1582-4934.2008.00368.x.
141. Dib, C., Bou Saada, Y., Dmitriev, P., Richon, C., Dessen, P., Laoudj-Chenivesse, D., Carnac, G., Lipinski, M., and Vassetzky, Y. S. (2016) Correction of the FSHD myoblast differentiation defect by fusion with healthy myoblasts, *J. Cell. Physiol.*, **231**, 62-71.
142. Himeda, C. L., Jones, T. I., and Jones, P. L. (2015) CRISPR/dCas9-mediated transcriptional inhibition ameliorates the epigenetic dysregulation at D4Z4 and represses DUX4-fl in FSH muscular dystrophy, *Mol. Ther.*, **24**, 527-535.
143. Liang, P., Xu, Y., Zhang, X., Ding, C., Huang, R., Zhang, Z., Lv, J., Xie, X., Chen, Y., Li, Y., Sun, Y., Bai, Y., Songyang, Z., Ma, W., Zhou, C., and Huang, J. (2015) CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes, *Protein Cell*, **6**, 363-372.

4.2 Transplantation autologue dans le cadre de la FSHD

Bien que l'établissement d'un protocole de transplantation autologue de myoblastes/mésangioblastes provenant de muscles non atteints du patient soit loin d'être applicable, deux équipes ont obtenu des résultats très préliminaires à partir de leurs travaux sur des souris immunodéficientes qu'ils suggèrent comme allant en faveur de cette approche thérapeutique.

En effet, une première tentative d'évaluation de la capacité régénérative *in vivo* des myoblastes FSHD issus de muscles non-atteints et injectés au niveau d'un muscle dégénéré de souris immunodéficientes a mis en évidence une efficacité de la régénération musculaire similaire à celle des myoblastes normaux (Vilquin et al. 2005). Suite à l'émergence de la transplantation des mésangioblastes, cellules souches d'origine mésodermique à capacité myogénique, présentes dans le tissu périvasculaire des muscles squelettiques, dans le cadre de thérapie cellulaire des myopathies, Morosetti *et coll*. ont confirmé l'efficacité des mésangioblastes issus des muscles non atteints des patients FSHD à se différencier *in vivo* et à participer à la régénération musculaire dans des souris SCID (Morosetti et al. 2011).

Bien que ces résultats montrent que les myoblastes et les mésangioblastes FSHD sont capables de se différencier et de régénérer un muscle lésé *in vivo*, le modèle animal utilisé n'est pas porteur de la FSHD et ne peut reproduire ni l'environnement génétique lié à la FSHD (dérégulation de l'expression de plusieurs gènes) ni l'environnement musculaire observé dans la FSHD (l'inflammation environnante pas exemple). L'absence d'un modèle animal FSHD sur lequel l'application de la transplantation autologue peut être testée constitue donc une barrière majeure pour cette approche thérapeutique. Par ailleurs, une analyse à long terme de l'efficacité des transplantations autologues est primordiale puisque les cellules transplantées portent l'anomalie génétique et peuvent par conséquent voir leur capacité régénérative affectée du fait de leur présence dans un environnement « favorable » à la maladie (dans le muscle atteint).

Les multiples limitations empêchant la réalisation d'une thérapie cellulaire par transplantation autologue n'ont tout de même pas empêché la mise en place d'un essai clinique en mai 2014. Cet essai clinique de phase 1 actuellement en cours vise à tester la transplantation intramusculaire autologue de cellules souches dérivant de biopsies du muscle biceps fémoral de 15 patients FSHD dans les muscles

biceps, triceps et trapézoïdes (NCT02208713). Cet essai clinique permettra d'évaluer la sécurité et la faisabilité d'une transplantation de cellules souches dans le cadre de la FSHD.

4.3 Approches de la répression génique de *DUX4*

Avec la découverte de *DUX4* comme acteur majeur dans la FSHD, le développement d'une stratégie de l'interférence par ARN à l'aide de petits ARN interférents comme une approche thérapeutique pour la FHSD a été examiné par plusieurs équipes.

Une première étude *in vivo* menée par l'équipe de S. Harper en 2012 (Wallace et al. 2012) consistait à développer un miARN (microARN) artificiel de 30 nucléotides ciblant le cadre de lecture de *DUX4* (miDUX4) et à co-injecter un cocktail de particules virales adéno-associées à capside myotropique comprenant ce miDUX4 (AAV6-miDUX4) et celles qui contiennent *DUX4* (AAV6-DUX4) dans le muscle tibial antérieur de souris, comme précédemment décrit (Wallace et al. 2011). L'expression de *DUX4* était accompagnée d'une dégénérescence et une régénérescence musculaires marquées par une atrophie des myofibres, des noyaux localisés au centre, d'un marquage positif de la caspase-3 et d'une faiblesse musculaire. Contrairement à cela, les muscles des souris co-injectés avec les miDUX4 étaient protégés et histologiquement normaux avec une force musculaire intacte (Wallace et al. 2012). Inhiber *DUX4 in vivo* semble supprimer la myopathologie induite par ce gène, mais l'effet à long terme n'a pas été étudié.

Pair ailleurs, plusieurs équipes ont développé des siARN contre l'ARNm de *DUX4* qu'ils ont testés *in vitro*. Vanderplanck *et coll*. ont développé des siARN ciblant la région 3' UTR (untranslated region) de l'ARNm de *DUX4*, qui sont avérés efficaces dans l'inhibition de l'expression de *DUX4* dans les myoblastes FSHD qui était suivie de la sous-expression de plusieurs gènes en aval de *DUX4* (Vanderplanck et al. 2011). D'autre part, une étude plus récente a démontré l'efficacité d'un siARN (Small interfering RNA) exogène ciblant la région en amont du site de l'initiation de transcription de *DUX4* à supprimer l'expression de l'ARNm de *DUX4* dans des cellules FSHD cultivées *in vitro*, et cela en augmentant la H3K9me2 et en favorisant le recrutement de AGO2 (Argonaute 2) au niveau de la région D4Z4 (Lim et al. 2015). Ainsi, la répression transcriptionnelle de *DUX4* favorisée par ce siARN exogène est dépendante de la voie endogène de l'interférence par ARN DICER/AGO2. Les

auteurs suggèrent l'interférence par ARN qui induisent une répression épigénétique de *DUX4* comme stratégie thérapeutique pour la FSHD.

Ces études ont pu montrer l'efficacité de la répression de l'expression de *DUX4 in vitro* et *in vivo* par la voie de l'interférence par ARN.

Plus récemment, l'équipe de J. Dumonceaux a eu recours à un autre système de répression génique, les Morpholinos. En effet, les oligonucléotides Morpholinos ou PMO (phosphorodiamidate morpholino oligo) sont des molécules synthétiques antisens d'une vingtaine de nucléotides pouvant s'apparier à des séquences complémentaires d'un pré-ARN ou d'un ARNm cible et empêcher, par encombrement stérique, l'accessibilité des machineries de l'épissage et de la traduction (Summerton 1999). A l'aide de cette technologie d'inactivation de gènes, l'équipe de J. Dumonceaux a spécifiquement ciblé des éléments en l'extrémité 3' du pré-ARNm de *DUX4*, tels que le site de polyadénylation nécessaire à la stabilisation du transcrit, dans des cellules FSHD qui était alors accompagné d'une diminution de l'expression de *DUX4* (Marsollier et al. 2016).

L'ensemble des approches testées *in vitro* ont efficacement réprimé l'expression de *DUX4*. Cependant, d'autres études sont nécessaires afin de tester l'efficacité de ces outils *in vivo* et à long terme. La répression de *DUX4 in vivo* par co-injection de DUX4 et mi-DUX4 dans le muscle tibial antérieur de souris était aussi réussie et a empêché les anomalies musculaires normalement induites par DUX4. Toutefois, il sera nécessaire de tester l'effet de l'inhibition de *DUX4* après que la myopathologie induite par ce gène ait lieu, afin que cette approche thérapeutique soit proche de la réalité physiologique.

4.4 Répression épigénétique de *DUX4* à l'aide du variant CRISPR/dCas9

Le développement du variant muté de la Cas9, nommé dCas9 (dead-Cas9) et l'utilisation du système CRISPR/dCas9 dans l'optique d'une répression transcriptionnelle a permis d'introduire la notion de l'interférence par CRISPR (Qi et al. 2013). En effet, la dCas9 garde sa capacité de liaison à l'ADN mais a perdu sa fonction catalytique. Chez les bactéries, la dCas9 guidée par son ARN guide (gARN) se fixe à la séquence génomique cible et crée un encombrement stérique empêchant la fixation de l'ARN polymérase ou l'élongation, inhibant ainsi l'expression du gène cible. Cette

inhibition de la transcription était modeste dans les cellules de mammifères, ce qui a poussé les auteurs à développer une stratégie de l'interférence par CRISPR plus complexe, en fusionnant la dCas9 à des modulateurs transcriptionnels (activateurs ou répresseurs) qui seront par conséquent rapprochés et recrutés au niveau du gène d'intérêt à l'aide du gARN spécifique (Gilbert et al. 2013). D'une façon intéressante, Gilbert *et coll*. ont démontré l'efficacité de la répression transcriptionnelle ciblée initiée en fusionnant dCas9 au domaine protéique KRAB (Krüppel-associated box), un répresseur transcriptionnel (Margolin et al. 1994; Friedman et al. 1996; Moosmann et al. 1996), et en guidant la protéine de fusion dCas9-KRAB jusqu'aux gènes cibles à l'aide de gARN spécifiques. En effet, une fois recruté au niveau du gène cible, le domaine protéique KRAB recrute à son tour des complexes de la répression chromatinienne provoquant ainsi une hétérochromatinisation (Gilbert et al. 2013).

Cette approche intéressante dans le cadre de la FSHD a récemment inspiré l'équipe de Peter Jones qui a utilisé la protéine de fusion dCas9-KRAB pour inhiber l'expression de *DUX4* et de ses gènes cibles dans des myoblastes primaires FSHD en la guidant vers le promoteur ou l'exon 1 de *DUX4* (Himeda et al. 2015). Effectivement, le recrutement de dCas9-KRAB au niveau de D4Z4 était accompagné de la répression de la chromatine au niveau de la région D4Z4, marquée par le recrutement d'un corépresseur de KRAB, KAP1/TRIM28 (Friedman et al. 1996; Moosmann et al. 1996), ainsi que de protéines associées à l'hétérochromatine (HP1α et HP1ß). Cependant, la difficulté de cette approche est la faible expression de *DUX4* qui est restreinte à un nombre limité de noyaux dans les myoblastes FSHD (Snider et al. 2010) et sa limitation majeure est le ciblage unique de *DUX4* dans le cadre de la FSHD.

Hypothèses et objectifs

Au cours des 20 dernières années, les recherches intensives sur la génétique, l'épigénétique et la biologie de la FSHD ont permis de mieux définir cette myopathie complexe. D'un point de vue génétique, la FSHD s'avère découler de la combinaison des trois évènements génétiques sur le locus 4q35 : des délétions de répétitions D4Z4 dont le nombre résiduel est inférieur à 10, et des deux polymorphismes 4qA et 4qA161. Ces évènements génétiques sont accompagnés d'un changement de la conformation et une relaxation chromatinienne propice à la transcription et l'expression de *DUX4*, gène majeur de la FSHD, ainsi que d'autres gènes à proximité. Enfin la pathophysiologie de cette myopathie est de mieux en mieux comprise grâce aux découvertes des anomalies transcriptomiques, protéomiques et cellulaires décrites dans le cadre de la FSHD. Cependant, plusieurs aspects de la maladie demeurent incompris et les recherches des mécanismes moléculaires sous-jacents restent une des priorités de la communauté scientifique afin d'orienter la recherche et le développement de nouvelles thérapies.

Dans ce cadre général, les problématiques de mon travail de thèse s'inscrivent à la fois dans un cadre fondamental par la caractérisation phénotypique et moléculaire des myoblastes FSHD par l'étude des **dommages à l'ADN** et du **stress oxydant**, et dans une optique à visée thérapeutique dans le cadre d'une proposition de **correction génomique** des évènements génétiques causant la FSHD.

Malgré le fait que la FSHD soit une maladie multigénique et que la découverte des mécanismes moléculaires sous-jacents n'est pas encore conclusive, plusieurs travaux suggèrent que *DUX4*, surexprimé dans la FSHD, est un acteur majeur dans cette myopathie. Plusieurs particularités cellulaires, caractéristiques des myoblastes FSHD *in vitro*, notamment l'hypersensibilité au stress oxydant et l'altération du processus de la différenciation myogénique, semblent être en lien avec l'expression aberrante de *DUX4*. Le stress oxydant peut, en attaquant l'ADN, menacer l'intégrité génomique. Par ailleurs, il est largement reconnu que le stress oxydant et les dommages de l'ADN peuvent affecter la différenciation myogénique et la fonction musculaire. Dans ce cadre-là, le but principal de mon travail de thèse consistait à mettre en évidence la présence constitutive de dommages de l'ADN liés à une surproduction basale de ROS dans les myoblastes primaires FSHD en culture, le lien avec la surexpression de *DUX4*, ainsi que la participation du stress oxydant au phénotype défectueux des myotubes FSHD. Cet objectif constituait le sujet principal de ma thèse. En outre, une

évaluation globale de l'efficacité de la réparation de l'ADN des myoblastes FSHD en réponse à de faibles/fortes doses d'un traitement oxydant exogène a accompagné ce premier axe de recherche. Les résultats obtenus font l'objet de publications aux travers de deux articles originaux, et sont décrits et commentés dans la première partie des Résultats.

Mise à part la complexité génétique de la maladie, la recherche d'une stratégie thérapeutique ciblée à la FSHD se heurte au manque d'un modèle animal adéquat et aux limitations actuelles des thérapies cellulaires et géniques des myopathies. A ce jour, la FSHD demeure une maladie incurable. Néanmoins, l'espoir de développer une cure pour la FSHD est loin d'être perdu, surtout depuis la découverte des nouveaux outils de l'ingénierie génétique conçus pour induire des coupures génomiques ciblées, notamment le système CRISPR/Cas9, et de la multiplication de leurs applications thérapeutiques réussies dans le cadre de plusieurs maladies. Corriger au niveau génomique les cellules issues de patients FSHD à l'aide d'une thérapie génomique ciblée *in vitro* pourrait ultérieurement servir lorsqu'une thérapie cellulaire adaptée aux myopathies en général, et à la FSHD en particulier, serait établie. Tenant compte de l'association des trois évènements génétiques sur le locus 4q35 causant la FSHD, réparer au moins un de ces évènements à l'aide des outils de l'édition génomique pourrait potentiellement atténuer voire éliminer cette maladie/les caractéristiques cellulaires pathologiques liées à cette myopathie. Partant de cette hypothèse, plusieurs approches thérapeutiques *in vitro* peuvent être envisagées dont celle, développée lors de mon travail de thèse, qui concerne le polymorphisme « pathogénique » 4qA161 touchant l'insulateur FR-MAR et modifiant la conformation chromatinienne de la région 4q35. La deuxième partie de mon travail de thèse consiste donc à développer deux approches d'édition génomique visant 4qA161 et ayant pour but ultime le rétablissement de la fonction insulatrice de FR-MAR et la conformation chromatinienne de la région 4q35. L'ensemble des résultats et des données obtenus sont décrits et commentés dans la deuxième partie des Résultats et font l'objet, pour une partie d'entre eux, d'une publication.

Résultats

1 DUX4 induit des dommages à l'ADN et un stress oxydant affectant la différenciation myogénique des myoblastes FSHD

Dmitriev P*, **Bou Saada Y***, et al. DUX4-induced constitutive DNA damage and oxidative stress contribute to aberrant differentiation of myoblasts from FSHD patients. *Free Radical Biology and Medicine*, 99:244-258

Les myoblastes primaires FSHD cultivés *in vitro* se caractérisent par des anomalies cellulaires et phénotypiques. Ces anomalies concernent la différenciation myogénique marquée par une morphologie défectueuse des myotubes FSHD *in vitro* (Barro et al. 2010; Dib et al. 2015) et accompagnée d'une dérégulation de l'expression de gènes impliqués dans la différenciation myogénique (Bakay et al. 2006; Winokur, Chen, et al. 2003; Celegato et al. 2006; Dmitriev et al. 2013). De plus, les myoblastes FSHD souffrent d'une hypersensibilité au stress oxydant (Winokur, Barrett, et al. 2003; Barro et al. 2010) et de la dérégulation de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant (Winokur, Barrett, et al. 2003; Laoudj-Chenivesse et al. 2005; Cheli et al. 2011; Tsumagari et al. 2011). Plusieurs marqueurs du stress oxydant (protéines carbonylées, peroxydation lipidique, faible ratio glutathion réduit/glutathion oxydé) ont été trouvés dans les biopsies provenant de patients FSHD (Turki et al. 2012), laissant penser à un stress oxydant endogène dans les myoblastes FSHD. D'une façon intéressante, ces anomalies cellulaires et phénotypiques ont été retrouvées dans des cultures cellulaires surexprimant *DUX4* (Bosnakovski, Xu, et al. 2008; Vanderplanck et al. 2011) et étaient aussi accompagnées d'une dérégulation de l'expression de gènes impliqués dans la détoxification des ROS (Bosnakovski, Xu, et al. 2008; Sharma et al. 2013). L'ensemble de ces données convergent vers l'hypothèse que l'expression de *DUX4* est connectée au stress oxydant.

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) peuvent attaquer l'ADN cellulaire. Les dommages de l'ADN et les ROS interférent dans différents stimuli physiologiques ; ils peuvent en effet affecter la formation de myotubes entrainant ainsi des conséquences pathologiques (Morel & Barouki 1999; Puri et al. 2002). A partir de ces données de la littérature, nous nous sommes intéressés dans cette première partie à **mettre en évidence la présence de dommages à l'ADN et de ROS induits par *DUX4* dans**

les myoblastes FSHD ainsi qu'à leur implication dans la différenciation myogénique défectueuse observée *in vitro* dans le cadre de cette myopathie.

Ce chapitre de la partie « Résultats » relate et résume le projet principal de ma thèse. La majorité du temps de travail a été consacrée à la mise au point et l'application du test des comètes, des expériences d'immunofluorescence, des expériences de gain et de perte de fonction de *DUX4*, de la mesure des ROS, des expériences de différenciation myogénique en présence des différents traitements antioxydants ainsi qu'à la rédaction d'une partie de l'article scientifique et à sa révision.

Free Radical Biology and Medicine 99 (2016) 244–258

Contents lists available at ScienceDirect

Free Radical Biology and Medicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/freeradbiomed

Original article

DUX4-induced constitutive DNA damage and oxidative stress contribute to aberrant differentiation of myoblasts from FSHD patients

Petr Dmitriev [a,b,1], Yara Bou Saada [a,1], Carla Dib [a], Eugénie Ansseau [d], Ana Barat [a], Aline Hamade [e], Philippe Dessen [c], Thomas Robert [c], Vladimir Lazar [c], Ruy A.N. Louzada [g], Corinne Dupuy [g], Vlada Zakharova [f], Gilles Carnac [b], Marc Lipinski [a], Yegor S. Vassetzky [a,f,*]

[a] UMR 8126, Univ. Paris-Sud, CNRS, Institut de Cancérologie Gustave-Roussy, F-94805 Villejuif, France
[b] PhyMedExp, University of Montpellier, INSERM U1046, CNRS UMR 9214, F-34295 Montpellier cedex 5, France
[c] Functional Genomics Unit, Institut de Cancérologie Gustave-Roussy, F-94805 Villejuif, France
[d] Laboratory of Molecular Biology, University of Mons, 20 place du Parc, B700 Mons, Belgium
[e] ER030-EDST, Department of Life and Earth Sciences, Faculty of Sciences II, Lebanese University, Lebanon
[f] Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, 119991 Moscow, Russia
[g] UMR 8200, Univ., Paris-Sud, CNRS, Institut de Cancérologie Gustave-Roussy, F-94805 Villejuif, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 31 March 2016
Received in revised form
4 August 2016
Accepted 8 August 2016
Available online 9 August 2016

Keywords:
Facioscapulohumeral dystrophy
DNA damage
DUX4
Oxidative stress
Antioxidants

ABSTRACT

Facioscapulohumeral dystrophy (FSHD) is one of the three most common muscular dystrophies in the Western world, however, its etiology remains only partially understood. Here, we provide evidence of constitutive DNA damage in *in vitro* cultured myoblasts isolated from FSHD patients and demonstrate oxidative DNA damage implication in the differentiation of these cells into phenotypically-aberrant myotubes. Double homeobox 4 (DUX4), the major actor in FSHD pathology induced DNA damage accumulation when overexpressed in normal human myoblasts, and RNAi-mediated DUX4 inhibition reduced the level of DNA damage in FSHD myoblasts. Addition of tempol, a powerful antioxidant, to the culture medium of proliferating *DUX4*-transfected myoblasts and FSHD myoblasts reduced the level of DNA damage, suggesting that DNA alterations are mainly due to oxidative stress. Antioxidant treatment during the myogenic differentiation of FSHD myoblasts significantly reduced morphological defects in myotube formation. We propose that the induction of DNA damage is a novel function of the DUX4 protein affecting myogenic differentiation of FSHD myoblasts.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Facioscapulohumeral dystrophy (FSHD) is an autosomal dominant disease manifesting mainly as wasting of specific groups of facial and limb muscles. The prevalence of FSHD is estimated to be as high as 8 in 100,000 suggesting that it might be the most common muscular dystrophy in the Western world [1]. FSHD has been genetically linked to a shortened macrosatellite repeat array D4Z4, specific polymorphisms and sequence variants on the long arm of chromosome 4 (region 4q35) which together are thought to create a context permissive for aberrant gene expression (reviewed in [2,3]).

Every D4Z4 repeat on chromosome 4q35 contains a promoter and a coding region for the *DUX4* gene. Several studies have documented a higher level of expression of *DUX4* as well as several proximally located genes in FSHD cells and tissues (reviewed in [2,3]). Transcriptomic and proteomic studies have revealed an abnormal expression of a number of mRNA, microRNAs and proteins in *in vitro* cultured myoblasts isolated from FSHD patients as compared to healthy controls [4–18].

In vitro cultured FSHD myoblasts which suffer from a defect in the myogenic differentiation program [5], demonstrate a low fusion index and morphological abnormalities when differentiated into myotubes [18,19] and are sensitive to oxidative stress [19,20]. In agreement with these observations, it was demonstrated that the expression of oxidative stress-related genes was altered in FSHD cells [7,8,11,12,20,21] and tissues [9,22] suggesting that FSHD cells might be subjected to an endogenous oxidative stress.

Increasing evidence indicates that oxidative stress can reduce the differentiation efficiency of human myoblasts; persistent reactive oxygen species (ROS) act as signaling molecules in several

* Corresponding author at: UMR 8200, Univ., Paris-Sud, CNRS, Institut de Cancérologie Gustave-Roussy, F-94805 Villejuif, France.
E-mail address: vassetzky@igr.fr (Y.S. Vassetzky).
[1] These authors contributed equally to this work.

http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.007
0891-5849/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

physiological processes in human skeletal muscle cells, they are notably known to affect their morphology and function (for review see [23,24]); both increased mitochondrial production of ROS and NF-kB signaling linked to increased production of ROS can lead to muscle atrophy [25,26].

Several previous observations suggest that increased *DUX4* expression might provoke oxidative stress. DUX4, when overexpressed in mouse immortalized myoblasts C2C12 or human rhabdomyosarcoma cell line RD, altered the expression of genes controlling redox balance and genes involved in the Nrf2-mediated oxidative stress response pathway [21,27]. Furthermore, inducible *DUX4* overexpression in C2C12 cells rendered them more sensitive to paraquat, a pro-oxidant compound [27]. However, the increased production of ROS in cells overexpressing *DUX4* has never been demonstrated directly.

Oxidative stress is known to induce toxic effects through production of peroxides and free radicals that damage proteins, lipids, and DNA in the cell. DNA damage and genetic instability are known to be involved in the etiology of many human diseases including cancer, neurodegenerative disorders, and aging (for review see [28,29]) and were also described in Duchenne (DMD) and Limb-girdle Muscular (LGMD) dystrophies, but not in FSHD [30] (for review see [31]).

Here we describe a novel phenotypic feature of *in vitro* cultured FSHD myoblasts: a high level of DNA damage lesions, increased production of ROS and upregulation of many genes related to DNA damage repair. Furthermore, we demonstrated for the first time that *DUX4* overexpression in human immortalized myoblasts results in a higher level of ROS in these cells. We also demonstrated that DNA damage and increased production of ROS were closely implicated in FSHD pathophysiology and that treatment of FSHD myoblasts with an antioxidant during myogenic differentiation significantly improved the phenotype of resulting FSHD myotubes.

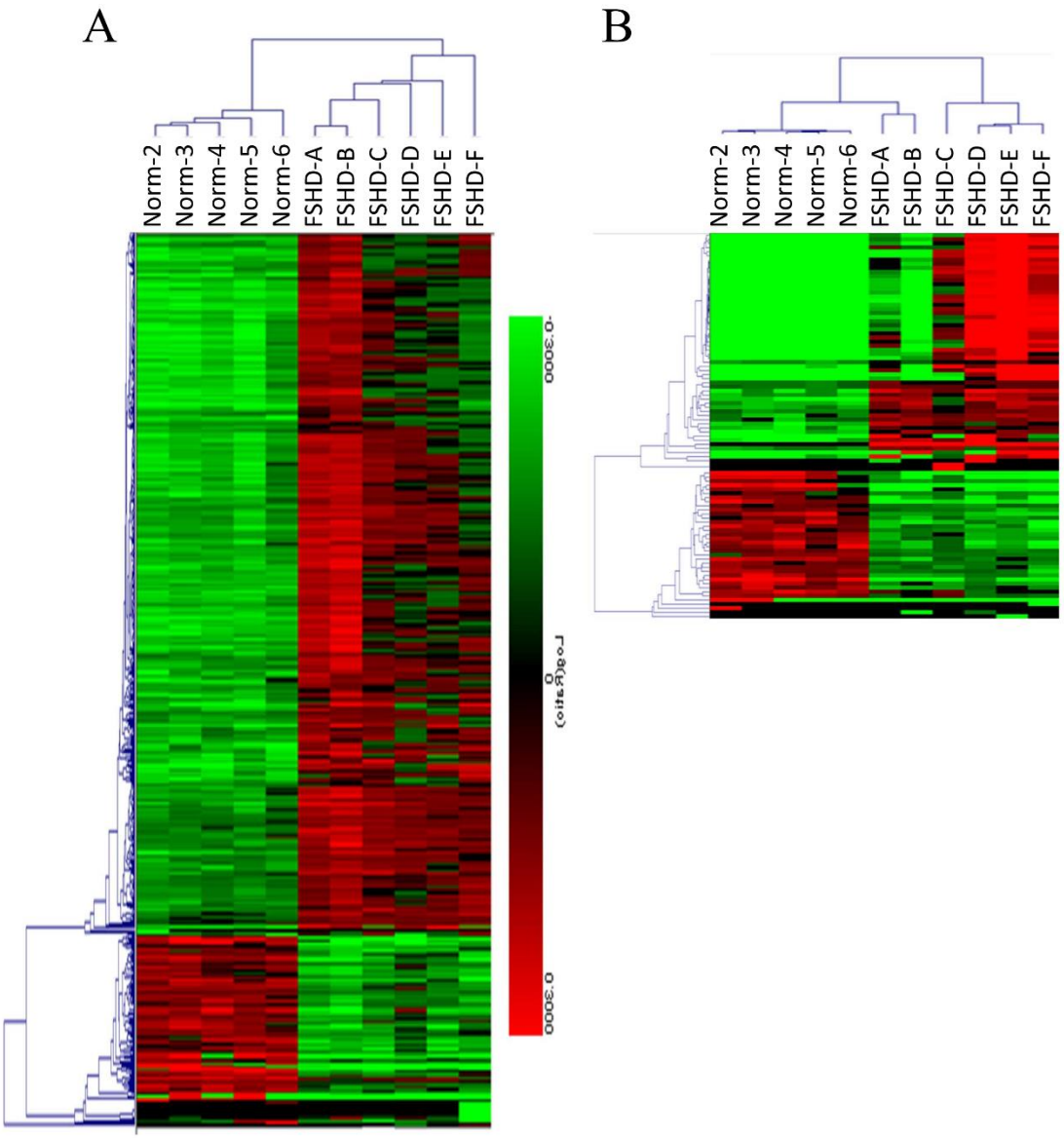


Fig. 1. Supervised clustering of gene expression profiles of *in vitro* cultured primary myoblasts (A) isolated from five healthy individuals (Norm-2,3,4,6) and six FSHD patients (FSHD-A,B,C,D,E,F) and myotubes derived from these myoblasts (B).

2. Results

2.1. Transcriptome profiling of FSHD myoblasts

Several transcriptome analyses of FSHD muscles have been carried out so far, but many of these studies were done either on biopsies or on non-purified myoblasts containing contaminating fibroblasts and adipocytes [7,10,12]. To gain insight into mechanisms of FSHD, we have analyzed transcriptional profiles in purified $CD56^+$ myoblasts and myotubes derived from either normal subjects or FSHD patients as described elsewhere [19]. Agilent Human Genome $8 \times 44K$ microarrays were used to identify differentially expressed genes as described in Materials and Methods. Microarray analysis of FSHD myoblasts revealed 312 up- and 88 downregulated protein-coding genes (Fig. 1**A**), while only 71 and 38 protein-coding genes were respectively up- and downregulated in FSHD myotubes (Fig. 1**B**) as compared to myoblasts and myotubes isolated from healthy subjects (Table 1**,** Supplementary Tables S1, S3–6).

The functional annotation of 312 genes upregulated in FSHD myoblasts resulted in 8 superclusters, each integrating several similar Gene Ontology (GO) functional categories (Supplementary Table S2); the three largest superclusters were *Regulation of cell cycle*, *DNA repair* and *Chromatin organization*. Interestingly, 29 genes upregulated in FSHD myoblasts were involved both in cell cycle regulation and DNA damage detection and repair. In total, 54 genes upregulated in proliferating FSHD myoblasts were involved in DNA damage repair (Table 2 **and** Supplementary Table S4).

Genes downregulated in FSHD myoblasts constituted a unique functional class, *Cell adhesion*; genes upregulated in FSHD myotubes produced a single marginally significant GO functional category, *Cell motility and migration*, while no significant functional category could be attributed to the genes downregulated in FSHD myotubes (Table 3 and Supplementary Table S5).

2.2. DNA damage in FSHD myoblasts

In order to substantiate the transcriptomic data, we tested the phosphorylation of histone H2A variant H2AX at Ser-139 (γH2AX), a marker for DNA damage that correlated with the presence of DNA double-stranded breaks (DSB). Using immunoblotting we found that the overall level of γH2AX in the protein extracts of FSHD myoblasts was significantly higher as compared to normal myoblasts (Fig. 2A and B). Immunofluorescent microscopy revealed a higher percentage of nuclei with γH2AX foci in FSHD myoblasts than in normal cells (Fig. 2C and D). The observation that a large number of DNA Damage Response (DDR)-related genes were upregulated in FSHD myoblasts and were accompanied by a significantly higher level of γH2AX foci as well as a higher level of the overall γH2AX prompted us to test the integrity of DNA in these cells. We quantified the number of apurinic/apyrimidinic (AP)-sites using ELISA. Single-stranded breaks (SSB) and DSB breaks were quantified using single-cell gel electrophoresis (comet assay) in alkaline conditions [32–34].

FSHD cells showed approximately 1.6 times more AP sites than normal myoblasts (Fig. 2E and Supplementary Fig. S1D), and the genomic DNA of normal cells contained significantly fewer breaks as compared to FSHD myoblasts, as shown by the analysis of the comet tail moment (TM) which reflects the degree of DNA damage (Fig. 3A, B and Supplementary Fig. S1A, B, C). In addition, the analysis of the TM distribution was distinct between FSHD and normal myoblasts; the TM of the majority of FSHD cells ranged

Table 1
Top-10 protein-coding genes differentially expressed in FSHD myoblasts (MB) and myotubes (MT) from 6 FSHD patients, as compared to those from 5 normal individuals. Members of the same gene family were omitted; FC - Fold change FSHD *vs.* normal samples.

MB upregulated			**MT upregulated**		
FC	**Gene name**	**Description:**	**FC**	**Gene name**	**Description:**
7.1	KCNA1	potassium channel, voltage gated shaker related subfamily A, member 1	79.2	RFPL2	ret finger protein-like 2
4.5	CALCR	calcitonin receptor	60.3	TRIM43	tripartite motif containing 43
3.4	ZYG11A	zyg-11 family member A, cell cycle regulator	48.1	PRAMEF1	PRAME family member 1
3.2	MPP4	membrane protein, palmitoylated 4 (MAGUK p55 subfamily member 4)	45.3	TRIM64	tripartite motif containing 64
2.8	COL13A1	collagen, type XIII, alpha 1	40.9	LEUTX	leucine twenty homeobox
2.8	PCDH9	protocadherin 9	30.2	SLC34A2	solute carrier family 34 (type II sodium/phosphate co-transporter), member 2
2.4	EPB41L4B	erythrocyte membrane protein band 4,1 like 4B	28.9	ZSCAN4	zinc finger and SCAN domain containing 4
2.4	ZNF367	zinc finger protein 367	25.7	KHDC1	KH homology domain containing 1
2.3	FAM111B	family with sequence similarity 111, member B	22.8	CCNA1	cyclin A1
2.3	TCF19	transcription factor 19	17.8	MBD3L3	methyl-CpG binding domain protein 3-like 3
303 more genes with FC > 1.2			**61 more gene with FC > 1.2**		
MB downregulated			**MT downregulated**		
FC	**Gene name**	**Description:**	**FC**	**Gene name**	**Description:**
−7.5	XAGE2	X antigen family, member 2	−16.6	PCDH10	protocadherin 10
−6.9	PCDH10	protocadherin 10	−7.3	AMPD1	adenosine monophosphate deaminase 1
−5.9	SEMA3E	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3E	−4.6	TP63	tumor protein p63
−5.3	CLSTN2	calsyntenin 2	−3.6	TRPA1	transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1
−4.8	DGKB	diacylglycerol kinase, beta 90 kDa	−3.1	PIEZO2	piezo-type mechanosensitive ion channel component 2
−4.4	PGM5	phosphoglucomutase 5	−3.0	RAET1E	retinoic acid early transcript 1E
−4.2	GRIP2	glutamate receptor interacting protein 2	−2.7	BCAS1	breast carcinoma amplified sequence 1
−3.5	APOE	apolipoprotein E	−2.2	TXLNB	taxilin beta
−3.2	VNN1	vanin 1	−2.2	LMOD3	leiomodin 3 (fetal)
−3.2	PRKG1	protein kinase. cGMP-dependent, type I	−2.0	LSMEM2	leucine-rich single-pass membrane protein 2
78 more genes with FC < −1.2			**28 more genes with FC < −1.2**		

Table 2
Functional classification of the 54 DNA damage-related genes differentially expressed in FSHD.

Gene name	Cell_cycle	DNA_Replication	DNA_repair	Chromatin_organization	Chromosome_segregation	Cytoskeleton	Meiosis	Cell_signaling	FC	Description
BLM	X	X	X	X					1.9	Bloom syndrome, RecQ helicase-like
BRCA1	X	X	X		X	X			1.7	breast cancer 1, early onset
BRCA2	X	X	X	X		X	X		1.9	breast cancer 2, early onset
CDC25C	X	X	X						1.9	cell division cycle 25 C
CDC6	X	X	X						1.9	cell division cycle 6
CDK2	X	X	X						1.8	cyclin-dependent kinase 2
CDT1	X	X	X						2.1	chromatin licensing and DNA replication factor 1
CENPF	X	X	X	X	X				1.9	centromere protein F, 350/400 kDa
CHAF1A	X	X	X	X					1.6	chromatin assembly factor 1, subunit A (p150)
CHAF1B	X	X	X	X					2.2	chromatin assembly factor 1, subunit B (p60)
CLSPN	X	X	X						2.1	claspin
DBF4	X	X	X						1.6	DBF4 zinc finger
DSCC1	X	X	X	X	X				1.9	defective in sister chromatid cohesion 1 homolog (S. cerevisiae)
DTL		X	X						2.1	denticleless E3 ubiquitin protein ligase homolog (Drosophila)
ESCO2	X		X						2.0	establishment of sister chromatid cohesion N-acetyltransferase 2
EXO1	X		X				X		1.8	exonuclease 1
FANCC			X						1.4	Fanconi anemia, complementation group C
FANCD2	X		X	X			X		2.0	Fanconi anemia, complementation group D2
FANCI	X		X						1.7	Fanconi anemia, complementation group I
FEN1		X	X					X	1.6	flap structure-specific endonuclease 1
H2AFX	X		X	X			X		1.6	H2A histone family, member X
HELLS	X		X	X					1.9	helicase, lymphoid-specific
HMGB1		X	X	X					1.5	high mobility group box 1
KIF22	X		X			X			1.6	kinesin family member 22
LIN9	X	X	X						1.7	lin-9 DREAM MuvB core complex component
MCM10		X	X						2.1	minichromosome maintenance complex component 10
MCM2	X	X	X	X					1.7	minichromosome maintenance complex component 2
MCM3	X	X	X						1.8	minichromosome maintenance complex component 3
MCM5	X	X	X						1.8	minichromosome maintenance complex component 5
MND1	X		X				X		1.9	meiotic nuclear divisions 1 homolog (S. cerevisiae)
MSH2	X		X	X					1.6	mutS homolog 2
NEIL3			X						2.2	nei endonuclease VIII-like 3 (E. coli)
PCNA		X	X					X	1.6	proliferating cell nuclear antigen
POLD3		X	X						1.6	polymerase (DNA-directed), delta 3, accessory subunit
POLE2		X	X						2.1	polymerase (DNA directed), epsilon 2, accessory subunit
POLQ		X	X						2.2	polymerase (DNA directed), theta
PRIM1		X	X						2.2	primase, DNA, polypeptide 1 (49 kDa)
PSIP1			X						1.9	PC4 and SFRS1 interacting protein 1
RAD51	X	X	X				X		1.8	RAD51 recombinase
RAD51AP1			X						1.9	RAD51 associated protein 1
RECQL4			X						1.5	RecQ protein-like 4
RFC2		X	X						1.7	replication factor C (activator 1) 2, 40 kDa
RFC4		X	X					X	1.7	replication factor C (activator 1) 4, 37 kDa
RFC5		X	X						2.0	replication factor C (activator 1) 5, 36.5 kDa
RNASEH2A		X	X						1.7	ribonuclease H2, subunit A
RPA1	X	X	X	X			X		1.4	replication protein A1, 70 kDa
RRM1		X	X						1.5	ribonucleotide reductase M1
RRM2		X	X						2.2	ribonucleotide reductase M2
TIPIN	X	X	X						1.6	TIMELESS interacting protein
TK1		X	X						1.7	thymidine kinase 1, soluble
TOP2A		X	X	X	X			X	1.8	topoisomerase (DNA) II alpha 170 kDa
TYMS		X	X					X	1.9	thymidylate synthetase
USP1			X						1.5	ubiquitin specific peptidase 1
WRAP53			X	X					1.5	WD repeat containing, antisense to TP53

Table 3
Functional classification of genes differentially expressed in FSHD. MB, Myoblasts, MT Myotubes, FDR False discovery rate. P-value and FDR of a supercluster (Supplementary Table S2) correspond to those of the most significant GO function within it.

MB upregulated	**No of genes**	**p-value**	**FDR**
Unique protein-coding genes (FC > 1.2)	313		
Genes with a known function indexed in GO	266		
Best values for a random list	**266**	**1.60E-04**	**2.70E-01**
Functional supercluster			
Cell_cycle	109	4.50E-72	7.30E-69
DNA_Replication_and_nucleotide_biosynthesis	38	1.00E-29	1.60E-26
DNA_repair	54	1.40E-28	2.20E-25
Chromosome_and_chromatin_organization	68	1.60E-28	2.50E-25
Chromosome_segregation	26	9.80E-26	1.60E-22
Microtubule_cytoskeleton_organization and localization	34	8.20E-20	1.30E-16
Meiosis	14	5.90E-09	9.50E-06
Cell_signaling	18	1.70E-07	2.70E-04
Total unique genes	170		
MB downregulated	**No of genes**	**p-value**	**FDR**
Unique protein-coding genes(FC < − 1.2)	88		
Genes with a known function indexed in GO	75		
Best values for a random list	**75**	**4.50E-03**	**6.60E+00**
Significant functional category (DAVID)			
none			
MT upregulated	**No of genes**	**p-value**	**FDR**
Unique protein-coding genes(FC > 1.2)	71		
Genes with a known function indexed in GO	52		
Best values for a random list	**52**	**9.80E-03**	**1.40E+01**
Significant functional category (DAVID)			
GO:0016477~cell migration	4	9.70E-03	9.9E-1
MT downregulated	**No of genes**	**p-value**	**FDR**
Unique protein-coding genes(FC < − 1.2)	38		
Genes with a known function indexed in GO	27		
Best values for a random list	**27**	**6.70E-03**	**8.90E+00**
Significant functional category (DAVID)			
none			

between 100 and 150 (a.u.), whereas the TM of the majority of normal cells varied between 40 and 100 (a.u.) (Fig. 3C and Supplementary Fig. S1).

Cellular responses to DNA damage may induce cell cycle arrest. We next followed the cell cycle progression of several cultures of primary FSHD and normal myoblasts using BrdU labeling. The analysis of FACS data did not reveal any statistically significant deviation of the cell cycle distribution between FSHD and normal cells (Supplementary Figure S2). This result was in agreement with previous reports [35–37] and our own observations that *in vitro* cultured FSHD cells proliferated similarly to normal controls.

Taken together, our data clearly demonstrate higher levels of DNA damage in the FSHD myoblasts, although the extent of this damage was insufficient for cell cycle arrest.

2.3. *DUX4 induces DNA damage in FSHD*

In vitro overexpression of human *DUX4* gene in *in vitro* cultured mouse and human myogenic progenitor cells has been shown to interfere with their myogenic differentiation and to increase sensitivity to oxidative stress [27] thus reproducing some features of cultured FSHD myoblasts. In addition, overexpression of the human *DUX4* gene caused atrophy [38] and apoptosis [39] in human cells cultured *in vitro* and was deleterious for mouse and zebrafish muscles *in vivo* [40,41]. Together with the observation that RNAi-mediated *DUX4* inhibition was sufficient to reverse morphological abnormalities found in cultured FSHD myotubes [38], these findings suggest that *DUX4* overexpression may be one of the causes of FSHD.

To address the possibility that DUX4 might be also responsible for higher levels of DNA damage observed in FSHD cells, we overexpressed *DUX4* in human immortalized myoblasts and found that the level of DNA damage measured by the comet assay was 1.5 times higher in *DUX4*-overexpressing cells (Fig. 4**A**, **B**, **C** and Supplementary Figure S3). Similarly, the number of AP sites was two times higher in *DUX4*-overexpressing myoblasts as compared to the control cells (Fig. 4**D**). Furthermore, the analysis of γH2AX and DUX4 co-localization by immunofluorescence revealed that these two proteins were co-localized in 75% of *DUX4*-transfected cells *versus* 35% of *GFP*-transfected cells (Fig. 4**E**), and the overall level of γH2AX phosphorylation was higher in *DUX4*-overexpressing cells as compared to the control cells (Fig. 4**F** and **G**).

We then transfected primary myoblasts isolated from FSHD patients with siRNA against DUX4 and found that the *DUX4* knockdown diminished the level of DNA damage in FSHD myoblasts (Fig. 5). Taken together, our results demonstrate that the induction of DNA damage might be a novel FSHD-related function of DUX4.

FSHD cells are highly sensitive to oxidative stress [19,20,27]. However, a direct role of *DUX4* in the induction of oxidative stress has never been demonstrated. In order to determine the role of DUX4 in ROS generation, we have overexpressed *DUX4* in human immortalized myoblasts and measured the level of ROS using the dihydroethidium (DHE), a ROS fluorescent sensor probe that, once oxidized in the presence of cellular oxidants, exhibits a red fluorescence. We observed that the level of ROS was increased in *DUX4*-overexpressing myoblasts as compared to the controls (Fig. 6**A, C** and Supplementary Figure S4A). Furthermore, we confirmed this result by a complementary sensitive approach that uses Amplex Red probe (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) to detect H_2O_2

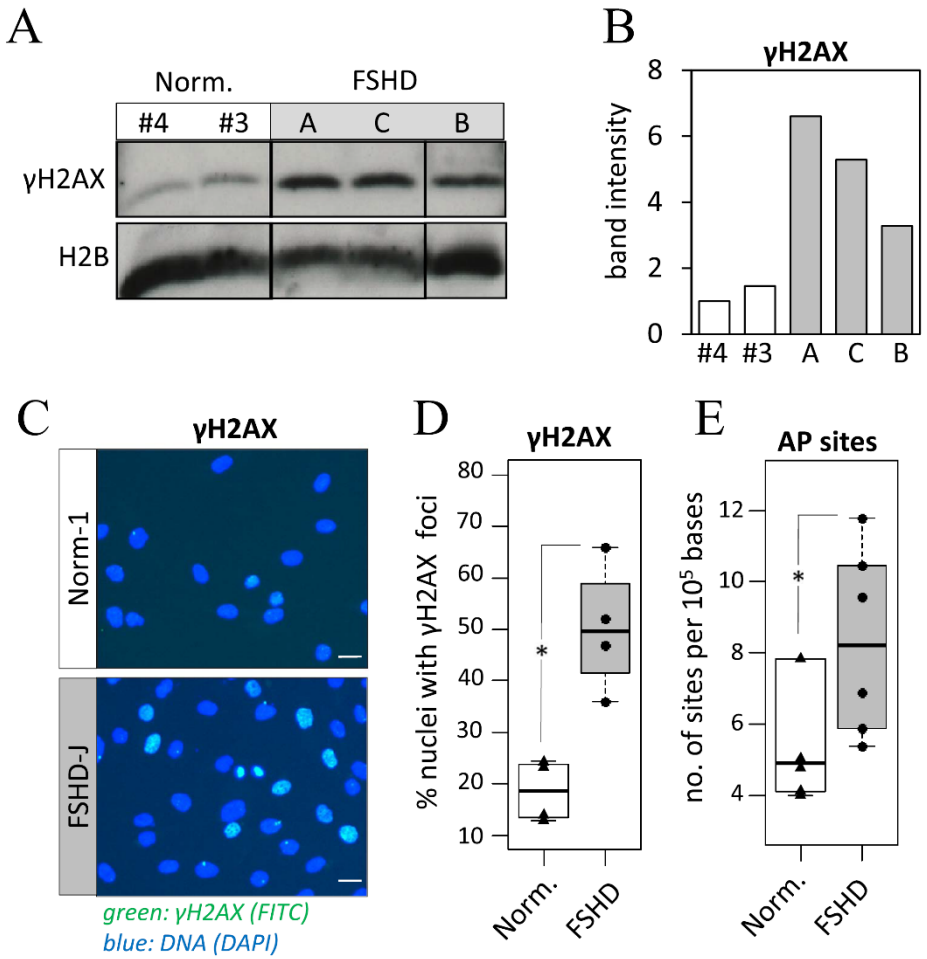


Fig. 2. DNA damage markers in FSHD myoblasts. **A.** Western blot analysis of γH2AX protein levels in FSHD primary myoblasts from FSHD patients (FSHD-A,B,C) and healthy controls (Norm-3,4). **B.** Densitometry quantification of the western blot images shown in panel A, γH2AX was normalized to H2B protein levels. **C.** Immunofluorescent imaging of γH2AX foci labeled with Alexa 488 in primary myoblasts from the FSHD patient FSHD-J and a healthy subject Norm-1; representative images are shown; 20X magnification, bar = 10 μm. **D.** Quantification of nuclei of primary myoblasts from four healthy subjects Norm-1,3,6,5 (triangles) and four FSHD patients FSHD-E,G,H,J (dots) containing γH2AX foci. Each dot/triangle in the boxplot represents the percentage of γH2AX foci in one cell culture, calculated from at least 100 nuclei. (*) - *t*-test p-value < 0.05. For given sample size and type I error rate alpha = 5%, power = 0.95. **E.** Average number of apurinic/apyrimidinic (AP) sites in primary myoblasts from six FSHD patients (FSHD-A,B,C,D,E,F) and five healthy controls (Norm-2,3,4,5,6); (*) *t*-test p-value < 0.05.

released to the extracellular space (Supplementary Figure S5) [42].

We hypothesized that the increased production of ROS in *DUX4*-overexpressing cells was a direct cause of DNA damage; therefore we treated *DUX4*-transfected cells with tempol, a potent antioxidant, and found that in the presence of tempol, the level of ROS significantly decreased (Fig. 6**A, B, C** and Supplementary Figure S4B, C) and the amount of DNA lesions was similar in *DUX4*-transfected cells as in mock-transfected and *GFP*-transfected cells (Fig. 4**A, B, C** and Supplementary Figure S3). This result indicates that the mechanism of DNA damage induced by DUX4, involves increased production of ROS in the cell.

2.4. DNA damage in FSHD myoblasts is provoked by ROS

Despite a number of studies, the oxidative stress has never been directly demonstrated in *in vitro* cultured FSHD cells. By measuring DHE fluorescence, we found that the level of ROS was considerably higher in *in vitro* cultured FSHD myoblasts as compared to normal controls (Fig. 6**D, E, F** and Supplementary Figure S6).

We then asked whether the DNA damage observed in *in vitro* cultured primary myoblasts from FSHD patients could be linked to oxidative stress. Thus we treated the FSHD myoblasts with tempol and quantified the level of DNA damage using comet assay. Our data clearly indicate that antioxidant-treated FSHD cells have a level of DNA damage indistinguishable from normal cells (Fig. 7). We concluded that the high level of DNA damage observed in FSHD myoblasts is provoked by higher levels of ROS.

2.5. DNA damage and ROS affect myogenic differentiation of FSHD myoblasts

In vitro cultured FSHD myoblasts give rise to abnormal myotubes upon myogenic differentiation induced by serum starvation [19]. These defects in differentiation could be due, at least partly, to overexpression of *DUX4* [38]. DNA damage and ROS can interfere with signal transduction pathways as they can act as second messengers for various physiological stimuli [43] and can thereby affect myotube formation and have pathological implications.

We have selected a primary FSHD culture, FSHD-F, known to differentiate into atrophic myotubes [18,19]. We treated proliferating myoblasts with 100 μM antioxidant tempol and 48 h post-treatment induced myogenic differentiation by serum starvation in the presence of tempol. Six days post-differentiation,

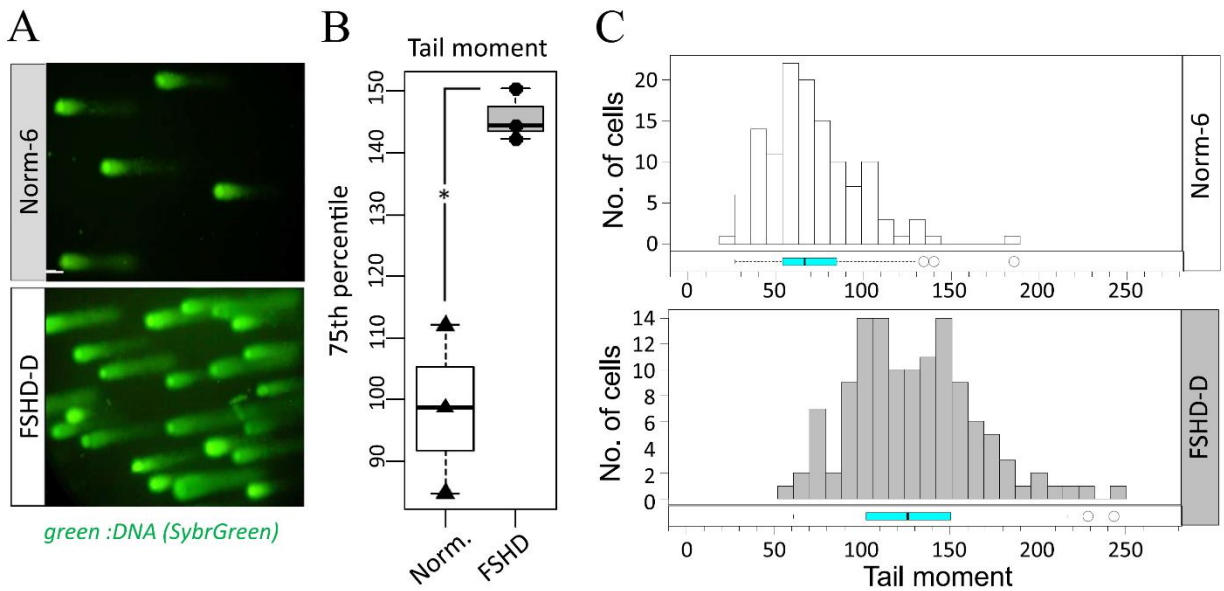


Fig. 3. DNA damage in FSHD myoblasts. **A**. Fluorescent imaging of primary myoblasts isolated from the FSHD patient FSHD-D and a healthy subject Norm-6 subjected to a single-cell electrophoresis (comet assay) and stained with SybrGreen; representative images are shown, 20X magnification, bar = 10 μm; **B**. 75th percentiles of comet tail moment distributions measured in primary myoblasts from three FSHD patients (FSHD-D,E,F) and three healthy controls (Norm-4,5,6), for each primary myoblast culture, at least 100 cells were analyzed; (*) *t*-test p-value < 0.05. For given sample size and type I error rate alpha = 5%, power = 0.989. **C**. Histogram and horizontally oriented boxplot showing the distribution of comet tail moments measured in primary myoblasts from patient FSHD-D (124 cells analyzed) and a healthy subject Norm-6 (125 cells analyzed); Distributions for other lines analyzed are shown in Supplementary Fig. S1.

non-treated FSHD-F myotubes were thin and atrophic, with a mean diameter of 11.7 μm. In the presence of tempol, the number of myotubes with larger diameter significantly increased and diameter reached a mean value of 15.1 μm (Fig. 8). We then tested another powerful antioxidant, N-Acetyl-L-cysteine (NAC), on FSHD-F myoblasts. NAC is a derivative of L-cysteine; its antioxidant activity is due to its ability to interact with the electrophilic groups of free radicals due to the presence of free thiol groups [44]. NAC was highly efficient and the diameter of NAC-treated FSHD-F myotubes (mean value of 21.3 μm) was closer to that of normal Norm-7 myotubes (mean value of 26.2 μm). These results suggest that oxidative stress affects myogenic differentiation process of FSHD myoblasts; it specifically contributes to establishment of phenotypically aberrant myotubes. The antioxidant treatment significantly improved the phenotype of FSHD myotubes.

3. Discussion

Here we performed a transcriptome profiling of $CD56^+$ FSHD myoblasts cultured *in vitro* by including a step of specific enrichment for myogenic cells and, thus avoided working on complex cell mixtures containing inflammatory-, connective tissue-, adipose tissue- and other cells; this excluded possible artifacts potentially introduced by the external factors such as inflammatory cells infiltrating FSHD muscles [45]. Previously, transcriptome and proteome profiling of FSHD biopsies and myoblasts demonstrated an abnormal expression of myogenesis-related mRNA and miRNAs [4–7,12,17]; cytoskeleton proteins [15]; genes related to oxidative stress [8,11,12,20]; vascular smooth muscle and endothelium cell-specific genes [9]; germline-related genes [13,14], genes specific to immune system [10] and others. Furthermore, abnormal expression of cell cycle-related genes has been documented using *in vitro* cultured FSHD myoblasts [11] and FSHD tissue samples [46]. In agreement with previous reports, we have found genes related to cytoskeleton (*i.e.* DIAPH3, PSRC1, TACC3) and oxidative stress (*i.e.* APOE, TRPA1, VNN1). Our transcriptome analysis also revealed an upregulation of many genes related to DNA damage repair in FSHD myoblasts. The probability of finding this group of genes linked by the common function by chance was very low (p-value = 1.4×10^{28}) and suggested the presence of a higher level of DNA damage in FSHD cells which was not previously observed. Here, by means of several techniques, we have demonstrated constitutive DNA damage in FSHD myoblasts.

Major DNA lesions include single-stranded DNA breaks (SSBs), double-stranded DNA breaks (DSBs) and abasic sites (AP-sites); they may be caused by external factors such as ionizing radiation, xenobiotic chemicals, UV, etc [47,48] and endogenous sources such as cellular metabolism [49], replicative stress and replicative fork collapse [50].

Since *in vitro* cell culture conditions excluded that the increased DNA damage in FSHD cells was due to external genotoxic factors, we focused on internal sources of DNA damage. At first, we ruled out the possibility that the DNA damage observed in FSHD cells was due to the replicative stress since in our experimental conditions, FSHD myoblasts were cycling normally and no difference in cell cycle progression was observed.

Another major internal cause of genomic DNA damage is cellular metabolism (for review see [28]) that routinely produces free radicals (ROS) reacting with the purine and pyrimidine bases and phosphate backbone of DNA.

As mentioned above, *in vitro* cultured myoblasts isolated from FSHD patients are sensitive to oxidative stress inducers Paraquat and H_2O_2 [19,20]. Coupled with the observation that the expression and biological activity of enzymes controlling the redox balance is altered in FSHD patients [22] these reports suggested that FSHD myoblasts might suffer from the endogenous oxidative stress, however, this has never been directly demonstrated before. Here, using fluorescent reactive oxygen species (ROS) sensor DHE, we could demonstrate that FSHD myoblasts contain higher level of ROS as compared to normal cells thus confirming the presence of oxidative stress in FSHD myoblasts *in vitro*. The DHE results were confirmed by Amplex Red data.

We then focused on the possibility that ROS was the major

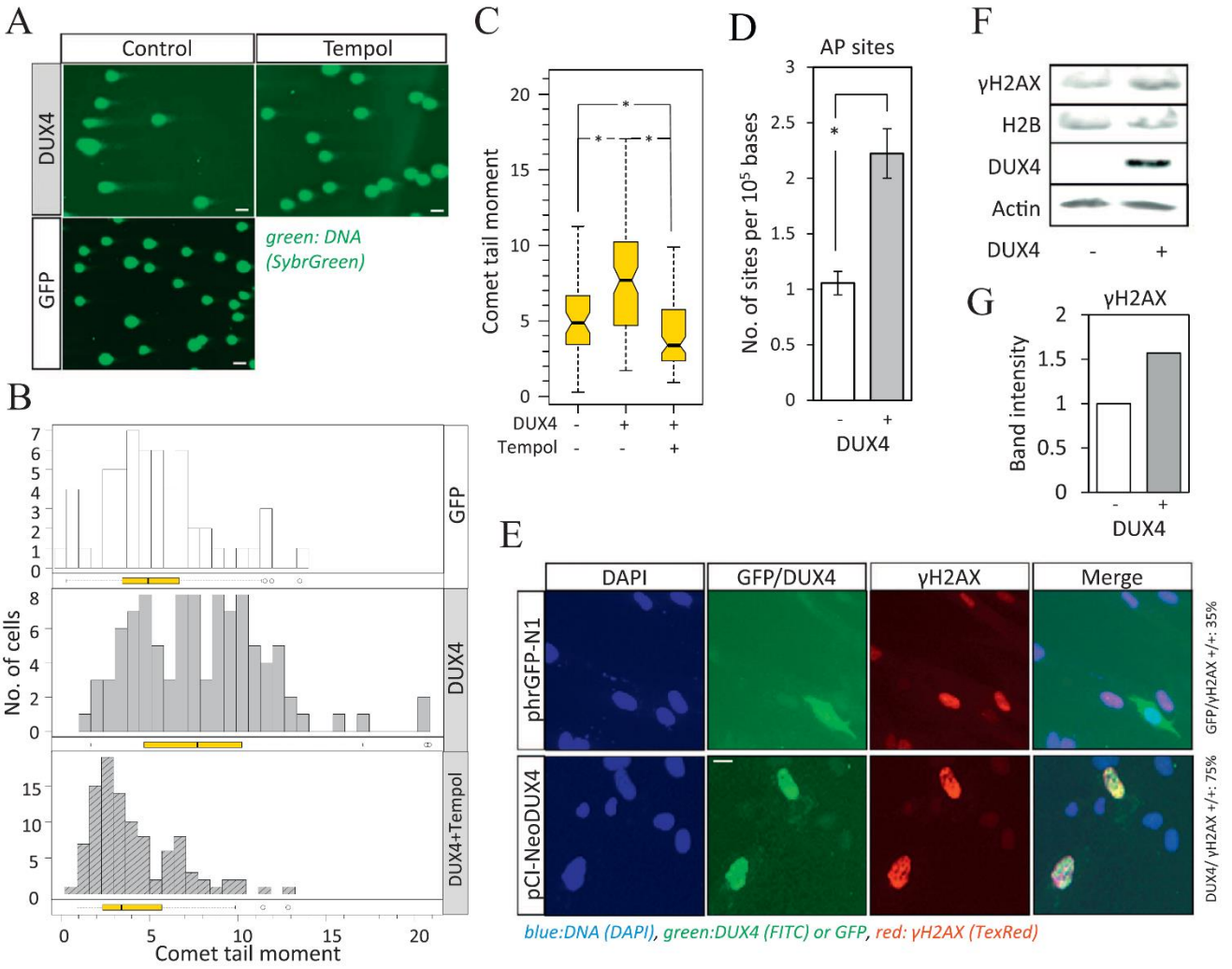


Fig. 4. DUX4-induced DNA damage in human myoblasts. **A.** Fluorescent imaging of DNA of human immortalized myoblasts transfected with pCI-Neo-DUX4 or control plasmid phrGFP-N1, treated or not with tempol and subjected to single cell alkaline gel electrophoresis (Comet assay), representative images at 20X magnification are shown, bar = 10 μm. **B.** Effect of tempol on the distribution of comet tail moments of immortalized myoblasts transfected with *DUX4* plasmid. At least 100 cells were analyzed per condition. **C.** Statistical analysis of comet tail moment distributions of human immortalized myoblasts transfected with *DUX4* or a control plasmid and treated or not with tempol. Results are obtained from 3 different experiments. (*) *t*-test p-value < 0.05. Notches indicate a confidence interval. **D.** Quantification of AP sites present in the DNA of rhabdomyosarcoma cells transfected with a *DUX4* or *GFP* plasmid. Results are obtained from 3 different experiments; (*) *t*-test p-value = 0.000176. **E.** Immunofluorescent imaging of human immortalized myoblasts transfected with pcI-Neo-DUX4 or phrGFP-N1 plasmid stained with antibodies against DUX4 and γH2AX; % of cells co-expressing *DUX4* and *γH2AX* or *GFP* and *γH2AX* and representative images at 20X magnification are shown, bar = 10 μm. **F.** Western blot analysis of *γH2AX* expression in rhabdomyosarcoma cells transfected with *DUX4* or *GFP* plasmid for 20 h. **G.** Densitometry quantification of the western blot images shown in **F**.

perpetrator in the development of a high level of damaged DNA in FSHD cells. The most stable product of oxidative modification of DNA is 8-hydroxy-2′-deoxyguanosine (8-OHdG) or its tautomer 8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosine (8-oxoG) (for review see [51]) which is excised by DNA glycosylases resulting in the creation of an AP-site. The AP-site is thereafter converted to a SSB which might eventually result in a DSB [52] (for review see [53]). The treatment of FSHD myoblasts with tempol, a powerful antioxidant, efficiently reduced the level of DNA breaks in FSHD myoblasts. Taken together, our results provide evidence that oxidative stress is the source of DNA damage observed in FSHD myoblasts cultured *in vitro*.

We next elucidated the mechanism leading to the onset of oxidative stress and DNA damage in FSHD cells. It has been previously observed that the overexpression of human *DUX4* gene in mouse immortalized myoblasts C2C12 altered the expression of genes controlling red-ox balance and increased the sensitivity of the cells to Paraquat [27]. However, the direct role of DUX4 in the induction of oxidative stress has never been demonstrated. Here, for the first time we directly tested the level of ROS in *DUX4*-transfected cells and found that *DUX4* overexpression considerably increased the ROS level in the cells. Furthermore, we found that *DUX4* overexpression induced DNA damage in normal cells while *DUX4* knockdown diminished the level of damaged DNA in FSHD myoblasts suggesting that elevated *DUX4* expression in FSHD might be responsible for the constitutional DNA damage observed in these cells.

DUX4 might induce DNA damage in several ways: DUX4 is known to control the expression of genes involved in the establishment of the red-ox balance in the cell [21,27]. Consequently, by altering the oxidative metabolism, *DUX4* overexpression might directly or indirectly induce DNA damage in FSHD cells. Indeed, addition of an antioxidant into the culture medium of *DUX4*-overexpressing cells completely reversed the effect of DNA damage induced by the overexpression of *DUX4*. Our results indicate that the mechanism of DUX4-dependent DNA damage is related to ROS production. Induction of DNA damage is a novel function of

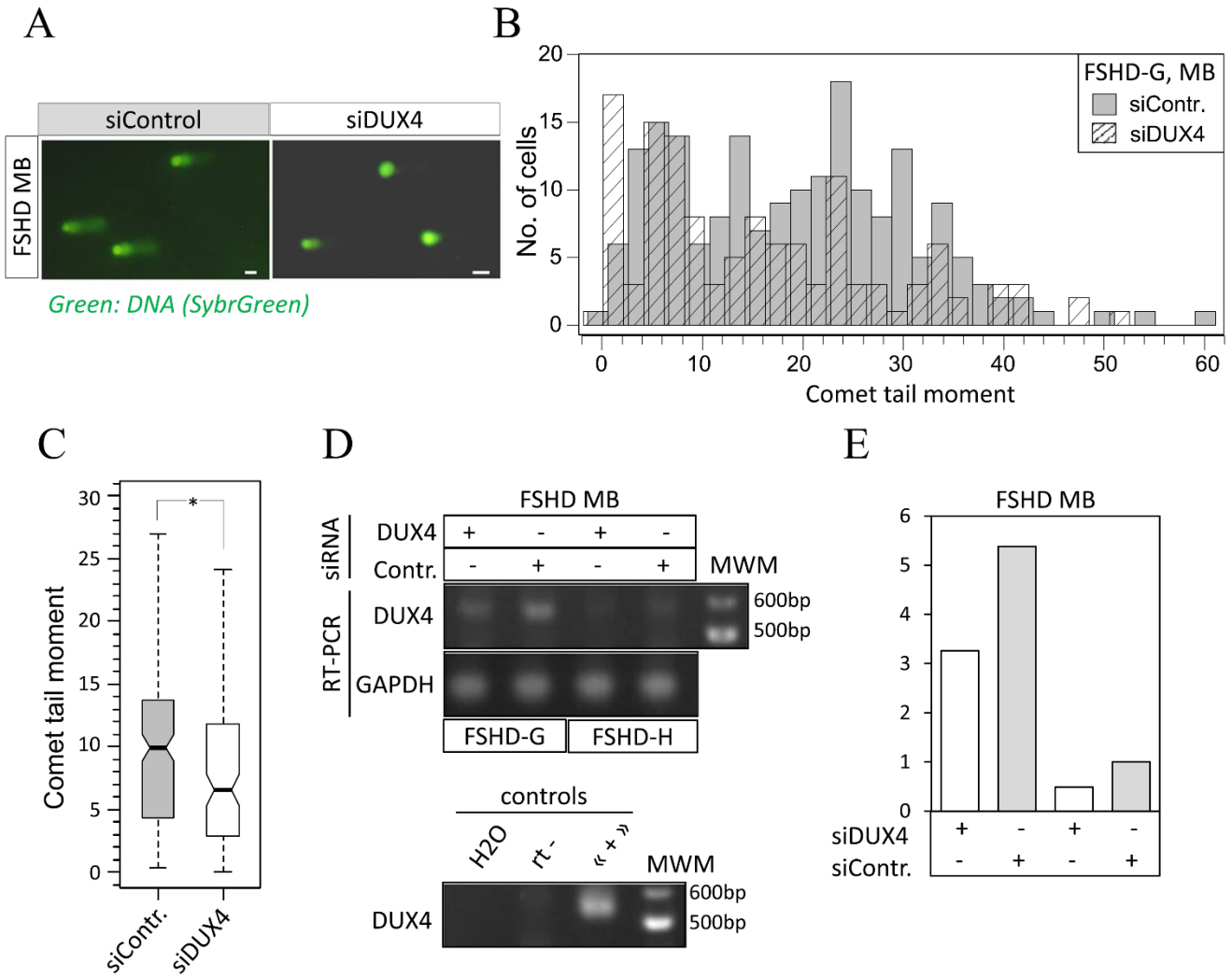


Fig. 5. Effect of *DUX4* knockdown on constitutive DNA damage in FSHD myoblasts. **A.** Fluorescent imaging of genomic DNA of FSHD myoblasts (FSHD-G) transfected with siRNA against DUX4 (siDUX4) or a control siRNA (siContr) and subjected to a single-cell gel electrophoresis in alkaline conditions, representative images with 10X magnification are shown, bar = 10 μm. **B.** Effect of *DUX4* knockdown on comet tail moment distribution for primary myoblasts from FSHD patient FSHD-G. 127 cells were analyzed for the "FSHD-G-siDUX4" condition and 193 cells - for "FSHD-G-siControl" condition. **C.** Statistical analysis of comet tail moment distributions shown in **B**; (*) *t*-test p-value < 0.05. **D.** *DUX4* expression in primary myoblasts isolated from two FSHD patients (FSHD-G and FSHD-H) and transfected with siRNA against DUX4 (siDUX4) or a control siRNA (siContr). RT-PCR products were separated on agarose gel and stained with EtBr. Below: RT-PCR controls: "+" - mouse C2C12 myoblasts transfected with a plasmid encoding two human D4Z4 elements encoding DUX4 under control of its natural promoter; "rt-" - no reverse transcriptase added to the reaction. "H_2O" - no template added to the reaction. MWM - molecular weight marker. **E.** Densitometry quantification of RT-PCR images from FSHD-G and FSHD-H shown in D.

DUX4 related to FSHD.

Genotoxic stress has been shown to interfere with normal myogenic differentiation (for review see [54]. Myoblasts carrying unrepaired DNA damage avoid formation of skeletal myofibers by prioritizing DNA repair over the activation of the myogenic program [55]. We then focused on the pathological implication of DNA damage and increased production of ROS on phenotype of FSHD myotubes and discovered that treatment of FSHD myoblasts with tempol during the myogenic differentiation process can significantly improve the phenotype of resulting myotubes. We also treated FSHD myoblasts with NAC which was previously used in dystrophin-deficient (mdx) mice to reduce myonecrosis and the level of inflammation in blood [56], and successfully helped to reduce the level of oxidized glutathione and oxidized thiol proteins in dystrophic muscles [57]. NAC-treated myotubes showed a larger diameter and a closer morphology to normal myotubes. Thus DNA damage and oxidative stress contribute to establishment of phenotypically- aberrant myotubes and the antioxidant treatment can improve the phenotype of FSHD myotubes.

The results of this work thus establish DNA damage as a novel phenotypic feature of FSHD cells which is dependent on *DUX4* expression. DNA damage and oxidative stress are implicated in the aberrant phenotype of *in vitro* FSHD myotubes and might be involved in a functional deviation of FSHD myoblasts from their normal counterparts.

4. Materials and methods

4.1. Cell culture conditions and transfection

Primary myoblasts ("pMyo") isolated from skeletal muscle biopsies of FSHD patients and healthy subjects (**Table S2**) and purified using CD56/NCAM magnetic beads (Miltenyui Biotec) as previously described [19] were obtained from Dr. Dalila Laoudj-Chenivesse (INSERM U-1046, Montpellier, France). They were cultured for up to 5 passages

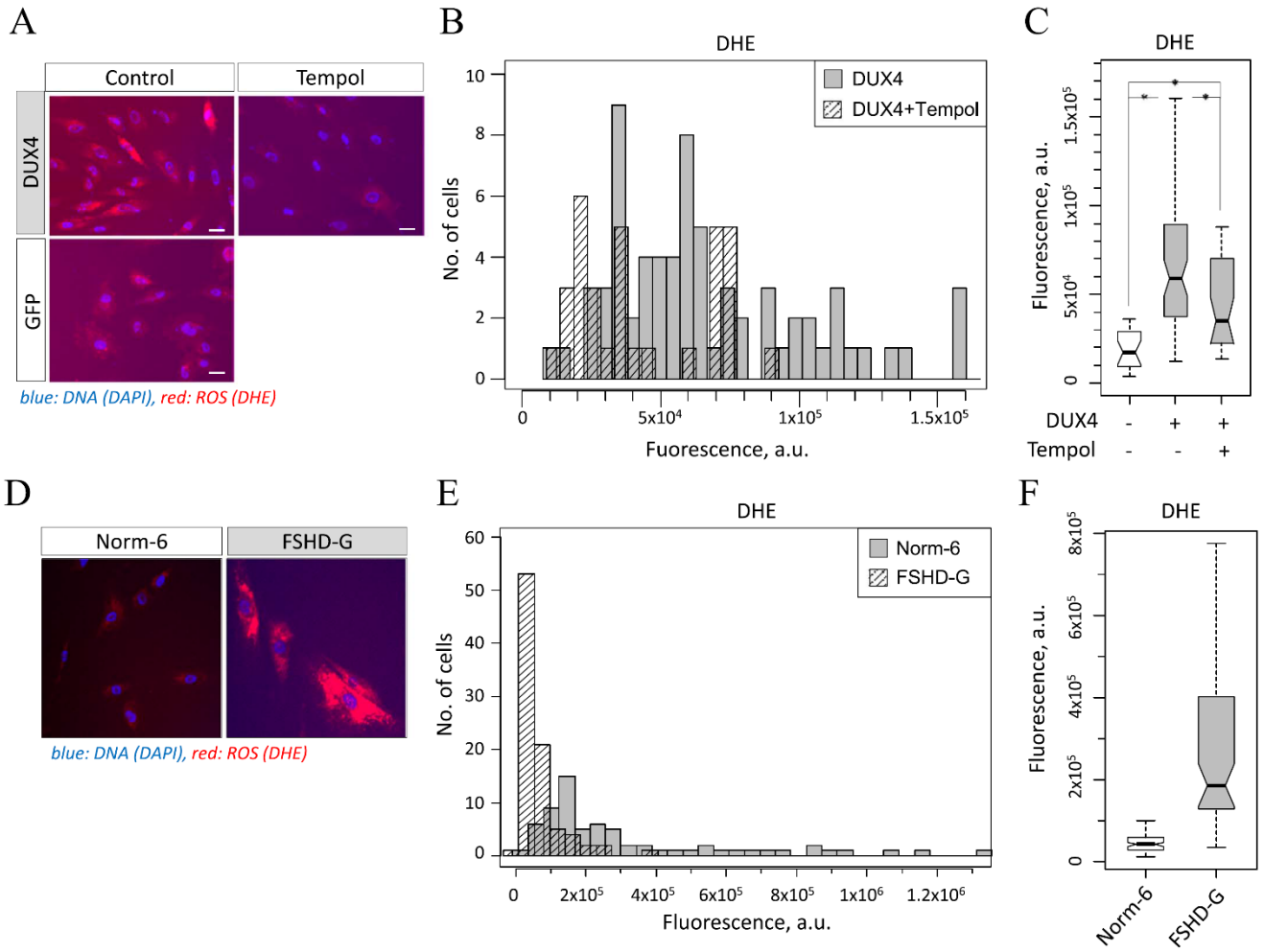


Fig. 6. Oxidative stress in FSHD primary myoblasts and in *DUX4*-transfected human myoblasts. **A**. Immunofluorescent imaging of human immortalized myoblasts transfected with pCI-Neo-DUX4 or control plasmid (phrGFP-N1), treated or not with tempol and stained with a fluorescent ROS sensor probe dihydroethidium (DHE); representative images are shown, 20X magnification, bar = 10 μm. **B**. Effect of tempol on the distribution of DHE fluorescence intensity in human immortalized myoblasts transfected with *DUX4*, 33 cells analyzed for "+tempol" condition and 69 cells - for "-tempol" condition. **C**. Statistical analysis of DHE fluorescence intensity distribution of samples shown on **A**. (*) *t*-test p-value < 0.05. Notches indicate a confidence interval. **D**. Reactive oxygen species (ROS) visualization via DHE fluorescence analysis in primary myoblasts from the FSHD patient FSHD-G and a healthy subject Norm-6; representative images are shown, 20X magnification, bar = 10 μm. **E**. Distribution of DHE intensity in myoblasts from the FSHD patient FSHD-G (68 cells analyzed) and a healthy subject Norm-6 (89 cells analyzed) and its statistical analysis (**F**) (*) *t*-test p-value < 0.05.

and preserved in liquid nitrogen for future use. After unfreezing, the myoblasts were cultured for one more passage in high-glucose DMEM (here and below Sigma #D6546) supplemented with 10% FBS (Millerium #BWSTS1810/500), 1% Ultroser G (Biosepra #15950–017), 4 mM L-glutamine (Sigma #68540–25G), 50 μg/mL gentamicin (Sigma #G1397) and 1 μg/mL Amphotericin B (Fungizone, Gibco #15290–018) and then switched to the proliferation medium (DMEM, 20% FBS, 4 mM L-glutamine, 50 μg/mL gentamicin1 μg/mL Amphotericin), passaged at a cell confluency not exceeding 30% and used for transfection and tests up to passage 10 to avoid cellular senescence and spontaneous differentiation. To induce the myogenic differentiation, the myoblasts were grown to confluency in proliferating medium, switched to differentiation medium (DMEM, 2% FBS, 4 mM L-glutamine, 50 μg/mL gentamicin 1 μg/mL Amphotericin) and cultured for 6 days without medium change. pMyo were cultured in cell culture dishes coated with collagen using sterile a 0.1% solution of collagen powder (Sigma #C7661) in 0.2% acetic acid.

Human immortalized myoblasts LHCN-M2 derived from a healthy subject ("iMyo") (a kind gift from Dr. V. Mouly, Institute of Myology, Paris) were cultured in the media composed of 4 parts of high-glucose DMEM, 1 part of Medium 199 (Sigma #M4530) and supplemented with 20% FBS, 1X penicillin/streptomycin (Gibco #15140–122) and 2.5 μg/mL plasmocin (Invivogen #MPP-35–02).

The rhabdomyosarcoma cell line TE-671 (a kind gift from Dr. S. Leibowitz, Institut Gustave Roussy, France) was cultured in DMEM supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 units/mL Penicillin G, 100 μg/mL Streptomycin sulfate (Gibco #15070–063) and 1 μg/mL Amphotericin B.

pMyo were transfected using 4 μL of siPORTNeoFX and 10 nM DUX4 siRNA mix or control siRNA using a "reverse" transfection schema as previously described [38]. iMyo transfection was carried out in 6-well plates. 200,000 cells in 1 mL of culturing medium were mixed with 200 μL of OptiMEM (Gibco #31985062) containing 600 ng of plasmid DNA and 0.6 μL Lipofectamine 2000 (Invitrogen #11668–019) per well using a "reverse" transfection schema.

24 h prior to transfection, TE-671 cells were plated in a 6 well plate at the density 2.5×10^5 cells/well and then transfected using 3 μg of plasmid DNA and 6 μL JetPEI (Polyplus #101–10) in 300 μL of 150 mM NaCl per well.

To overexpress DUX4, the plasmid pCI-NeoDUX4 containing the ORF of human *DUX4* gene under control of the CMV promoter

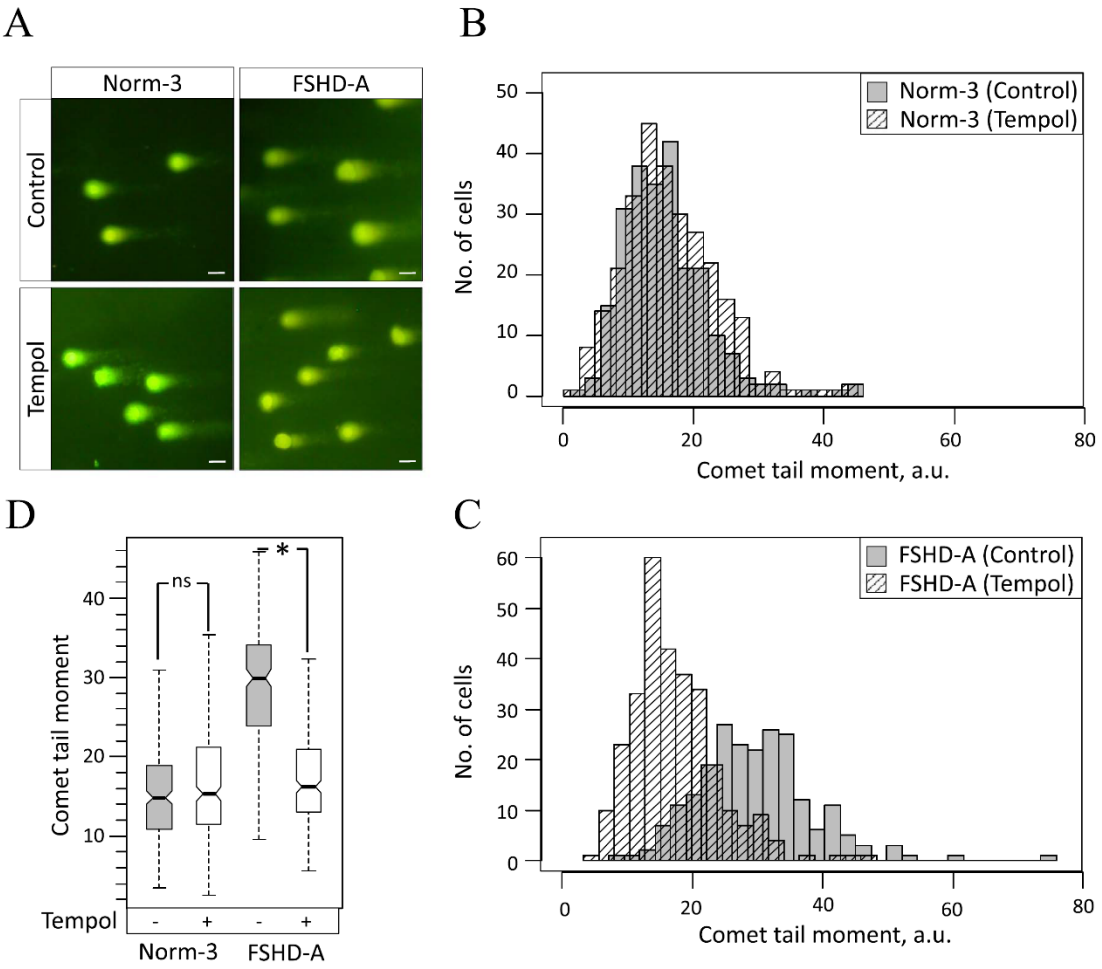


Fig. 7. Effect of the antioxidant addition to the culture medium on the constitutive DNA damage in FSHD myoblasts. **A**. DNA integrity of primary myoblasts from the FSHD patient FSHD-A and a normal subject Norm-3 cultured in the medium supplemented or not with 100 μM of tempol was analyzed using comet assay in alkaline conditions, representative images with 20X magnification are shown. **B,C**. Effect of the culture medium supplementation with 100 μM tempol on the distribution of comet tail moments in normal myoblasts (Norm-3, 207 untreated and 284 tempol-treated cells analyzed) (**B**) and FSHD myoblasts (FSHD-A, 224 untreated and 293 tempol-treated cells analyzed) (**C**). **D**. Statistical analysis of distributions shown in panels B and C; (*) *t*-test p-value < 0.05.; ns – non-significant.

(a kind gift from Alexandra Belayew and Frederique Coppée, University of Mons, Belgium) was used; as a control pCI-Neo (Promega) and phrGFP-N1 (Stratagen) plasmids were used.

To test the effect of tempol on the level of DNA damage in pMyo, the culture medium was supplemented with 100 μM tempol (Enzo Life Sciences #ALX-430–081) or DMSO as a control (in water) 2 days before the DNA damage analysis; the medium was replaced every 24 h. To test the effect of tempol on the level of DNA damage in iMyo, the culture medium was supplemented with 100 μM tempol 3 h before the transfection; the tempol treatment was renewed 24 h after the transfection, and the DNA damage analysis was carried out 48 h post-transfection.

4.2. Immunofluorescence staining and quantification

Proliferating pMyo were, fixed with 2% PFA (Euromedex) for 5 min, permeabilized with 0.25% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) for 5 min, blocked with 0.5% BSA (Euromedex), incubated with mouse monoclonal antibodies against γH2AX (phospho Ser139 H2AX Active Motif #39117, 1:500) or mouse monoclonal anti-Troponin T (Sigma # T6277, 1:50) for 1 h, stained with Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG (Life Technologies #A-21200, 1:100) for 1 h, mounted with a mounting medium containing DAPI (Vector laboratories) and observed under a fluorescent microscope (Microvision instruments, excitation/emission: 488/519 nm, green fluorescence). To create a full image of the specimen, images of adjacent fields were stitched together using Cartograph software (Microvision). For γH2AX and DUX4 co-staining, proliferating iMyo transfected with pCI-NeoDUX4 or phrGFP-N1 were incubated simultaneously with a mouse monoclonal antibody against DUX4 (9A12 kindly donated by Alexandra Belayew, University of Mons, Belgium) and rabbit polyclonal antibodies against γH2AX (phospho Ser139 H2AX Active Motif #39117, 1:500), stained with Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse IgG (Life Technologies#A-21200, 1:100, excitation/emission: 488/519 nm, green fluorescence) and Alexa Fluor 514-conjugated anti-rabbit IgG (Life Technologies #A-31558, 1:100, excitation/emission: 518/540 nm, red fluorescence).

4.3. ROS staining in living cells

48 h after the transfection, iMyo were incubated in a 5 mM DHE-containing ROS staining solution diluted 1:8000 in the 1X proprietary assay buffer (Muse oxidative stress kit, Millipore) for 15 min in the dark at room temperature with shaking, washed three times with PBS, mounted using a DAPI mounting medium (Vector laboratories), observed under a fluorescent microscope (excitation/emission: 520/610 nm, red fluorescence). Images from adjacent fields of view were stitched together by using the

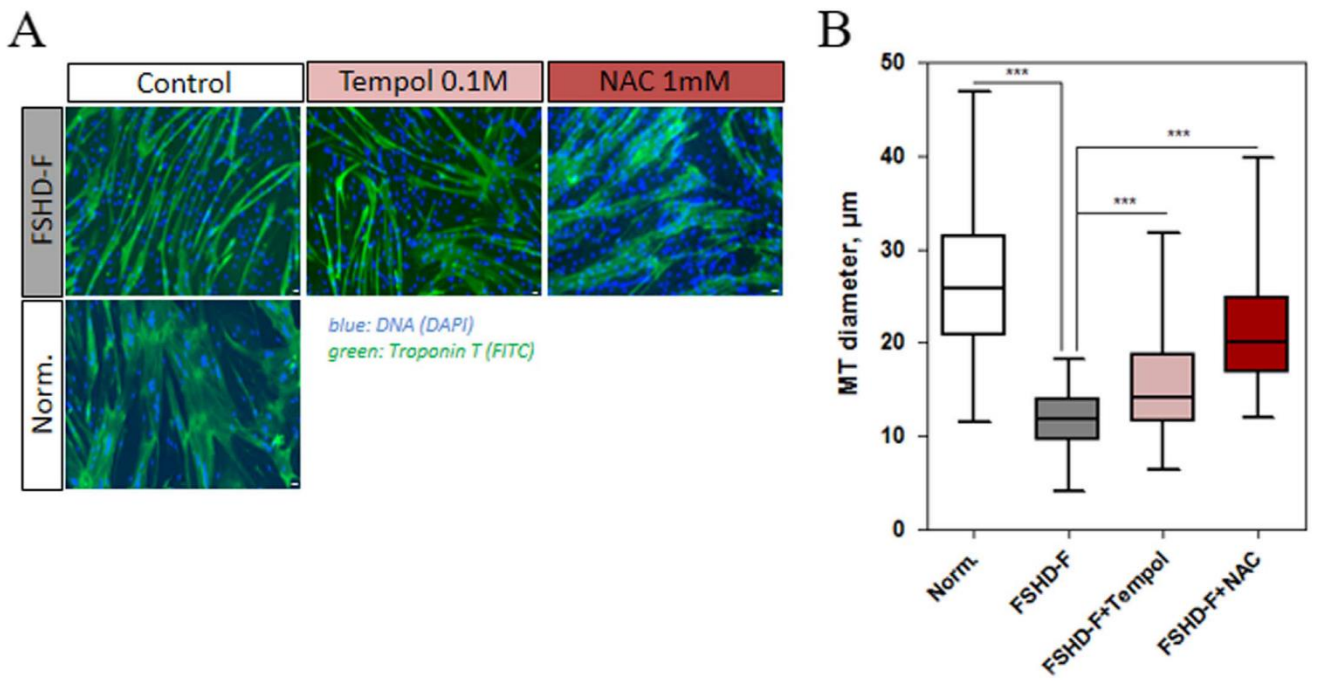


Fig. 8. Effect of the antioxidants on the morphology of FSHD myotubes. **A.** Immunofluorescent imaging of myotubes (MT) derived from atrophic (FSHD-F) primary myoblasts isolated from an FSHD patient or a healthy control (Norm-7); green: Troponin T, blue: DAPI. 10X magnification, bar = 10 μm. Full-size images are shown on Supplementary Fig. S8. **B.** Statistical analysis of diameter measurements of normal and FSHD-F myotubes before and after antioxidant treatment; (***) *t*-test p-value < 0.001.

Cartograph software (Microvision) to create one large image of the specimen. The fluorescence of at least 100 cells per sample was quantified with ImageJ (NIH) using the formula: CTCF (corrected total cell fluorescence) = Integrated_Density - (Area_of_selected _cell X Mean_fluorescence_of_background_readings).

4.4. Measurement of H_2O_2 generation

H_2O_2 generation was quantified by the Amplex red/horseradish peroxidase assay (Sigma Aldrich), which detects the accumulation of a fluorescent oxidized product, according to a previously published protocol [42]. Cells (5.10^4) in Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS) with CaCl2 and MgCl2 were incubated with D-glucose (1 mg/mL), horseradish peroxidase (0.5 U/mL; Roche), and Amplex red (50 μM; Sigma Aldrich), and immediately the fluorescence was measured in a microplate reader (Victor3; PerkinElmer) at 37 °C for 1 h using excitation at 530 nm and emission at 595 nm. H_2O_2 release was quantified (nanomoles H_2O_2 per hour per 10^5 cells) using standard calibration curves.

4.5. Western blot

Whole cell protein extracts were prepared from frozen myoblast cell pellets using TENT buffer (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH7.5, 0.5% NP-40) [58] supplemented with anti-protease and anti-phosphatase inhibitor cocktails (Roche #04693159001, #04906845001), separated on 15% (for γH2AX and H2B staining) or 8% polyacrylamide gel depending on the protein molecular weight, transferred to a nitrocellulose membrane, blocked with 5% BSA/PyTBST (for staining of phosphorylated proteins) or 5% milk/PyTBST, hybridized with primary antibodies against γH2AX (phospho Ser139 H2AX #ab11174, Abcam), H2B (SantaCruz #sc8650), Actin (Millipore #mab1501), washed with 1X PyTBST (10 mM Tris-HCl pH7.4, 75 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% Tween 20) [59] to reduce background, hybridized with secondary antibodies conjugated to HRP (SantaCruz #sc2030, #sc2768, #sc2005), revealed with ECL+(GE Healthcare), exposed to X-ray film (Amersham) and developed in the chemical film processor (FujiFilm). Quantification of scanned X-ray images was performed using ImageJ.

4.6. FACS analysis

Proliferating pMyo were cultured for 5 h, as described above in the presence of 10 μM BrdU (Sigma #B5002–100G) freshly dissolved in PBS, trypsinized, centrifuged, resuspended in PBS and fixed at 4 °C overnight in 60% Ethanol at a final concentration of 1×10^6 cells/mL, the DNA was then denatured in 2 N HCl for 20 min at 37 °C, neutralized with 500 mM of sodium borate, washed with PBTB (PBS supplemented with 0.5% Tween20 and 0.5% BSA), incubated with *anti*-BrdU antibodies (Sigma #B8434, 2 μg/μL, 1:100) in 100 μL of PBTB for 1 h at room temperature in the dark, diluted 10-fold with PBTB, centrifuged, incubated for 1 h at room temperature in the dark with anti-mouse antibody conjugated to Alexa Fluor 488 (Invitrogen #A11059, 2 mg/mL, 1:200) diluted 10-fold with PBTB, centrifuged, resuspended in 500 μL of PBTB, stained with 10 μg/mL of PI for 15 min at room temperature in the dark and treated with 20 μg/mL of RNAse I for 30 min. Cell cycle distribution data were obtained using FACS Calibur (BD Bioscience) and analyzed using FCS Express v3.

4.7. Apurinic/apyrimidinic site quantification

Genomic DNA was isolated using Nucleospin Tissue kit (Macherey Nagel). AP sites were quantified using DNA damage colorimetric assay kit (Abcam #ab65353) as instructed by the producer. Briefly, 500 ng of genomic DNA were labeled with aldehyde-reactive probe (ARP) containing a biotin moiety, immobilized in microwells, incubated with streptavidin-conjugated HRP; following an HRP substrate addition, the absorbance (650 nm) was

measured using a microplate absorbance reader. To translate the absorbance units into the number of AP sites, a standard curve was obtained using control DNA containing 40 AP sites per 10^5 bp.

4.8. Alkaline Comet assay and scoring for DNA damage

The alkaline comet assay was performed using the Trevigen CometAssay kit (Trevigen # 4,250,050-k) and 20-well CometSlide™ (Trevigen # 4252–500-01). Briefly, the cells were combined at 1×10^5/mL with a molten low melting point agarose (LMAgarose) at 37 °C at the ratio of 1/10 (v/v) and 50 μL were deposed onto a 20-well pre-coated CometSlide™. The agarose was allowed to solidify by placing the slides flat at 4 °C in the dark for 15 min. The slides were then immersed in a pre-chilled lysis solution (Trevigen # 4250–050-01) for 1 h at 4 °C to remove the membrane, cellular proteins and histones. Following lysis, DNA unwinding was completed by incubating the slides in a freshly prepared alkaline unwinding solution (200 mM NaOH, 1 mM EDTA pH > 13) for 1 h at room temperature. The slides were then subjected to electrophoresis at 21 V for 30 min at 4 °C in the same alkaline solution, washed twice with dH_2O for 5 min each, washed in 70% ethanol for 5 min, dried at 37 °C for 30 min, and stained with 50 μL of diluted SYBR Green solution (1/10,000 in TE buffer pH 7.5, Trevigen # 4250–050-05). The slides were allowed to dry completely at room temperature before observation under the epifluorescence microscope (Microvision instruments, Excitation/Emission: 494/521 nm, 20X zoom). Images of 100 randomly selected non-overlapping cells were captured and analyzed using Tritek CometScore software. A variety of measurements including the percentage of DNA in the tail (expressed as % of total DNA), the tail length (measured from the leading edge of the comet head) and tail moment (the measure of tail length multiplied by tail intensity) were calculated to evaluate the extent of DNA damage. Mean values from at least 100 nuclei were used in calculations. All steps were conducted in the dark to minimize extraneous sources of DNA damage.

4.9. Myogenic differentiation and myotubes quantification

Myoblasts from normal and FSHD primary cell lines were seeded at a density of 3.10^5 cells per 10 cm collagen-coated petri dishes, and cultured in 10 mL of proliferation medium supplemented with 100 μM of tempol, 1 mM N-Acetyl-L-cysteine (NAC) (Sigma #A7250) or DMSO (control). 48 h later the cells were collected, washed and seeded in 35 mm collagen-coated petri dishes (80–100% confluence) under proliferation conditions. Myogenic differentiation was then induced 4 h later by replacing the growth medium with differentiation medium, supplemented or not with 100 μM tempol or 1 mM NAC. The differentiation medium was replaced every 72 h to ensure a constant antioxidant concentration. The cells were kept 6 days under differentiation conditions and were then fixed and immuno-stained with anti-Troponin T primary antibody, as described previously. The diameter of atrophic myotubes was measured using ImageJ software. For each myotube the mean value of three diameter measurements at three different points was calculated in μm. At least 100 myotubes were counted per condition.

4.10. Transcriptome profiling

RNA was prepared using organic extraction and ethanol precipitation as described [60] followed by silica column cleanup using Nucleospin RNA Extraction kit (Macherey Nagel). RNA extracted from pMyo isolated from 6 FSHD patients and 5 healthy individuals (biological replicates) was Cy3-labeled, mixed with a pool of RNA samples labeled with Cy5 and hybridized to Gene Expression microarrays (4 × 44k #G4112F, Agilent) and scanned as instructed by the manufacturer. Scanned images were then analyzed using the Feature Extraction software (Agilent) and the gene expression data were treated in R and Bioconductor. Spots with intensity lower than 50 or lower than background in more than 50% of biological replicates have been removed from further analysis. The background correction and intensity normalization procedures were applied for the remaining ~30 000 probes using the Bioconductor package vsn [61]. A background offset and a scaling factor for each array and dye channel were calculated using the least squares regression procedure, then a generalized log-transformation was applied. To determine the differentially expressed genes, a *t*-test analysis was applied using the limma package from Bioconductor [61]. Using this package, a linear model is fitted to the expression data for each gene. An empirical Bayes moderation of the standard errors was performed. This analysis resulted in the identification of 512 and 94 significant Agilent ID in FSHD myoblasts and myotubes respectively. Gene symbols and descriptions corresponding to significant Agilent IDs were retrieved from the Agilent microarray annotation file and db2db and DAVID gene ID conversion tools. In case of disagreement between the sources, HGNC database (http://www.genenames.org/) was consulted. In total, 504 and 141 unique genes were differentially expressed in FSHD myoblasts and myotubes respectively; 400 and 109 genes were protein-coding.

4.11. Functional annotation of differentially expressed genes

Protein-coding genes differentially expressed in FSHD myoblasts and myotubes were used for functional annotation with DAVID (http://david.abcc.ncifcrf.gov/) using GOTERM_BP_FAT list and the default background. The stringency of functional annotation clustering was set to "medium". To establish a reliable threshold of significant functional clusters, we generated random lists of 266, 75, 52 and 27 genes corresponding to the number of genes up- and downregulated in FSHD myoblasts and myotubes, functionally annotated them with DAVID and used the most significant p-values and FDRs as thresholds. Significant functional clusters were then manually assembled into superclusters using Microsoft Excel with Ablebits add-ons (https://www.ablebits.com/).

4.12. Statistical analysis

Tail moment data for Comet assay have been compared using single-factor ANOVA incorporating 75th percentile as a characteristic of a tail moment distribution according to recommendation in [62]. Mann-Whitney test was performed using R function wilcox.test. Student's *t*-test was performed using Excel function *T* TEST, a p-value of 0.05 was considered statistically significant. Statistical power was calculated using http://powerandsamplesize.com/. Kruskal-Wallis test on Tail moment distributions was performed using kruskal.test function in R. The number of experiments and samples on which statistical analysis were performed are indicated in each experiment.

4.13. RT-PCR

RNA was prepared using organic extraction and ethanol precipitation as described [60]. Reverse transcription and PCR amplification of DUX4 were carried out as described in detail previously [38].

4.14. Microarray validation

Total RNA was isolated from 2×10^6 myoblasts, or myotubes using

Trizol (Invitrogen) and reverse transcribed using the High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer protocol, mixed with 2x Taqman PCR mix (Applied Biosystems) and analyzed via qPCR on Abiprism 7900HT using Taqman Low Density Array (TLDA) (Applied Biosystems) charged with the following probes: BLM, Hs00172060_m1; CCNB1, Hs01030101_g1; CDC25C, Hs00156407_m1; E2F1, Hs00153451_m1; KIF20A, Hs00993573_m1; MPP4, Hs00608861_m1; PLK1, Hs00983227_m1; RNASEH2A, Hs00197370_m1; RRM2, Hs00357247_g1; TRAIP, Hs00183394_m1; CCNA, Hs00996789_g1; TRIM43, Hs00299174_m1; PRAMEF2, Hs00363780_m1; MBD3L2, Hs00544743_m1. Expression was analyzed using ΔΔCt method using GAPDH, Hs03929097_g1.

5. Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

This research was supported by the MEGAFSHD grant from the Association Française contre les Myopathies (AFM) to YSV and the Grant no. 16–54-16015 from the Russian Foundation for Basic Research to VZ. We thank Dr. Dalila Laoudj-Chenivesse for primary myoblasts and Ms. Shirmoné Botha for critical reading of the manuscript.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.007.

References

[1] J.C. Deenen, H. Arnts, S.M. van der Maarel, G.W. Padberg, J.J. Verschuuren, E. Bakker, S.S. Weinreich, A.L. Verbeek, B.G. van Engelen, Population-based incidence and prevalence of facioscapulohumeral dystrophy, Neurology 83 (12) (2014) 1056–1059.
[2] M. Richards, F. Coppee, N. Thomas, A. Belayew, M. Upadhyaya, Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD): an enigma unravelled? Hum. Genet 131 (3) (2012) 325–340.
[3] D.S. Cabianca, D. Gabellini, The cell biology of disease: FSHD: copy number variations on the theme of muscular dystrophy, J. Cell Biol. 191 (6) (2010) 1049–1060.
[4] M. Bakay, Z. Wang, G. Melcon, L. Schiltz, J. Xuan, P. Zhao, V. Sartorelli, J. Seo, E. Pegoraro, C. Angelini, B. Shneiderman, D. Escolar, Y.W. Chen, S.T. Winokur, L. M. Pachman, C. Fan, R. Mandler, Y. Nevo, E. Gordon, Y. Zhu, Y. Dong, Y. Wang, E. P. Hoffman, Nuclear envelope dystrophies show a transcriptional fingerprint suggesting disruption of Rb-MyoD pathways in muscle regeneration, Brain 129 (Pt 4) (2006) 996–1013.
[5] B. Celegato, D. Capitanio, M. Pescatori, C. Romualdi, B. Pacchioni, S. Cagnin, A. Vigano, L. Colantoni, S. Begum, E. Ricci, R. Wait, G. Lanfranchi, C. Gelfi, Parallel protein and transcript profiles of FSHD patient muscles correlate to the D4Z4 arrangement and reveal a common impairment of slow to fast fibre differentiation and a general deregulation of MyoD-dependent genes, Proteomics 6 (19) (2006) 5303–5321.
[6] P.G. van Overveld, R.J. Lemmers, L.A. Sandkuijl, L. Enthoven, S.T. Winokur, F. Bakels, G.W. Padberg, G.J. van Ommen, R.R. Frants, S.M. van der Maarel, Hypomethylation of D4Z4 in 4q-linked and non-4q-linked facioscapulohumeral muscular dystrophy, Nat. Genet. 35 (4) (2003) 315–317.
[7] S.T. Winokur, Y.W. Chen, P.S. Masny, J.H. Martin, J.T. Ehmsen, S.J. Tapscott, S. M. van der Maarel, Y. Hayashi, K.M. Flanigan, Expression profiling of FSHD muscle supports a defect in specific stages of myogenic differentiation, Hum. Mol. Genet. 12 (22) (2003) 2895–2907.
[8] D. Laoudj-Chenivesse, G. Carnac, C. Bisbal, G. Hugon, S. Bouillot, C. Desnuelle, Y. Vassetzky, A. Fernandez, Increased levels of adenine nucleotide translocator 1 protein and response to oxidative stress are early events in facioscapulohumeral muscular dystrophy muscle, J. Mol. Med. 83 (3) (2005) 216–224.
[9] R.J. Osborne, S. Welle, S.L. Venance, C.A. Thornton, R. Tawil, Expression profile of FSHD supports a link between retinal vasculopathy and muscular dystrophy, Neurology 68 (8) (2007) 569–577.
[10] P. Arashiro, I. Eisenberg, A.T. Kho, A.M. Cerqueira, M. Canovas, H.C. Silva, R. C. Pavanello, S. Verjovski-Almeida, L.M. Kunkel, M. Zatz, Transcriptional regulation differs in affected facioscapulohumeral muscular dystrophy patients compared to asymptomatic related carriers, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106 (15) (2009) 6220–6225.
[11] S. Cheli, S. Francois, B. Bodega, F. Ferrari, E. Tenedini, E. Roncaglia, S. Ferrari, E. Ginelli, R. Meneveri, Expression profiling of FSHD-1 and FSHD-2 cells during myogenic differentiation evidences common and distinctive gene dysregulation patterns, PloS One 6 (6) (2011) e20966.
[12] K. Tsumagari, S.C. Chang, M. Lacey, C. Baribault, S.V. Chittur, J. Sowden, R. Tawil, G.E. Crawford, M. Ehrlich, Gene expression during normal and FSHD myogenesis, BMC Med. Genom. 4 (2011) 67.
[13] F. Rahimov, O.D. King, D.G. Leung, G.M. Bibat, C.P. Emerson Jr., L.M. Kunkel, K. R. Wagner, Transcriptional profiling in facioscapulohumeral muscular dystrophy to identify candidate biomarkers, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109 (40) (2012) 16234–16239.
[14] G. Tasca, M. Pescatori, M. Monforte, M. Mirabella, E. Iannaccone, R. Frusciante, T. Cubeddu, F. Laschena, P. Ottaviani, E. Ricci, Different molecular signatures in magnetic resonance imaging-staged facioscapulohumeral muscular dystrophy muscles, PloS One 7 (6) (2012) e38779.
[15] A. Tassin, B. Leroy, D. Laoudj-Chenivesse, A. Wauters, C. Vanderplanck, M.C. Le Bihan, F. Coppee, R. Wattiez, A. Belayew, FSHD myotubes with different phenotypes exhibit distinct proteomes, PloS One 7 (12) (2012) e51865.
[16] P. Dmitriev, U. Kairov, T. Robert, A. Barat, V. Lazar, G. Carnac, D. Laoudj-Chenivesse, Y.S. Vassetzky, Cancer-related genes in the transcription signature of facioscapulohumeral dystrophy myoblasts and myotubes, J. Cell Mol. MEd 18 (2) (2014) 208–217.
[17] P. Dmitriev, L. Stankevicins, E. Ansseau, A. Petrov, A. Barat, P. Dessen, T. Robert, A. Turki, V. Lazar, E. Labourer, A. Belayew, G. Carnac, D. Laoudj-Chenivesse, M. Lipinski, Y.S. Vassetzky, Defective regulation of microRNA target genes in myoblasts from facioscapulohumeral dystrophy patients, J. Biol. Chem. 288 (49) (2013) 34989–35002.
[18] C. Dib, Y.B. Saada, P. Dmitriev, C. Richon, P. Dessen, D. Laoudj-Chenivesse, G. Carnac, M. Lipinski, Y.S. Vassetzky, Correction of the FSHD Myoblast Differentiation Defect by Fusion With Healthy Myoblasts, J Cell Physiol (2015).
[19] M. Barro, G. Carnac, S. Flavier, J. Mercier, Y. Vassetzky, D. Laoudj-Chenivesse, Myoblasts from affected and non-affected FSHD muscles exhibit morphological differentiation defects, J. Cell Mol. Med. 14 (1–2) (2010) 275–289.
[20] S.T. Winokur, K. Barrett, J.H. Martin, J.R. Forrester, M. Simon, R. Tawil, S. A. Chung, P.S. Masny, D.A. Figlewicz, Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) myoblasts demonstrate increased susceptibility to oxidative stress, Neuromuscul. Disord. 13 (4) (2003) 322–333.
[21] V. Sharma, N. Harafuji, A. Belayew, Y.W. Chen, DUX4 differentially regulates transcriptomes of human rhabdomyosarcoma and mouse C2C12 cells, PloS One 8 (5) (2013) e64691.
[22] A. Turki, M. Hayot, G. Carnac, F. Pillard, E. Passerieux, S. Bommart, E. Raynaud de Mauverger, G. Hugon, J. Pincemail, S. Pietri, K. Lambert, A. Belayew, Y. Vassetzky, R. Juntas Morales, J. Mercier, D. Laoudj-Chenivesse, Functional muscle impairment in facioscapulohumeral muscular dystrophy is correlated with oxidative stress and mitochondrial dysfunction, Free Radic. Biol. Med 53 (553) (2012) 1068–1079.
[23] A. Musaro, S. Fulle, G. Fano, Oxidative stress and muscle homeostasis, Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care 13 (3) (2010) 236–242.
[24] E. Barbieri, P. Sestili, Reactive oxygen species in skeletal muscle signaling, J. Signal. Transduct. 2012 (2012) 982794.
[25] E. Marzetti, J.C. Hwang, H.A. Lees, S.E. Wohlgemuth, E.E. Dupont-Versteegden, C.S. Carter, R. Bernabei, C. Leeuwenburgh, Mitochondrial death effectors: relevance to sarcopenia and disuse muscle atrophy, Biochim. Biophys. Acta 1800 (3) (2010) 235–244.
[26] M. Bar-Shai, E. Carmeli, A.Z. Reznick, The role of NF-kappa B in protein breakdown in immobilization, aging, and exercise: from basic processes to promotion of health, Ann. NY Acad. Sci. 1057 (2005) 431–447.
[27] D. Bosnakovski, Z. Xu, E.J. Gang, C.L. Galindo, M. Liu, T. Simsek, H.R. Garner, S. Agha-Mohammadi, A. Tassin, F. Coppee, A. Belayew, R.R. Perlingeiro, M. Kyba, An isogenetic myoblast expression screen identifies DUX4-mediated FSHD-associated molecular pathologies, EMBO J. 27 (20) (2008) 2766–2779.
[28] S.P. Jackson, J. Bartek, The DNA-damage response in human biology and disease, Nature 461 (7267) (2009) 1071–1078.
[29] M. O'Driscoll, Diseases associated with defective responses to DNA damage, Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 4 (12) (2012).
[30] W.M. Schmidt, M.H. Uddin, S. Dysek, K. Moser-Thier, C. Pirker, H. Hoger, I. M. Ambros, P.F. Ambros, W. Berger, R.E. Bittner, DNA damage, somatic aneuploidy, and malignant sarcoma susceptibility in muscular dystrophies, PLoS Genet. 7 (4) (2011) e1002042.
[31] A. Fanzani, E. Monti, R. Donato, G. Sorci, Muscular dystrophies share pathogenetic mechanisms with muscle sarcomas, Trends Mol. MEd 19 (9) (2013) 546–554.
[32] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, Exp. Cell Res. 175 (1) (1988) 184–191.
[33] R.R. Tice, P.W. Andrews, N.P. Singh, The single cell gel assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair, Basic Life Sci. 53 (1990) 291–301.
[34] R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, Y.F. Sasaki, Single cell gel/comet assay:

guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, Environ. Mol. Mutagen 35 (3) (2000) 206–221.
[35] J.T. Vilquin, J.P. Marolleau, S. Sacconi, I. Garcin, M.N. Lacassagne, I. Robert, B. Ternaux, B. Bouazza, J. Larghero, C. Desnuelle, Normal growth and regenerating ability of myoblasts from unaffected muscles of facioscapulohumeral muscular dystrophy patients, Gene Ther. 12 (22) (2005) 1651–1662.
[36] R. Morosetti, M. Mirabella, C. Gliubizzi, A. Broccolini, C. Sancricca, M. Pescatori, T. Gidaro, G. Tasca, R. Frusciante, P.A. Tonali, G. Cossu, E. Ricci, Isolation and characterization of mesoangioblasts from facioscapulohumeral muscular dystrophy muscle biopsies, Stem Cells 25 (12) (2007) 3173–3182.
[37] R. Morosetti, T. Gidaro, A. Broccolini, C. Gliubizzi, C. Sancricca, P.A. Tonali, E. Ricci, M. Mirabella, Mesoangioblasts from facioscapulohumeral muscular dystrophy display in vivo a variable myogenic ability predictable by their in vitro behavior, Cell Transplant. 20 (8) (2011) 1299–1313.
[38] C. Vanderplanck, E. Ansseau, S. Charron, N. Stricwant, A. Tassin, D. Laoudj-Chenivesse, S.D. Wilton, F. Coppee, A. Belayew, The FSHD atrophic myotube phenotype is caused by DUX4 expression, PloS One 6 (10) (2011) e26820.
[39] V. Kowaljow, A. Marcowycz, E. Ansseau, C.B. Conde, S. Sauvage, C. Matteotti, C. Arias, E.D. Corona, N.G. Nunez, O. Leo, R. Wattiez, D. Figlewicz, D. Laoudj-Chenivesse, A. Belayew, F. Coppee, A.L. Rosa, The DUX4 gene at the FSHD1A locus encodes a pro-apoptotic protein, Neuromuscul. Disord. 17 (8) (2007) 611–623.
[40] L.M. Wallace, S.E. Garwick, W. Mei, A. Belayew, F. Coppee, K.J. Ladner, D. Guttridge, J. Yang, S.Q. Harper, DUX4, a candidate gene for facioscapulohumeral muscular dystrophy, causes p53-dependent myopathy in vivo, Ann. Neurol. 69 (3) (2011) 540–552.
[41] R.D. Wuebbles, S.W. Long, M.L. Hanel, P.L. Jones, Testing the effects of FSHD candidate gene expression in vertebrate muscle development, Int J. Clin. Exp. Pathol. 3 (4) (2010) 386–400.
[42] A. Carre, R.A. Louzada, R.S. Fortunato, R. Ameziane-El-Hassani, S. Morand, V. Ogryzko, D.P. de Carvalho, H. Grasberger, T.L. Leto, C. Dupuy, When an Intramolecular Disulfide Bridge Governs the Interaction of DUOX2 with Its Partner DUOXA2, Antioxid. Redox Signal. 23 (9) (2015) 724–733.
[43] Y. Morel, R. Barouki, Repression of gene expression by oxidative stress, Biochem J. 342 (Pt 3) (1999) 481–496.
[44] M. Zafarullah, W.Q. Li, J. Sylvester, M. Ahmad, Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions, Cell Mol. Life Sci. 60 (1) (2003) 6–20.
[45] K. Arahata, T. Ishihara, H. Fukunaga, S. Orimo, J.H. Lee, K. Goto, I. Nonaka, Inflammatory response in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD): immunocytochemical and genetic analyses, Muscle Nerve Suppl. (2) (1995) S56–S66.
[46] A. Pakula, J. Schneider, J. Janke, U. Zacharias, H. Schulz, N. Hubner, A. Mahler, A. Spuler, S. Spuler, P. Carlier, M. Boschmann, Altered expression of cyclin A 1 in muscle of patients with facioscapulohumeral muscle dystrophy (FSHD-1), PloS One 8 (9) (2013) e73573.
[47] D.M. DeMarini, Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review, Mutat. Res 567 (2–3) (2004) 447–474.
[48] R.P. Rastogi, Richa, A. Kumar, M.B. Tyagi, R.P. Sinha, Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair, J. Nucleic Acids 2010 (2010) 592980.
[49] R. De Bont, N. van Larebeke, Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data, Mutagenesis 19 (3) (2004) 169–185.
[50] A. Mazouzi, G. Velimezi, J.I. Loizou, DNA replication stress: causes, resolution and disease, Exp. Cell Res 329 (1) (2014) 85–93.
[51] S. Yan, M. Sorrell, Z. Berman, Functional interplay between ATM/ATR-mediated DNA damage response and DNA repair pathways in oxidative stress, Cell Mol. Life Sci. 71 (20) (2014) 3951–3967.
[52] J. Nakamura, D.K. La, J.A. Swenberg, 5′-nicked apurinic/apyrimidinic sites are resistant to beta-elimination by beta-polymerase and are persistent in human cultured cells after oxidative stress, J. Biol. Chem. 275 (858) (2000) 5323–5328.
[53] M. Dizdaroglu, P. Jaruga, M. Birincioglu, H. Rodriguez, Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement, Free Radic. Biol. Med. 32 (11) (2002) 1102–1115.
[54] M. Simonatto, L. Latella, P.L. Puri, DNA damage and cellular differentiation: more questions than responses, J. Cell Physiol. 213 (3) (2007) 642–648.
[55] P.L. Puri, K. Bhakta, L.D. Wood, A. Costanzo, J. Zhu, J.Y. Wang, A myogenic differentiation checkpoint activated by genotoxic stress, Nat. Genet 32 (4) (2002) 585–593.
[56] R. de Senzi Moraes Pinto, R. Ferretti, L.H. Moraes, H.S. Neto, M.J. Marques, E. Minatel, N-acetylcysteine treatment reduces TNF-alpha levels and myonecrosis in diaphragm muscle of mdx mice, Clin. Nutr. 32 (3) (2013) 472–475.
[57] J.R. Terrill, H.G. Radley-Crabb, M.D. Grounds, P.G. Arthur, N-Acetylcysteine treatment of dystrophic mdx mice results in protein thiol modifications and inhibition of exercise induced myofibre necrosis, Neuromuscul. Disord. 22 (5) (2012) 427–434.
[58] I.M. Ward, J. Chen, Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress, J. Biol. Chem. 276 (51) (2001) 47759–47762.
[59] K. Malathi, Y. Xiao, A.P. Mitchell, Catalytic roles of yeast GSK3beta/shaggy homolog Rim11p in meiotic activation, Genetics 153 (3) (1999) 1145–1152.
[60] P. Chomczynski, N. Sacchi, The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on, Nat. Protoc. 1 (2) (2006) 581–585.
[61] G. Smyth, Limma: linear models for microarray data, in: V.C.R. Gentleman, S. Dudoit, W. Hubert (Eds.), Bioinformatics and Computational Biology Solutions unsing R and Bioconductor, Springer, New York, 2005, pp. 397–420.
[62] S.J. Wiklund, E. Agurell, Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay, Mutagenesis 18 (2) (2003) 167–175.

Figure S1 Revised 23/6

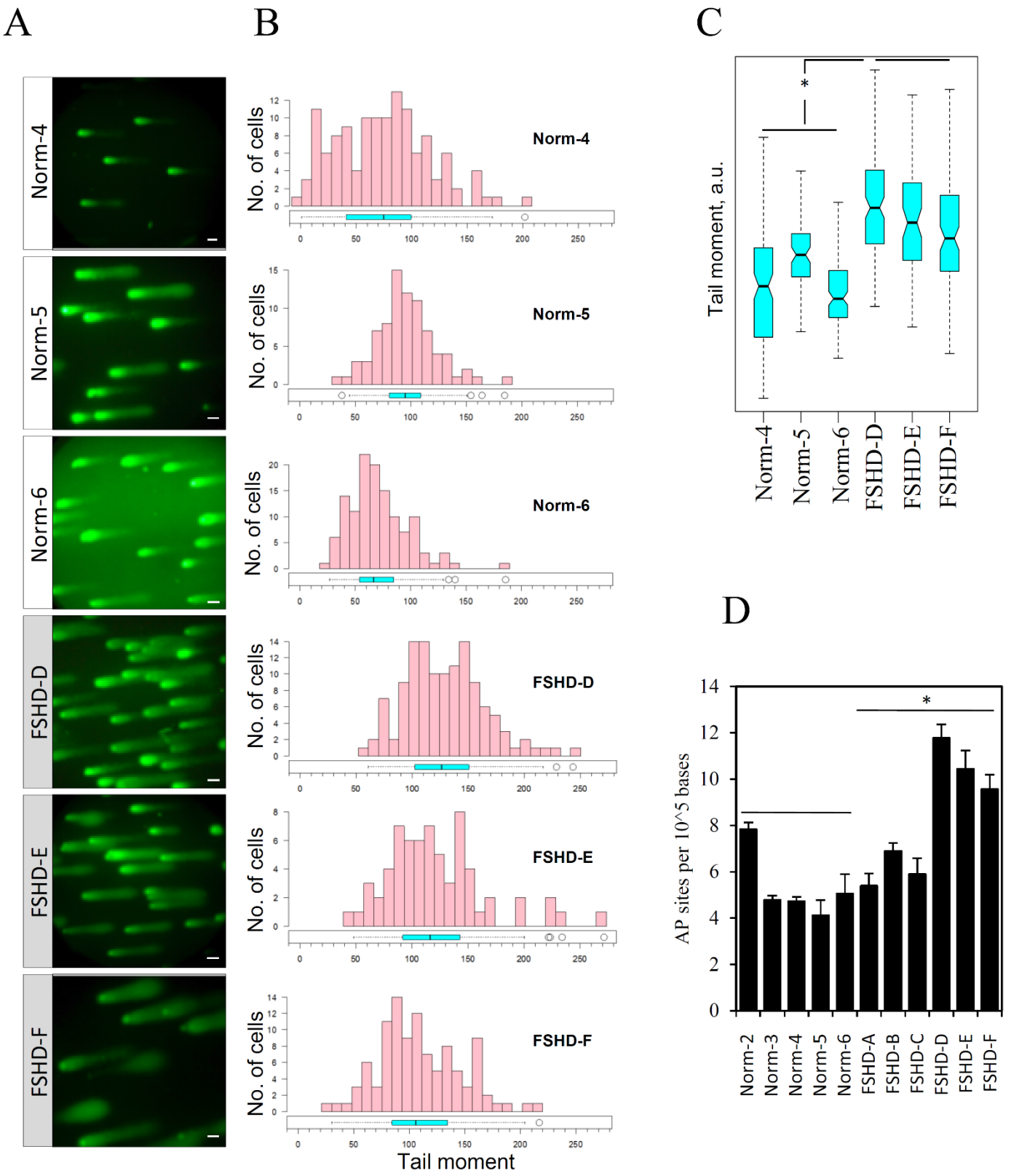
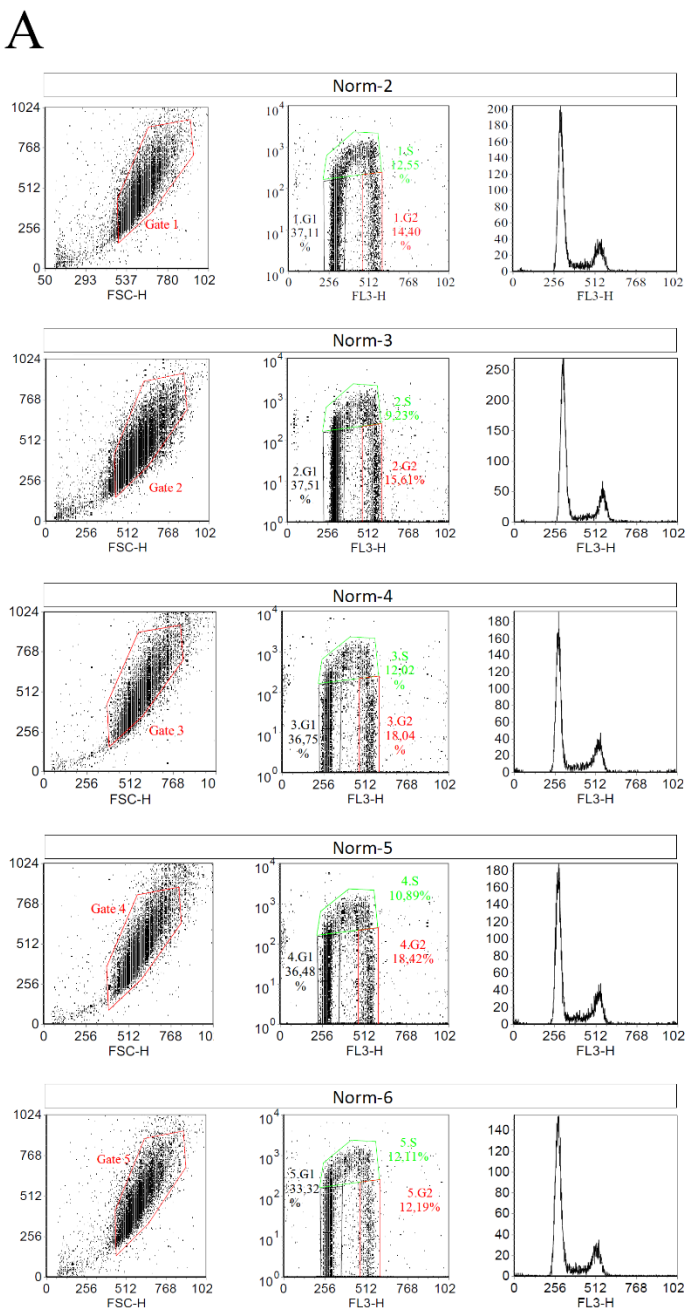
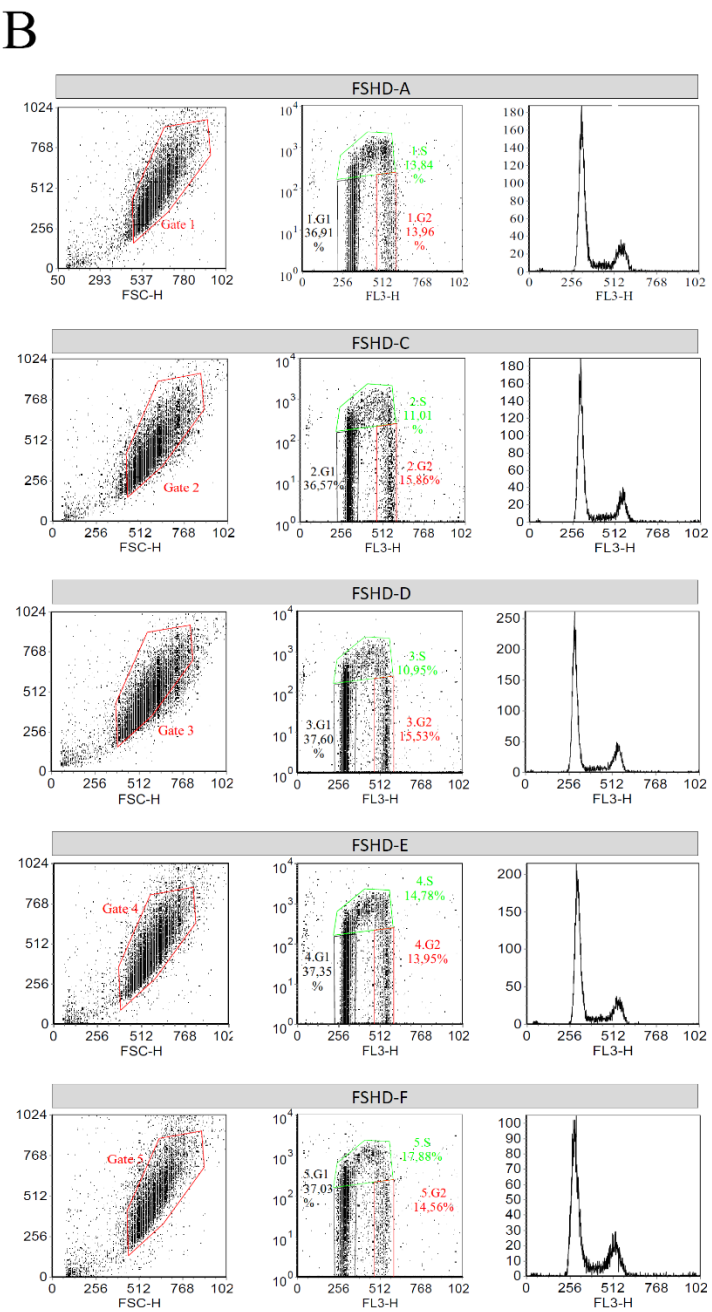
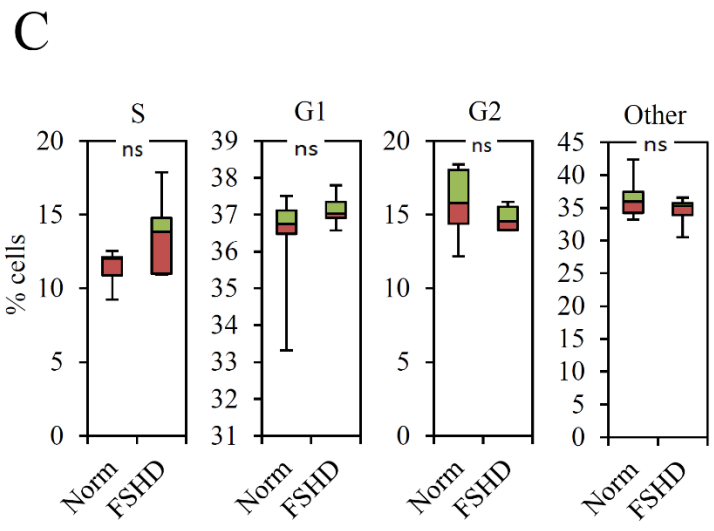


Figure S2 Revised 23/6







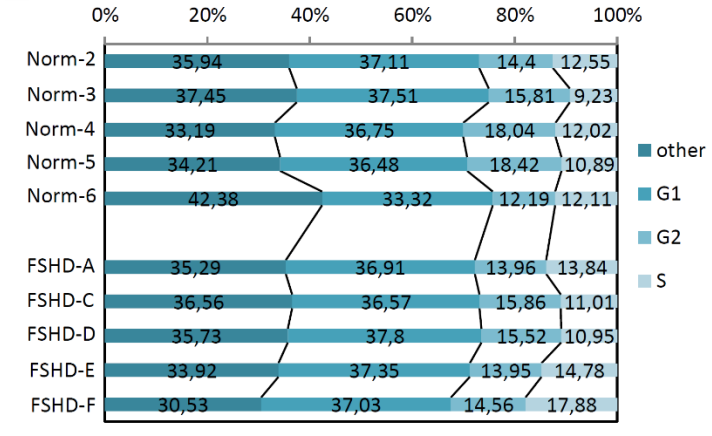


Figure S3

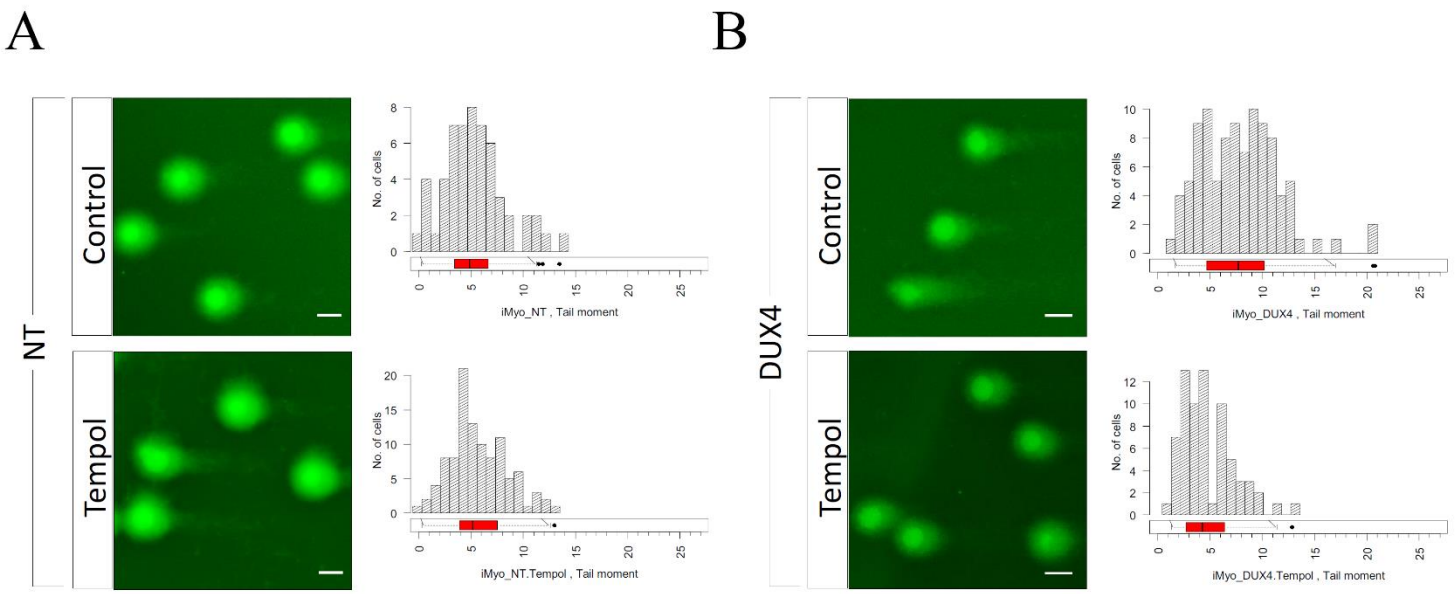
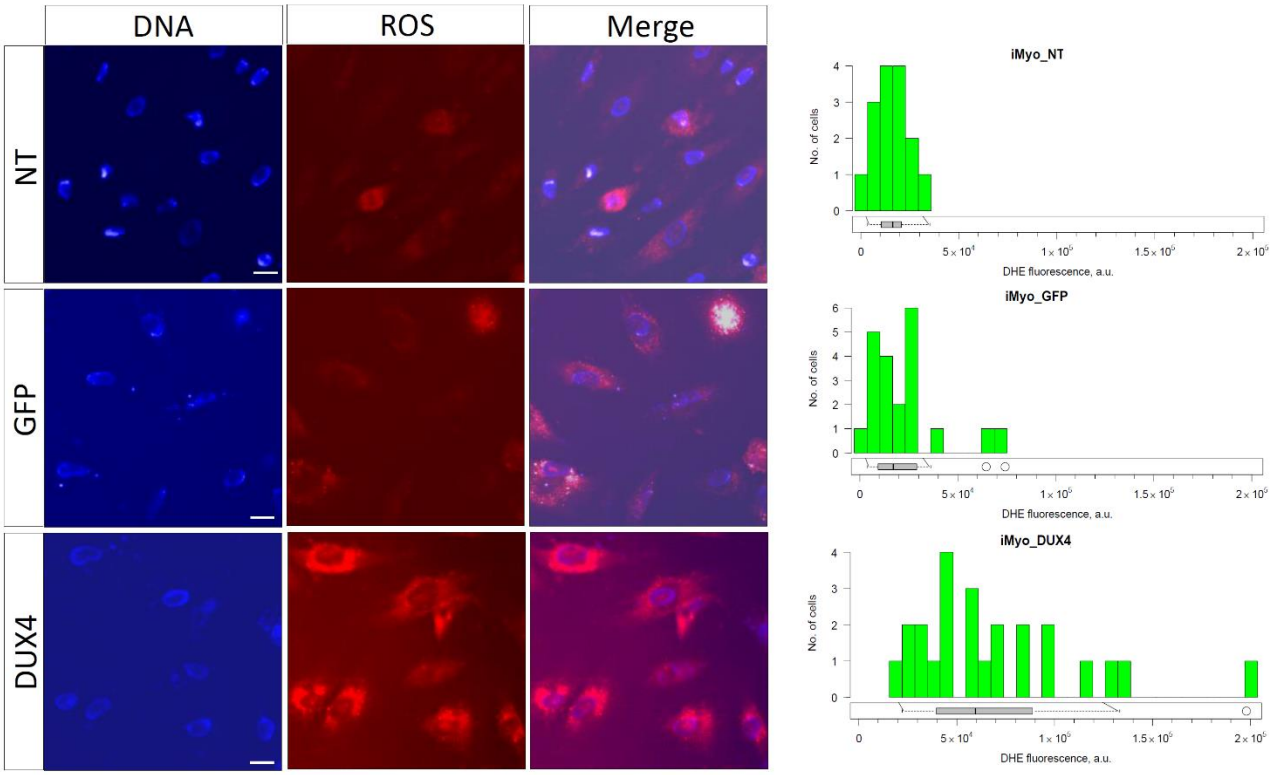
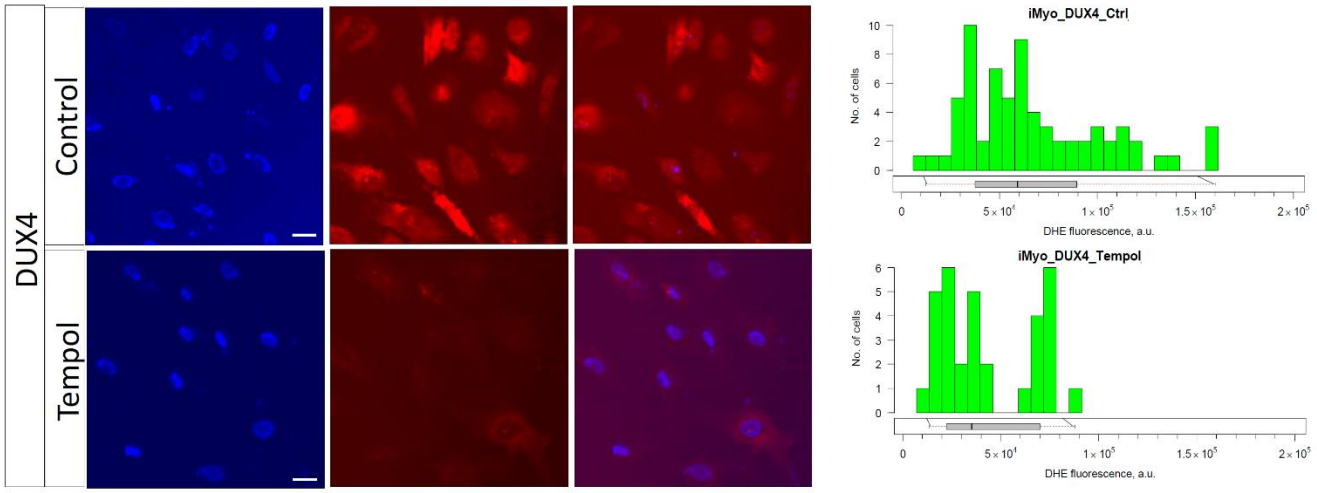

A
B
NT
DUX4
Control
Tempol
Control
Tempol
No. of cells
iMyo_NT , Tail moment
iMyo_NT.Tempol , Tail moment
iMyo_DUX4 , Tail moment
iMyo_DUX4.Tempol , Tail moment

Figure S4 Revised 23/6

A



B



C

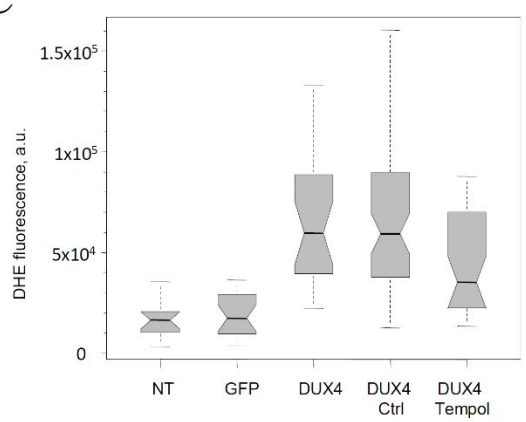
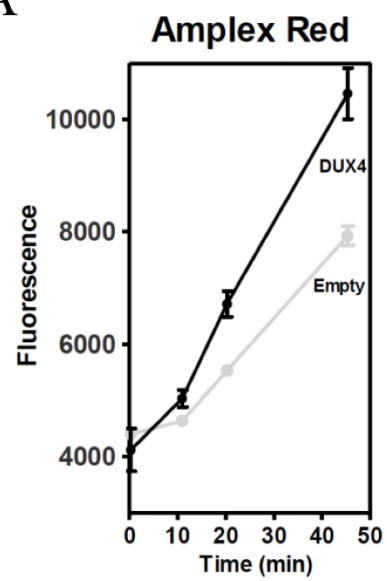
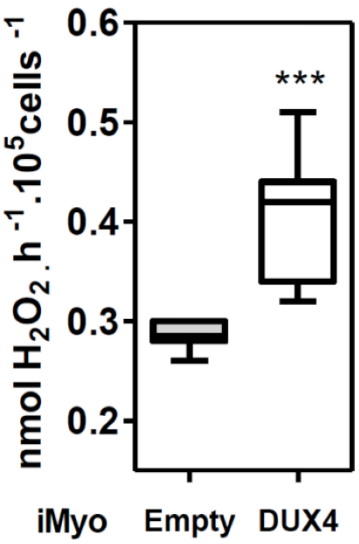


Figure S5

A



B



C

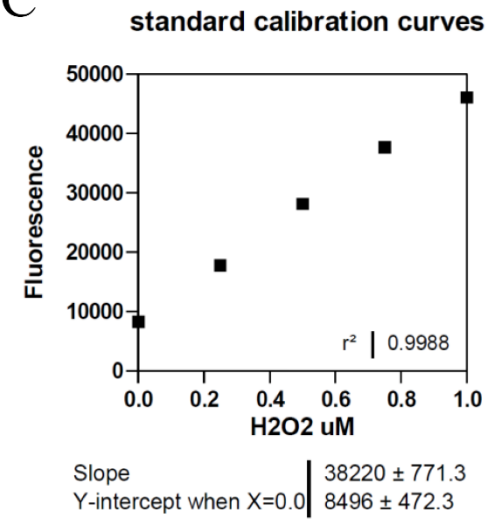


Figure S6

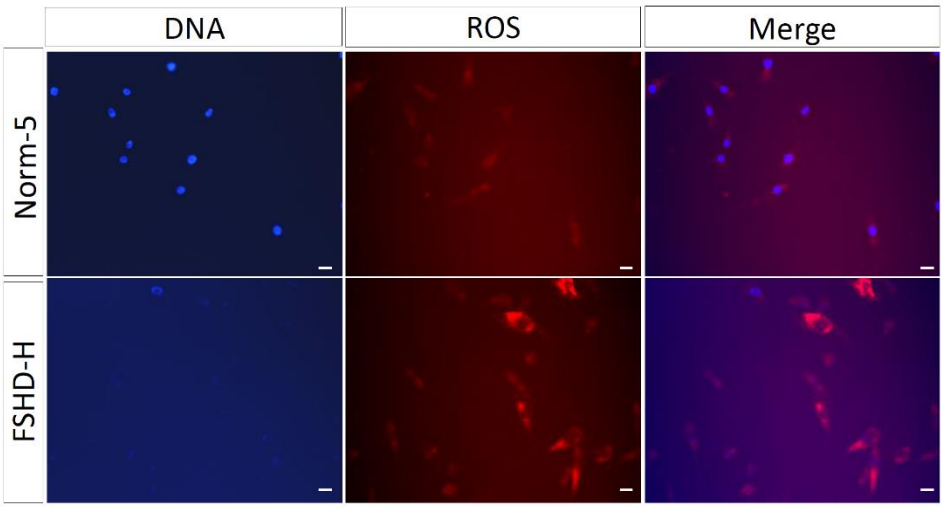
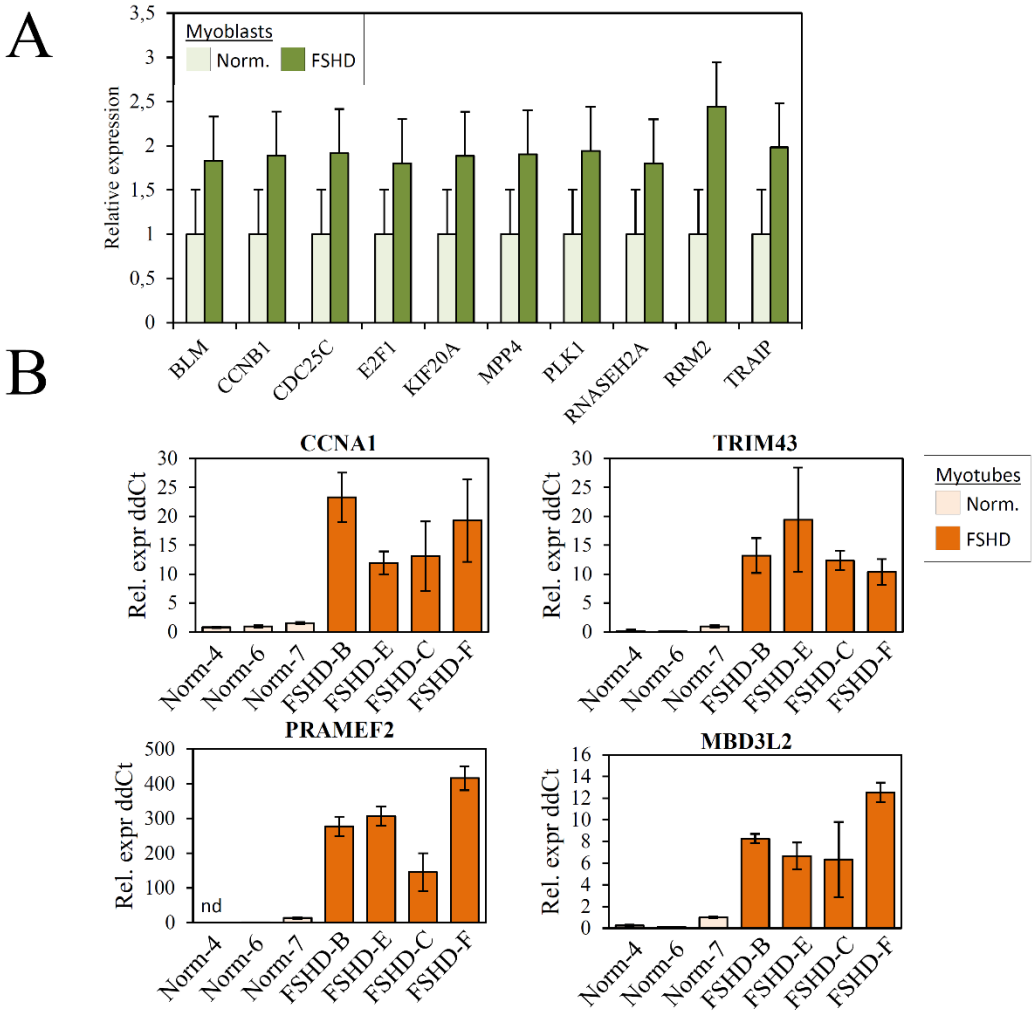


Figure S7


A
Myoblasts
Norm.
FSHD
Relative expression
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
BLM
CCNB1
CDC25C
E2F1
KIF20A
MPP4
PLK1
RNASEH2A
RRM2
TRAIP
B
CCNA1
TRIM43
PRAMEF2
MBD3L2
Rel. expr ddCt
Myotubes
Norm.
FSHD
nd
Norm-4
Norm-6
Norm-7
FSHD-B
FSHD-E
FSHD-C
FSHD-F

Supplementary Table S1. Cell lines used in the study. MB - myoblasts, MT-myotubes, ND not determined.

	Patient	Tissue	Sex	D4Z4 repeats
Norm	Norm-1	paravertebral	F	ND
	Norm-2	quadriceps	M	ND
	Norm-3	quadriceps	F	ND
	Norm-4	quadriceps	M	ND
	Norm-5	quadriceps	M	ND
	Norm-6	quadriceps	M	ND
	Norm-7	quadriceps	F	ND
FSHD	FSHD-A	quadriceps	F	8
	FSHD-B	pyramidal	F	5/7
	FSHD-C	quadriceps	F	7
	FSHD-D	quadriceps	F	7
	FSHD-E	quadriceps	F	4
	FSHD-F	trapezius	M	5
	FSHD-G	infraspinatus	M	ND
	FSHD-H	quadriceps	M	5
	FSHD-I	quadriceps	M	7
	FSHD-J	quadriceps	M	6

Supplementary Table S2. Gene ontology functional categories assembled in superclusters.

Supercluster1_Cell_cycle	
	GO:0007049~cell cycle
	GO:0022403~cell cycle phase
	GO:0000279~M phase
	GO:0022402~cell cycle process
	GO:0007067~mitosis
	GO:0000280~nuclear division
	GO:0000087~M phase of mitotic cell cycle
	GO:0048285~organelle fission
	GO:0000278~mitotic cell cycle
	GO:0051301~cell division
	GO:0051726~regulation of cell cycle
	GO:0010564~regulation of cell cycle process
	GO:0007346~regulation of mitotic cell cycle
	GO:0000075~cell cycle checkpoint
	GO:0051783~regulation of nuclear division
	GO:0007088~regulation of mitosis
	GO:0033043~regulation of organelle organization
	GO:0051329~interphase of mitotic cell cycle
	GO:0051325~interphase
	GO:0007093~mitotic cell cycle checkpoint
	GO:0007094~mitotic cell cycle spindle assembly checkpoint
	GO:0045841~negative regulation of mitotic metaphase/anaphase transition
	GO:0030071~regulation of mitotic metaphase/anaphase transition
	GO:0031577~spindle checkpoint
	GO:0051784~negative regulation of nuclear division
	GO:0045839~negative regulation of mitosis
	GO:0010948~negative regulation of cell cycle process
Supercluster9_DNA_Replication_and_nucleotide_biosynthesis	
	GO:0006260~DNA replication
Supercluster2_DNA_repair	
	GO:0006259~DNA metabolic process
	GO:0006974~response to DNA damage stimulus
	GO:0006281~DNA repair
	GO:0033554~cellular response to stress
	GO:0006310~DNA recombination
	GO:0051052~regulation of DNA metabolic process
	GO:0000724~double-strand break repair via homologous recombination
	GO:0000725~recombinational repair
	GO:0006302~double-strand break repair
	GO:0031570~DNA integrity checkpoint
	GO:0051053~negative regulation of DNA metabolic process
	GO:0008156~negative regulation of DNA replication
	GO:0000077~DNA damage checkpoint
	GO:0006275~regulation of DNA replication
Supercluster6_Chromosome_and_chromatin_organization	
	GO:0051276~chromosome organization
	GO:0006323~DNA packaging
	GO:0065004~protein-DNA complex assembly
	GO:0031497~chromatin assembly
	GO:0006333~chromatin assembly or disassembly
	GO:0006334~nucleosome assembly
	GO:0034728~nucleosome organization
	GO:0006325~chromatin organization
	GO:0034622~cellular macromolecular complex assembly
	GO:0034621~cellular macromolecular complex subunit organization
	GO:0065003~macromolecular complex assembly
	GO:0043933~macromolecular complex subunit organization
Supercluster4_Chromosome_segregation	
	GO:0007059~chromosome segregation
	GO:0000070~mitotic sister chromatid segregation
	GO:0000819~sister chromatid segregation
	GO:0030261~chromosome condensation
	GO:0007076~mitotic chromosome condensation

Supercluster3_Microtubule_cytoskeleton_organization and localization	
	GO:0007017~microtubule-based process
	GO:0000226~microtubule cytoskeleton organization
	GO:0007051~spindle organization
	GO:0007010~cytoskeleton organization
	GO:0031023~microtubule organizing center organization
	GO:0051297~centrosome organization
	GO:0007098~centrosome cycle
	GO:0033043~regulation of organelle organization
	GO:0032886~regulation of microtubule-based process
	GO:0070507~regulation of microtubule cytoskeleton organization
	GO:0051640~organelle localization
	GO:0051656~establishment of organelle localization
Supercluster5_Meiosis	
	GO:0007126~meiosis
	GO:0051327~M phase of meiotic cell cycle
	GO:0051321~meiotic cell cycle
Supercluster7_Cell_signaling	
	GO:0048015~phosphoinositide-mediated signaling
	GO:0019932~second-messenger-mediated signaling

Supplementary Table S3. Functional annotation of genes differentially expressed in FSHD myoblasts.

Gene name	Cell_cycle	DNA_Replication	DNA_repair	Chromatin_organization	Chromosome_segregation	Cytoskeleton	Meiosis	Cell_signaling	FC	Description
ASF1B				X					1,7	anti-silencing function 1B histone chaperone
ASPM	X								1,8	asp (abnormal spindle) homolog, microcephaly associated (Drosophila)
AURKA	X					X		X	1,6	aurora kinase A
AURKB	X								1,8	aurora kinase B
BLM	X	X	X	X					1,9	Bloom syndrome, RecQ helicase-like
BRCA1	X	X	X		X	X			1,7	breast cancer 1, early onset
BRCA2	X	X	X	X		X	X		1,9	breast cancer 2, early onset
BUB1	X								1,9	BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase
BUB1B	X					X		X	1,8	BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase B
CCNA2	X								2,2	cyclin A2
CCNB1	X								1,9	cyclin B1
CCNB2	X								1,7	cyclin B2
CDC20	X								1,8	cell division cycle 20
CDC25C	X	X	X						1,9	cell division cycle 25C
CDC6	X	X	X						1,9	cell division cycle 6
CDCA2	X								1,7	cell division cycle associated 2
CDCA3	X								1,7	cell division cycle associated 3
CDCA5	X			X	X				1,9	cell division cycle associated 5
CDCA8	X			X					1,9	cell division cycle associated 8
CDK2	X	X	X						1,8	cyclin-dependent kinase 2
CDKN2C	X								1,6	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)
CDKN3	X								1,8	cyclin-dependent kinase inhibitor 3
CDT1	X	X	X						2,1	chromatin licensing and DNA replication factor 1
CENPA	X			X		X			1,8	centromere protein A
CENPE	X			X	X	X			1,7	centromere protein E, 312kDa
CENPF	X	X	X	X	X				1,9	centromere protein F, 350/400kDa
CENPJ	X					X			1,5	centromere protein J
CENPO	X				X				1,7	centromere protein O
CEP250	X					X			1,4	centrosomal protein 250kDa
CEP55	X								1,8	centrosomal protein 55kDa
CEP72	X					X			1,8	centrosomal protein 72kDa
CHAF1A	X	X	X	X					1,6	chromatin assembly factor 1, subunit A (p150)
CHAF1B	X	X	X	X					2,2	chromatin assembly factor 1, subunit B (p60)
CIT	X								1,6	citron rho-interacting serine/threonine kinase
CKAP5	X					X			1,4	cytoskeleton associated protein 5
CKS1B	X								1,6	CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B
CLSPN	X	X	X						2,1	claspin
CUZD1	X								1,6	CUB and zona pellucida-like domains 1
DBF4	X	X	X						1,6	DBF4 zinc finger
DLGAP5	X			X	X				1,8	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 5
DNAH8						X			#DIV/0!	dynein, axonemal, heavy chain 8
DSCC1	X	X	X	X	X				1,9	defective in sister chromatid cohesion 1 homolog (S. cerevisiae)
DSN1	X				X				1,7	DSN1, MIS12 kinetochore complex component
DTL		X	X						2,1	denticleless E3 ubiquitin protein ligase homolog (Drosophila)
DTYMK	X								1,6	deoxythymidylate kinase (thymidylate kinase)
E2F1	X								1,6	E2F transcription factor 1
ERCC6L	X								2,2	excision repair cross-complementation group 6-like
ESCO2	X		X						2,0	establishment of sister chromatid cohesion N-acetyltransferase 2
EXO1	X		X				X		1,8	exonuclease 1
FAM83D	X								2,0	family with sequence similarity 83, member D
FANCC			X						1,4	Fanconi anemia, complementation group C
FANCD2	X		X	X			X		2,0	Fanconi anemia, complementation group D2
FANCI	X		X						1,7	Fanconi anemia, complementation group I
FEN1		X	X					X	1,6	flap structure-specific endonuclease 1

GAS2L3	X							1,6	growth arrest-specific 2 like 3
GMNN	X							1,6	geminin, DNA replication inhibitor
GSG2	X			X				1,6	germ cell associated 2 (haspin)
GTSE1	X					X		1,7	G-2 and S-phase expressed 1
H1FX				X				1,4	H1 histone family, member X
H2AFX	X		X	X			X	1,6	H2A histone family, member X
H3F3B				X				1,5	H3 histone, family 3B (H3.3B)
H3F3C				X				1,4	H3 histone, family 3C
HAT1				X				1,4	histone acetyltransferase 1
HAUS8	X					X		1,6	HAUS augmin-like complex, subunit 8
HELLS	X		X	X				1,9	helicase, lymphoid-specific
HIST1H1B				X				2,3	histone cluster 1, H1b
HIST1H2AI				X				1,5	histone cluster 1, H2ai
HIST1H2AJ				X				1,5	histone cluster 1, H2aj
HIST1H2AM				X				1,7	histone cluster 1, H2am
HIST1H3B				X				1,8	histone cluster 1, H3b
HIST1H3C				X				1,4	histone cluster 1, H3c
HIST1H3D				X				1,2	histone cluster 1, H3d
HIST1H3G				X				1,4	histone cluster 1, H3g
HIST1H3H				X				1,3	histone cluster 1, H3h
HIST1H3I				X				1,4	histone cluster 1, H3i
HIST1H4A				X			X	1,7	histone cluster 1, H4a
HIST1H4B				X			X	1,9	histone cluster 1, H4b
HIST1H4C				X			X	2,0	histone cluster 1, H4c
HIST1H4D				X			X	1,8	histone cluster 1, H4d
HIST1H4L				X			X	1,9	histone cluster 1, H4l
HIST2H2AB				X				2,1	histone cluster 2, H2ab
HIST2H3A				X				1,3	histone cluster 2, H3a
HIST2H3C				X				1,3	histone cluster 2, H3c
HIST2H3D				X				1,4	histone cluster 2, H3d
HIST2H4A				X			X	1,3	histone cluster 2, H4a
HIST2H4B				X			X	1,3	histone cluster 2, H4b
HJURP	X			X	X			1,7	Holliday junction recognition protein
HLTF				X				1,4	helicase-like transcription factor
HMGB1		X	X	X				1,5	high mobility group box 1
HMGN2				X				1,4	high mobility group nucleosomal binding domain 2
KIF11	X					X		2,0	kinesin family member 11
KIF15	X					X		1,9	kinesin family member 15
KIF18B						X		1,7	kinesin family member 18B
KIF20A						X		1,8	kinesin family member 20A
KIF20B	X					X		1,9	kinesin family member 20B
KIF22	X		X			X		1,6	kinesin family member 22
KIF23	X					X		1,6	kinesin family member 23
KIF2C	X					X		1,8	kinesin family member 2C
KIF4A						X		1,6	kinesin family member 4A
KIF4B						X		1,6	kinesin family member 4B; kinesin family member 4A
KIFC1	X			X	X	X		1,7	kinesin family member C1
KNTC1	X							1,7	kinetochore associated 1
LIN9	X	X	X					1,7	lin-9 DREAM MuvB core complex component
LRRCC1	X							1,6	leucine rich repeat and coiled-coil centrosomal protein 1
MAD2L1	X			X	X			1,8	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)
MCM10		X	X					2,1	minichromosome maintenance complex component 10
MCM2	X	X	X	X				1,7	minichromosome maintenance complex component 2
MCM3	X	X	X					1,8	minichromosome maintenance complex component 3
MCM5	X	X	X					1,8	minichromosome maintenance complex component 5
MKI67	X						X	2,0	marker of proliferation Ki-67
MND1	X		X				X	1,9	meiotic nuclear divisions 1 homolog (S. cerevisiae)
MNS1	X						X	1,6	meiosis-specific nuclear structural 1
MSH2	X		X	X				1,6	mutS homolog 2
NCAPG	X			X	X			1,8	non-SMC condensin I complex, subunit G
NCAPG2	X			X				1,5	non-SMC condensin II complex, subunit G2
NCAPH	X			X	X			1,9	non-SMC condensin I complex, subunit H
NDC80	X			X	X	X		X	1,8	NDC80 kinetochore complex component
NEIL3			X					2,2	nei endonuclease VIII-like 3 (E. coli)
NEK2	X			X	X	X	X		1,9	NIMA-related kinase 2
NUSAP1	X			X	X	X			1,7	nucleolar and spindle associated protein 1

OIP5	X								1,9	Opa interacting protein 5
PBK	X								1,9	PDZ binding kinase
PCNA		X	X					X	1,6	proliferating cell nuclear antigen
PDS5B	X			X	X				1,3	PDS5 cohesin associated factor B
PKMYT1	X								1,9	protein kinase, membrane associated tyrosine/threonine 1
PLK1	X						X		1,7	polo-like kinase 1
PLK4	X								2,0	polo-like kinase 4
POLD3		X	X						1,6	polymerase (DNA-directed), delta 3, accessory subunit
POLE2		X	X						2,1	polymerase (DNA directed), epsilon 2, accessory subunit
POLQ		X	X						2,2	polymerase (DNA directed), theta
PRC1	X					X			1,7	protein regulator of cytokinesis 1
PRIM1		X	X						2,2	primase, DNA, polypeptide 1 (49kDa)
PSIP1			X						1,9	PC4 and SFRS1 interacting protein 1
PSRC1	X					X			1,7	proline/serine-rich coiled-coil 1
RACGAP1	X								1,7	Rac GTPase activating protein 1
RAD51	X	X	X				X		1,8	RAD51 recombinase
RAD51AP1			X						1,9	RAD51 associated protein 1
RBL1	X			X					2,0	retinoblastoma-like 1
RECQL4			X						1,5	RecQ protein-like 4
RFC2		X	X						1,7	replication factor C (activator 1) 2, 40kDa
RFC4		X	X					X	1,7	replication factor C (activator 1) 4, 37kDa
RFC5		X	X						2,0	replication factor C (activator 1) 5, 36.5kDa
RNASEH2A		X	X						1,7	ribonuclease H2, subunit A
RPA1	X	X	X	X			X		1,4	replication protein A1, 70kDa
RRM1		X	X						1,5	ribonucleotide reductase M1
RRM2		X	X						2,2	ribonucleotide reductase M2
SGOL2	X			X	X		X		1,9	shugoshin-like 2 (S. pombe)
SKA1	X				X				1,9	spindle and kinetochore associated complex subunit 1
SKA2	X				X				1,4	spindle and kinetochore associated complex subunit 2
SKA3	X				X				2,0	spindle and kinetochore associated complex subunit 3
SMC2	X			X	X				1,8	structural maintenance of chromosomes 2
SMC4	X			X	X				1,9	structural maintenance of chromosomes 4
SMCHD1				X					1,5	structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain containing 1
SPAG5	X					X		X	1,7	sperm associated antigen 5
SRPK1					X				1,4	SRSF protein kinase 1
SUV39H1	X			X					1,6	suppressor of variegation 3-9 homolog 1 (Drosophila)
SUV39H2	X			X			X		1,5	suppressor of variegation 3-9 homolog 2 (Drosophila)
SYCE2	X						X		1,4	synaptonemal complex central element protein 2
TACC3	X					X			1,7	transforming, acidic coiled-coil containing protein 3
TIPIN	X	X	X						1,6	TIMELESS interacting protein
TK1		X	X						1,7	thymidine kinase 1, soluble
TOP2A		X	X	X	X			X	1,8	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa
TPX2	X								1,8	TPX2, microtubule-associated
TTK	X					X			2,0	TTK protein kinase
TYMS		X	X					X	1,9	thymidylate synthetase
UBE2C	X					X		X	1,8	ubiquitin-conjugating enzyme E2C
USP1			X						1,5	ubiquitin specific peptidase 1
WHSC1				X					1,4	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1
WRAP53			X	X					1,5	WD repeat containing, antisense to TP53
ZWINT	X			X	X	X		X	1,8	ZW10 interacting kinetochore protein

Supplementary Table S4. Functional annotation of genes differentially expressed in FSHD myotubes.

Gene name	cell migration	FC	Description
PRKCA	X	1,434869	protein kinase C, alpha
TGFBR3	X	2,05229	transforming growth factor, beta receptor III
NEUROG2	X	4,694493	neurogenin 2
PTEN	X	1,237847	phosphatase and tensin homolog

GO:0016477~cell migration

Supplementary Table S5. Functional annotation of genes differentially expressed in FSHD myotubes.

Gene name	cell migration	FC	Description
PRKCA	X	1,434869	protein kinase C, alpha
TGFBR3	X	2,05229	transforming growth factor, beta receptor III
NEUROG2	X	4,694493	neurogenin 2
PTEN	X	1,237847	phosphatase and tensin homolog

GO:0016477~cell migration

Ce travail met en évidence la présence constitutive de dommages de l'ADN causés principalement par le stress oxydant dans les myoblastes primaires FSHD ainsi que dans les myoblastes normaux immortalisés transfectés par *DUX4*. Nos résultats démontrent la présence d'un lien direct entre l'expression de *DUX4* et la surproduction de ROS intracellulaires causant des dommages de l'ADN, effet aboli dans les myoblastes FSHD suite à l'inhibition de *DUX4* par siARN ou suite à un traitement antioxydant. Tenant compte de l'ensemble de ces données, nous pouvons conclure que *DUX4* induit indirectement un stress génotoxique et ceci probablement en dérégulant, directement ou indirectement, au niveau transcriptionnel, l'expression des gènes nécessaires à l'homéostasie redox des myoblastes FSHD.

Par ailleurs, les myoblastes FSHD présentent un cycle cellulaire normal comparable à celui des myoblastes normaux, ce qui suggère leur adaptation à ces dommages à l'ADN chroniques. Cela peut être dû au fait que les cellules musculaires *in vivo* produisent des ROS plus que d'autres types cellulaires, en réponse à la respiration cellulaire et à leur fonction de contraction. Ces cellules seraient donc potentiellement capables de supporter des dommages de l'ADN et de résister au stress oxydant plus que d'autres types cellulaires (Renault et al. 2002).

Le stress oxydant et le stress génotoxique peuvent affecter la différenciation myogénique. Nous démontrons dans ce travail qu'un traitement antioxydant maintenu pendant le processus de différenciation myogénique améliore significativement la forme des myotubes FSHD *in vitro*.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats a permis de mettre en évidence une nouvelle caractéristique cellulaire des myoblastes FSHD *in vitro* : **un stress oxydant à l'état basal lié à la surexpression de *DUX4*, induisant des dommages de l'ADN dans les myoblastes FSHD**. Ces phénomènes omniprésents dans les myoblastes FSHD **participent à sa pathophysiologie**, et un traitement antioxydant *in vitro* pendant la différenciation myogénique améliore significativement le phénotype des myotubes FSHD obtenus.

2 Les myoblastes FSHD sont capables de réparer les dommages de l'ADN modérés induits par de faibles doses de stress oxydant

Bou Saada Y, Dib C, Dmitriev P, Hamade A, Carnac G, Laoudj-Chenivesse D, Lipinski M, Vassetzky Y.S. Facioscapulohumeral dystrophy myoblasts efficiently repair moderate levels of oxidative DNA damage. *Histochem. Cell. Biol*. 2016, 145: 475-483.

Comme précédemment décrit, l'équilibre entre la production de ROS intracellulaires et les mécanismes de défense antioxydants est rompu dans les myoblastes FSHD (Laoudj-Chenivesse et al. 2005; Turki et al. 2012; Cheli et al. 2011; Tsumagari et al. 2011; Winokur, Barrett, et al. 2003). Ces dommages de l'ADN en résultant, s'ils ne sont pas détectés et efficacement réparés par les mécanismes de réparation de l'ADN, peuvent provoquer des mutations, des délétions et des translocations chromosomiques (Ferguson & Alt 2001; Helleday 2003; Knoch et al. 2012) menaçant ainsi l'intégrité génomique et cellulaire. Pour cela, nous nous intéressons dans cette deuxième partie des résultats à évaluer l'efficacité globale des myoblastes FSHD et des iMyo-DUX4 à réparer les dommages de l'ADN induits par un stress oxydant exogène. Nous avons eu recours au test des comètes afin d'évaluer indirectement l'activité des mécanismes de réparation de l'ADN (Collins 2004; Azqueta et al. 2014).

Histochem Cell Biol (2016) 145:475–483
DOI 10.1007/s00418-016-1410-2

ORIGINAL PAPER

Facioscapulohumeral dystrophy myoblasts efficiently repair moderate levels of oxidative DNA damage

Yara Bou Saada[1] · Carla Dib[1] · Petr Dmitriev[1] · Aline Hamade[3] · Gilles Carnac[2] · Dalila Laoudj-Chenivesse[2] · Marc Lipinski[1] · Yegor S. Vassetzky[1,4]

Accepted: 15 January 2016 / Published online: 9 February 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract Facioscapulohumeral dystrophy (FSHD) is a progressive muscular dystrophy linked to a deletion of a subset of D4Z4 macrosatellite repeats accompanied by a chromatin relaxation of the D4Z4 array on chromosome 4q. In vitro, FSHD primary myoblasts show altered expression of oxidative-related genes and are more susceptible to oxidative stress. Double homeobox 4 (*DUX4*) gene, encoded within each D4Z4 unit, is normally transcriptionally silenced but is found aberrantly expressed in skeletal muscles of FSHD patients. Its expression leads to a deregulation of DUX4 target genes including those implicated in redox balance. Here, we assessed DNA repair efficiency of oxidative DNA damage in FSHD myoblasts and DUX4-transfected myoblasts. We have shown that the DNA repair activity is altered neither in FSHD myoblasts nor in immortalized human myoblasts transiently expressing *DUX4*. DNA damage caused by moderate doses of an oxidant is efficiently repaired while FSHD myoblasts exposed for 24 h to high levels of oxidative stress accumulated more DNA damage than normal myoblasts, suggesting that FSHD myoblasts remain more vulnerable to oxidative stress at high doses of oxidants.

✉ Yegor S. Vassetzky
vassetzky@igr.fr

1 UMR 8126, CNRS, Univ. Paris-Sud, Institut de Cancérologie Gustave-Roussy, Université Paris Saclay, 94805 Villejuif, France

2 INSERM U-1046, 371 Avenue du Doyen Gaston Giraud, 34295 Montpellier, France

3 ER030-EDST, Department of Life and Earth Sciences, Faculty of Sciences II, Lebanese University, Beirut, Lebanon

4 Koltzov Institute of Developmental Biology, Moscow 117334, Russia

Keywords DNA repair · DNA damage · Oxidative stress · DUX4 · Facioscapulohumeral dystrophy

Introduction

Facioscapulohumeral dystrophy (FSHD) is a muscular autosomal genetic disease described in 1885 by French neurologists Landouzy and Dejerine. The clinical features of FSHD usually appear during the second decade, and they are regional, are often asymmetric, and typically concern the muscles of the face and upper extremities, but can progress caudally with the age to affect abdominal muscles and the musculature of the lower limbs and feet. The disease progression is relatively slow [for review, see (Tawil and Van Der Maarel 2006)]. Although life expectancy is not reduced, life quality of FSHD patients is affected; about 20 % of individuals become wheelchair dependent after the age of 50 (Statland et al. 2013), and about 1 % of FSHD patients develop respiratory insufficiency requiring the use of a ventilator (Wohlgemuth et al. 2004). Several non-muscle tissues can be frequently affected in FSHD; about 75 % of FSHD patients suffer from high-frequency hearing loss (Brouwer et al. 1991; Padberg et al. 1995) and 60 % from retinal telangiectasia (Fitzsimons et al. 1987; Padberg et al. 1995).

FSHD is the third most common myopathy, and current estimates of its prevalence in the European population range from 1:14,000 to 1:20,000. The most common genetic form of FSHD (FSHD1) is caused by a deletion of a subset of D4Z4 macrosatellite repeats, mapped to the subtelomeric region of chromosome 4. In the normal population, the size of the D4Z4 repeat array varies from 11 to 150 of 3.3 Kb copies, and each D4Z4 unit has an open reading frame containing two homeobox sequences

designated as DUX4 (double homeobox 4) [(Clapp et al. 2007; Gabriels et al. 1999; Lyle et al. 1995)], whereas FSHD1 patients carry only one to ten D4Z4 units. Moreover, at least one D4Z4 unit is necessary to cause FSHD since 4q monosomy, including the deletion of the D4Z4 array, did not result in FSHD (Tupler et al. 1996). The D4Z4 array is GC-rich and its heterochromatic structure confers an epigenetic repression on DUX4, whose expression in adults is strictly limited to male testis (Snider et al. 2010). The repeat contraction found in FSHD1 is associated with decreased repressive epigenetic marks in the D4Z4 units and global organization of chromatin (Petrov et al. 2006; Pirozhkova et al. 2008; van Overveld et al. 2003; Zeng et al. 2009). DUX4 overexpression in human primary myoblasts activates expression of germ line genes, and with most of them found upregulated in cultured FSHD muscle cells and in FSHD muscle biopsies, DUX4 also induces suppressors of differentiation in skeletal muscle and inhibits the innate immune response (Geng et al. 2012). DUX4 also activates genes associated with RNA slicing and processing and ubiquitin ligases implicated in atrophy (Vanderplanck et al. 2011) as well as expression of several miRNAs (Dmitriev et al. 2013). Several other effects of DUX4 expression in skeletal muscles have been described; DUX4 induces apoptotic cell death in muscle cells via p53 activation (Kowaljow et al. 2007; Wallace et al. 2011; Wuebbles et al. 2010), DUX4 overexpression alters the expression of genes implicated in redox balance (Bosnakovski et al. 2008; Sharma et al. 2013), and DUX4 enhances the sensitivity of C2C12 myoblasts to a pro-oxidant compound, Paraquat (Bosnakovski et al. 2008; Winokur et al. 2003); increased oxidative stress vulnerability was also observed in in vitro cultured FSHD myoblasts (Barro et al. 2010; Winokur et al. 2003).

Endogenous or exogenously induced oxidative stress can be toxic to cells due to the high capacity of reactive oxygen species (ROS) to attack cellular proteins, lipids and DNA. Oxidative stress has been implicated in various pathological conditions including neurological disorders, diabetes, cardiovascular disease, aging and cancer (Dalle-Donne et al. 2006; Dhalla et al. 2000; Jenner 2003; Sayre et al. 2001).

ROS reaction with DNA results in oxidized nucleotide bases and other types of DNA damage including single- and double-stranded breaks. DNA damage plays a major role in mutagenesis, carcinogenesis and aging.

Mammalian cells have a series of defense mechanisms against free radical-induced oxidative stress, including enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses (superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, vitamins C and E, glutathione, etc.). Equilibrium between the level of ROS and the antioxidant activity is essential for cell viability.

Several transcriptome and proteome signatures of FSHD primary myoblasts have shown a deregulation of oxidative stress-related genes (Cheli et al. 2011; Laoudj-Chenivesse et al. 2005; Tsumagari et al. 2011; Winokur et al. 2003); products and markers of oxidative stress (protein carbonylation, lipid peroxidation, reduced ratio between reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione) are found in blood and biopsies of FSHD patients (Turki et al. 2012). These data clearly indicate that FSHD cells have lost the equilibrium between ROS production and antioxidant defense mechanisms.

Cells activate DNA damage response (DDR) pathways in response to oxidative stress and in order to preserve the DNA integrity and ensure cell survival; these include sensors of DNA damage, signal transducers and effectors [for review, see (Marechal and Zou 2013)]. DDR pathways are coordinated throughout the cell cycle to prevent DNA damage accumulation. Inefficient or altered DNA repair mechanisms can lead to deletions and translocations of chromosomal segments, illegitimate recombination and point mutations (Ferguson and Alt 2001; Helleday 2003; Iarovaia et al. 2014; Knoch et al. 2012).

In the present work, we tested whether oxidative stress affected DNA repair efficiency in cells from FSHD patients and immortalized human myoblasts transfected with DUX4, a potential FSHD inducer gene. We found that at the low level of oxidative stress, DNA repair activity was not altered in FSHD myoblasts or iMyo-DUX4 as compared to control cells. However, at higher level of oxidative stress, these cells failed to repair ROS-induced DNA damage.

Materials and methods

Cell culture

Primary myoblasts were isolated from skeletal muscle biopsies of FSHD patients and healthy subjects and purified using CD56/NCAM magnetic beads (Miltenyi Biotec) as previously described (Barro et al. 2010). The myoblasts were cultured in collagen-coated cell culture dishes (Sigma-Aldrich #C 8919) in the proliferation medium [DMEM (Gibco #41966-029), 20 % FBS (Gibco #10270-106), 4 mM L-glutamine, 50 µg/ml gentamicin (Gibco #15710) and 1 µg/ml fungizone (Gibco #15290)] and passaged at a cell confluency not exceeding 30 %.

Human immortalized myoblasts LHCN-M2 derived from a healthy subject ("iMyo") (a kind gift of Dr. V. Mouly, Institute of Myology, Paris) were cultured in the medium composed of four parts of high-glucose DMEM and one part of Medium 199 (Sigma-Aldrich #M4530) supplemented with 20 % FBS, 1 % penicillin–streptomycin

(Gibco #15140-122) and 2.5 µg/ml plasmocin (Invivogen #ant-mpp).

Transfections

To overexpress DUX4, the plasmid pCI-NeoDUX4 containing the ORF of human DUX4 gene under control of the CMV promoter (a kind gift of Dr. Belayew, University of Mons, Belgium) was used; as a control, phrGFP-N1 (Stratagene) plasmid was used.

iMyo transfection was carried out in six-well plates. In 1.7 ml of culturing medium, 200,000 cells were mixed with 600 µl of OptiMEM (Gibco #31985062) containing 2 µg of plasmid DNA and 1 µl of Lipofectamine 2000 (Invitrogen #11668-019) per well. The culture medium was changed 24 h post-transfection, and the cells were killed 48 h post-transfection.

H_2O_2 treatment

The cells were plated 24 h pre-treatment in six-well plates at a density of 200,000 cells/well in 2 ml of medium. The H_2O_2 treatment was carried out 24 h post-transfection. A series of dilution of the H_2O_2 stock solution (Sigma-Aldrich #H1009-100 ml) was done in sterile water (1 M, 100 mM and 10 mM). The 10 mM H_2O_2 solution was then directly diluted in the culture medium in order to obtain the final concentrations (25, 50, 100 and 500 µM). The cells were then washed with 1× PBS and collected at 15 min and 24 h post-treatment for short-term and long-term treatments, respectively.

Alkaline comet assay and scoring for DNA damage

The alkaline comet assay was performed using the Trevigen Comet Assay kit (Trevigen #4250050-k) and 20-well CometSlide™ (Trevigen #4252-500-01). Briefly, the cells were combined at 1.10^5 cells/ml with a molten low-melting-point agarose (LMAgarose) at 37 °C at the ratio of 1/10 (v/v), and 50 µl was deposed onto a 20-well pre-coated CometSlide™. The agarose was allowed to jellify by placing the slides flat at 4 °C in the dark for 15 min. The slides were then immersed in a pre-chilled lysis solution (Trevigen #4250-050-01) for 1 h at 4 °C to remove the membrane, cellular proteins and histones. Following lysis, DNA unwinding was completed by incubating the slides in a freshly prepared alkaline unwinding solution (200 mM NaOH, 1 mM EDTA pH > 13) for 1 h at room temperature. The slides were then subjected to electrophoresis at 21 V for 30 min at 4 °C in the same alkaline solution, washed twice with dH_2O for 5 min each, washed in 70 % ethanol for 5 min, dried at 37 °C for 30 min and stained with 50 µl of diluted SYBR Green solution (1/10,000 in TE buffer pH 7.5, Trevigen #4250-050-05). The slides were allowed to dry completely at room temperature before the observation under the epifluorescence microscope (Microvision Instruments, excitation/emission: 494/521 nm, 20× zoom). Images of 100 randomly selected non-overlapping cells were captured and analyzed using TriTek CometScore software. The tail moment (TM; the measure of tail length multiplied by tail intensity) was calculated to evaluate the extent of DNA damage. Mean values from at least 100 nuclei were used in calculations.

Immunofluorescence staining and quantification

Primary myoblasts were fixed with 2 % PFA (Euromedex) for 5 min, permeabilized with 0.25 % triton X-100 (Sigma-Aldrich #T8787) for 5 min, blocked with 0.5 % BSA (Euromedex), incubated with mouse monoclonal antibodies against γH2AX (phospho-Ser139 H2AX, Active Motif #39117, 1:500) for 1 h, stained with Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG (Life Technologies #A-21200, 1:100, excitation/emission: 488/519 nm, green fluorescence) for 1 h, mounted with a mounting medium containing DAPI (Vector Laboratories) and observed under a fluorescent microscope (Microvision Instruments, excitation/emission: 488/519 nm, green fluorescence).

Real-time RT-PCR

Total RNA was isolated from cultured cells using Nucleospin RNA isolation kit (Macherey–Nagel #740955). Reverse transcription was carried out on 100 ng RNA using RevertAid reverse transcriptase (Thermo Fisher #EP0441) as described in the manufacturer's protocol. A PCR was then performed on 1 µl of cDNA products using FastStart SYBR Green Master (Roche #04673484001) following the manufacturer's instructions. For each RNA sample, the following reagents were mixed: 10 µl FastStart SYBR Green Master mix, 1 µl of forward primer, 1 µl of reverse primer and 7 µl of nuclease-free water, for a total reaction volume of 20 µl. RT-PCR reactions were performed in duplicate or triplicate. Reactions were run in a StepOnePlus thermal cycler (Life Technologies) using the following program: one step at 95 °C 10 min followed by 40 cycles including one step at 95 °C for 15 s and one step at 60 °C for one minute. The relative expression of each gene was calculated according to the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ quantification method.

Statistical analysis

All data were presented as mean ± standard error of the mean (SEM). Data were analyzed with GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Comet assay results were analyzed using one-way

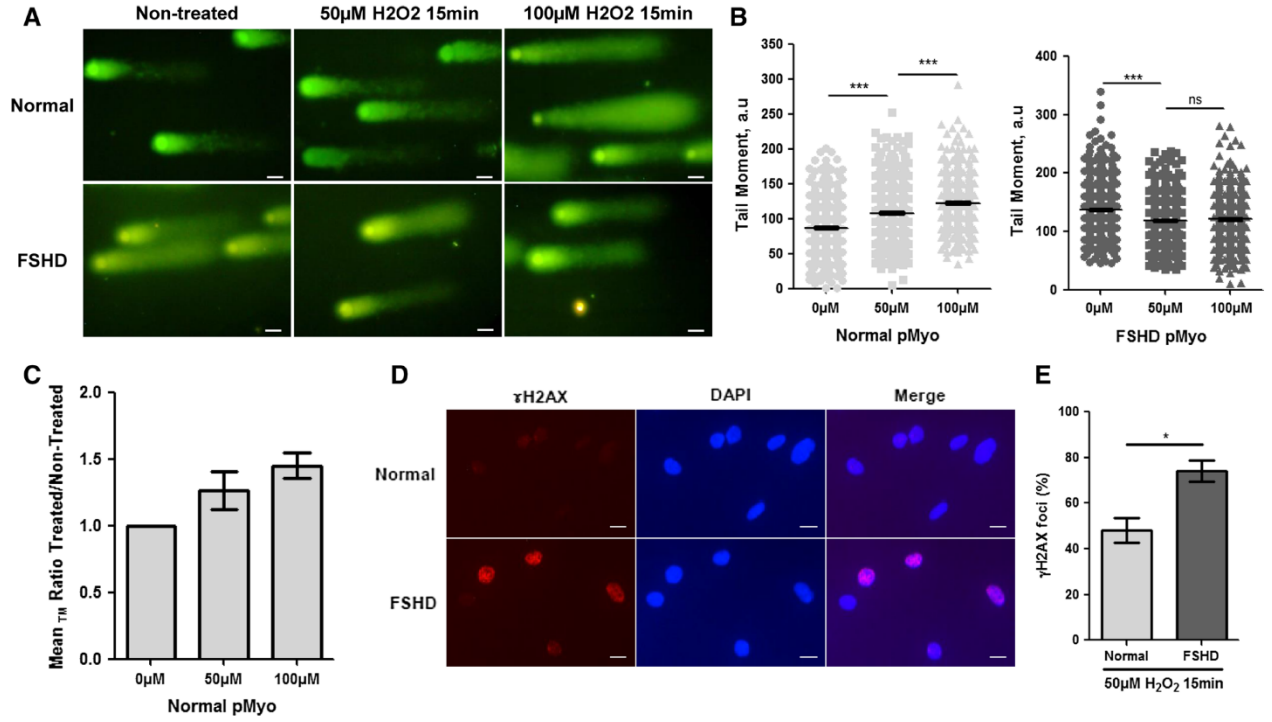


Fig. 1 DNA repair of damages induced by a short-term treatment with low doses of oxidative stress in FSHD myoblasts. **a** Fluorescent imaging of comets obtained from primary myoblasts isolated from an FSHD patient (MO44) and a healthy subject (NO44) after a short-term treatment with 50 and 100 µM H_2O_2. Comets are stained with SybrGreen; representative images are shown, ×20 magnification, *bar* 10 µm. **b** Scatter plot representation of comet tail moments measured in primary myoblasts from 6 FSHD patients (MO37, MO44, MO47, MO51, MO54 and FSHD10) and five healthy controls (NO40, NO42, NO44, NO46 and NO47) shortly treated with 50 µM and 100 µM H_2O_2. ***Bonferroni's multiple comparison test p value <0.0001, *ns* nonsignificant, *a.u.* arbitrary unit. **c** Histograms representing the ratio of tail moments (TM) mean values of myoblasts treated with 50 or 100 µM H_2O_2 to non-treated myoblasts. (*Left*) Histogram representing normal myoblasts includes five mean values of five different normal primary myoblasts culture. Kruskal–Wallis test p value = 0.0554 (marginally significant). (*Right*) Histogram representing FSHD myoblasts includes six mean values of six different FSHD primary myoblasts culture. Kruskal–Wallis test p value = 0.0163. **d** Representative immunofluorescent imaging of γH2AX foci in primary myoblasts from a healthy subject NO42 and the FSHD patient MO54; ×20 magnification, *bar* 10 µm. **e** Percentage of nuclei containing γH2AX foci of primary myoblasts from two healthy subjects and three FSHD patients treated for 15 min with 50 µM H_2O_2; each histogram integrates two independent quantifications with at least 100 nuclei analyzed in each experiment. *Mann–Whitney test p value <0.05

analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparison tests. The ratio of TM mean values of treated (50 µM H_2O_2) to untreated normal and FSHD myoblasts was calculated using the Kruskal–Wallis test. The Mann–Whitney test was performed to evaluate the statistical significance of DNA repair gene expression levels and repeated γH2AX immunofluorescence results.

Results

FSHD cells efficiently repair DNA damage induced by low doses of oxidative stress

To evaluate the DNA repair efficiency in FSHD and normal myoblasts, we briefly (15 min) treated primary myoblasts derived from six different FSHD patients and five healthy controls with increasing concentrations of hydrogen peroxide (50 and 100 µM H_2O_2) and tested the level of DNA damage using the alkaline comet assay. In the absence of H_2O_2 treatment, the tail moment (TM), a parameter reflecting the extent of DNA damage, was higher in FSHD myoblasts as compared to normal cells (Dmitriev et al. 2016, submitted). Interestingly, while in normal cells the level of DNA damage increased proportionally to H_2O_2 concentrations, in FSHD cells it significantly decreased at both 50 µM and 100 µM H_2O_2 (Fig. 1a–c). We conclude that although the initial amount of damaged DNA was higher in FSHD cells, they repaired H_2O_2-induced DNA damage more efficiently than normal cells.

In order to confirm this, we measured the level of γH2AX, a direct target of ATM signaling acting as a sensor

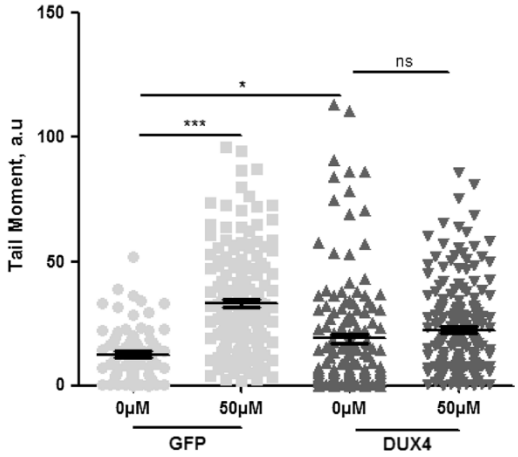


Fig. 2 DNA repair of damages induced by a short-term treatment with low doses of oxidative stress in DUX4-transfected immortalized myoblasts. Scatter plot representation of comet tail moments measured in GFP and DUX4-transfected iMyo shortly treated with 50 µM H_2O_2. ***Bonferroni's multiple comparison test p value <0.0001, *p value <0.05, *ns* nonsignificant, *a.u.* arbitrary unit

of double-strand breaks and responsible for recruiting the DNA repair machinery to the sites of damage, in the control and FSHD cells treated for 15 min with 50 µM H_2O_2; it was approximately 1.5 times higher in FSHD cells as compared to normal myoblasts (Mann–Whitney test, p value = 0.0381) (Fig. 1d). These results are in accordance with the overexpression of DNA repair genes in FSHD myoblasts (Dmitriev et al. submitted).

This hyperactivation of DNA repair may allow FSHD cells to respond rapidly to a punctual and moderate exogenous oxidative stress and to efficiently repair additional DNA damages caused by the treatment. This effect may be caused by high activity of DNA repair machinery in FSHD cells.

Human myoblasts transfected with the FSHD candidate gene DUX4 responded to low doses of oxidative stress similarly to FSHD myoblasts

DUX4 is currently considered to be a major candidate for FSHD (Dmitriev et al. 2009; Lemmers et al. 2010; Snider et al. 2010; van der Maarel et al. 2011). To test whether the overexpression of DUX4, a major FSHD candidate gene, is sufficient to provide the cells with the ability to more efficiently repair DNA damage, we have transfected *DUX4*-containing plasmid into immortalized human myoblasts (iMyo). In agreement with Dmitriev et al. submitted, we found that DUX4 overexpression induced DNA damage in iMyo cells. However, when shortly exposed to 50 µM of H_2O_2 DUX4-transfected cells showed a nonsignificant increase in DNA damage, whereas GFP-overexpressing iMyo showed a significantly increased level of DNA damage that was two times more elevated at this concentration (one-way ANOVA, p value <0.0001) (Fig. 2). Even though DNA damage level was similar in DUX4-transfected cells treated with 50 µM H_2O_2 and in non-treated iMyo-DUX4, as we observed in FSHD myoblasts, treated iMyo-DUX4 had significantly less DNA damage than treated control iMyo-GFP. These results show that iMyo-DUX4 tend to react to mild and short oxidative stress similarly to FSHD myoblasts; DUX4 overexpression not only increased the level of DNA damage but also provided the cells with a similar capacity to repair DNA damage induced by short exposure to low doses of H_2O_2 as observed in FSHD cells.

We thus hypothesized that the introduction of DNA damage prior to 50 µM H_2O_2 challenge is the prerequisite for the better responsiveness of cellular DNA repair machinery to supplementary DNA damage.

Primary myoblasts pre-treated with low doses of H_2O_2 efficiently repair DNA in case of oxidative stress

To confirm that pre-activation of DNA damage pathway makes cells resistant to low doses of oxidative stress, we tried to reproduce a situation of constitutive oxidative stress observed in FSHD cells by treating a normal primary myoblasts cell culture NO42 with a low H_2O_2 concentration (25 µM) for 4 passages (12 days). These pre-treated cells showed higher levels of DNA strand breaks compared with non-pre-treated cells (Fig. 3A). They were then shortly exposed to 50 µM H_2O_2, as described in the previous section. The pre-treated cells had less DNA damage after a short and moderate treatment with H_2O_2 similarly to FSHD myoblasts (one-way ANOVA, p value <0.0001). The expression levels of genes involved in different DNA repair pathways were significantly (*Rad50*, *Rad51*) or slightly (*FANCD2*, *BRCA2*, *ERCC1*, *MSH6*) upregulated in pre-treated cells (Fig. 3b).

Taken together, these data confirm that the presence of constitutive oxidative stress sensitizes the cells to additional oxidative damage, probably by the activation of DNA repair pathways at the basal state. Similarly, FSHD myoblasts efficiently repair DNA breaks after a short exposure to moderate doses of H_2O_2. Interestingly, a relatively short period of DUX4 overexpression (48 h after the transfection) was sufficient to recapitulate this effect.

FSHD myoblasts exposed to high doses of oxidants for 24 h show higher levels of damage than normal cells

It has been shown that FSHD myoblasts were more sensitive to oxidative stress and to high concentrations of H_2O_2 (Barro et al. 2010; Turki et al. 2012; Winokur et al. 2003). We thus tested whether the FSHD myoblasts were able to

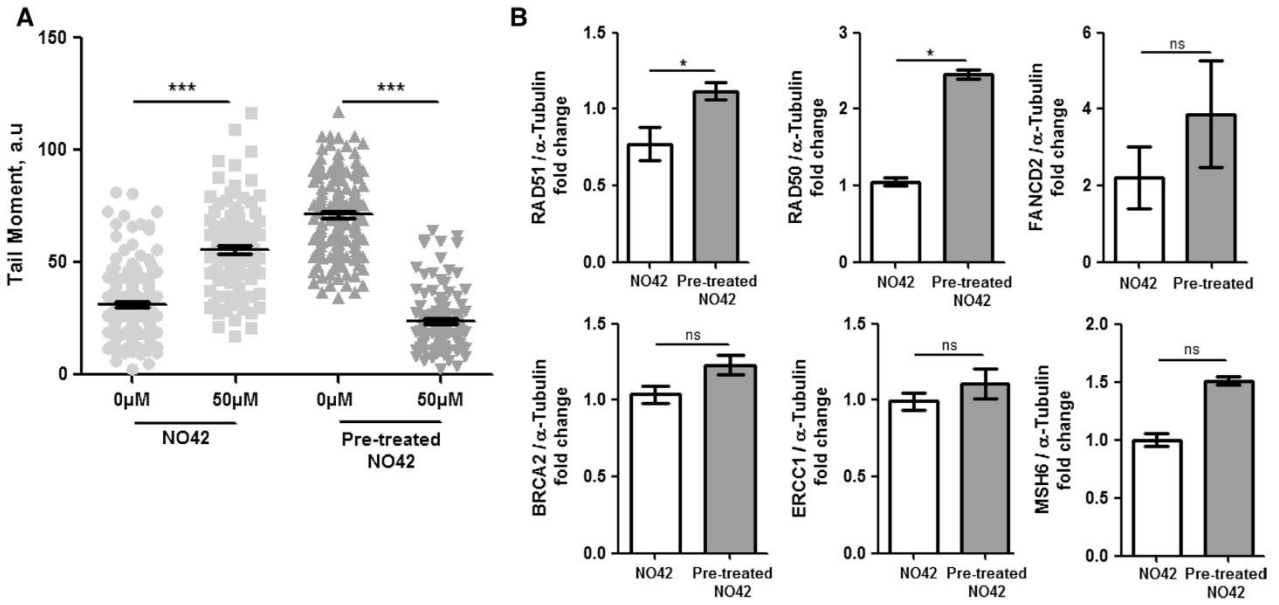


Fig. 3 Normal primary myoblasts pre-treated with low doses of H_2O_2 efficiently repair DNA in case of oxidative stress. **a** Scatter plot representation of comet tail moments measured in pre-treated NO42 cells shortly exposed to 50 µM H_2O_2. ***Bonferroni's multiple comparison test p value <0.0001, *a.u.* arbitrary unit. **b** Real-time PCR analysis of DNA repair genes expression in normal NO42 and pre-treated NO42 myoblast, using α-tubulin expression as an internal control. *Mann–Whitney test p value <0.05, *ns* nonsignificant

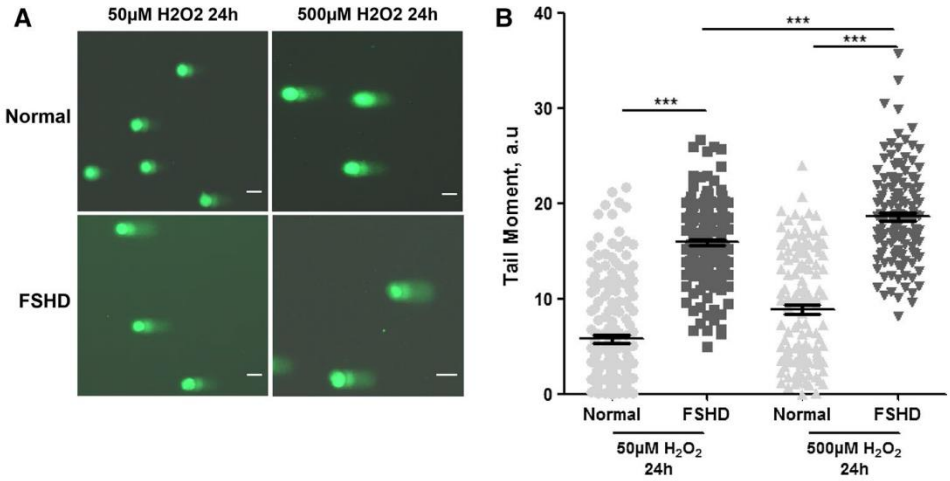


Fig. 4 DNA damage induced by high doses of oxidative stress and DNA repair in FSHD primary myoblasts. **a** Representative fluorescent imaging of comets obtained from a normal primary myoblasts cell culture NO42 and an FSHD primary myoblasts cell culture MO37, treated for 24 h with 50 and 500 µM H_2O_2. Comets are stained with SybrGreen. Representative images are shown, ×20 magnification, *bar* 10 µm. **b** Scatter plot representation of comet tail moments measured in two normal and two FSHD primary myoblasts treated for 24 h with 50 and 500 µM H_2O_2. ***Bonferroni's multiple comparison test p value <0.0001, *a.u.* arbitrary unit

repair DNA damage induced by 500 µM concentration of H_2O_2 which is considered to be a critical threshold for FSHD myoblast viability (Barro et al. 2010). Again, we have evaluated the DNA damage using the alkaline comet assay in FSHD and normal myoblasts after a 24-h treatment with a moderate (50 µM) and a high (500 µM) concentrations of H_2O_2. The treatment with 500 µM H_2O_2 resulted in a higher level of DNA damage in both normal cells and FSHD myoblasts (Fig. 4). Interestingly, the 700 µM H_2O_2 treatment led to FSHD myoblasts cell death, whereas the DNA damage level in normal myoblasts in this condition was similar to that of FSHD myoblasts at 500 µM H_2O_2 (data not shown).

We thus concluded that FSHD cells could efficiently repair DNA damage induced by moderate (50–100 µM) but not high (500 µM) concentrations of H_2O_2. We suggest that a higher than normal efficiency of DNA repair of FSHD cells is an adaptation to constitutive DNA damage previously (Dmitriev et al. submitted) present in these cells. However, at higher H_2O_2 concentrations the threshold of DNA repair capacity in FSHD myoblasts is exceeded, resulting in the accumulation of unrepaired DNA damage and cell death.

Discussion

Previous studies have reported an altered expression of redox-related genes (Cheli et al. 2011; Laoudj-Chenivesse et al. 2005; Tsumagari et al. 2011; Winokur et al. 2003) and the presence of several markers of oxidative stress (Turki et al. 2012) in FSHD myoblasts. The cellular redox homeostasis can be disrupted when the antioxidant system is deregulated; an imbalance between the antioxidant system and the production of reactive oxygen species (ROS) (free radicals and reactive metabolites) occurs and ROS become abundant [for review (Durackova 2010)]. ROS are known to increase mutation rates and interfere in many cellular signaling causing their disruptions and leading to cell proliferation and transformation (Burdon et al. 1990; Nicco et al. 2005). Thus, oxidative stress is thought to be involved in cancer development in humans (Halliwell 2007) and is also involved in other diseases including diabetes, neurodegenerative diseases and chronic inflammation [for review see (Valko et al. 2007)]. Chronic inflammation can also lead to oncogenic transformation by several mechanisms including cell proliferation and genomic instability (Coussens and Werb 2002). Taken together, these evidences show that a high ROS generation predisposes human cells to cancer.

Interestingly, FSHD cells show transcriptional profiles similar to cancer cells (Dmitriev et al. 2014). FSHD myoblasts also suffer from an endogenous and constant oxidative stress that alters the cell components and can probably be implicated in other signaling pathways (i.e., inflammation). DNA repair mechanisms are likely solicited as a response to the constitutive oxidative stress. As inefficient DNA repair can lead to chromosomal translocations, illegitimate recombination and point, this could play a potential role in the pathogenesis of FSHD: recombination may lead to reduction in the number of D4Z4 repeats in the 4q35 (Lemmers et al. 2004), and mutations/deletions of a chromatin modifier gene SMCHD1 may lead to a rare variant of FSHD, FSHD2 (Lemmers et al. 2012) and increase the severity of FSHD1 (Larsen et al. 2015).

We evaluated DNA repair capacity of FSHD myoblasts indirectly by measuring the level of DNA damage after a short-term and a long-term treatments with moderate and high doses of H_2O_2, using the alkaline comet assay technique.

A short-term treatment (15 min) with moderate doses of H_2O_2 (50 µM) led to an increase in the overall DNA damage proportionally to H_2O_2 concentrations in normal myoblasts, unlike FSHD myoblasts which DNA breaks decreased under these conditions. Similar effect was observed when normal cells were pre-treated with H_2O_2 or transfected with DUX4, a potential FSHD inducer gene.

Both H_2O_2 pre-treatment and DUX4 overexpression resulted in a higher basal level of DNA damage, and in both cases, we observed a more efficient repair of DNA damage induced by moderate concentrations of H_2O_2. Together, these results indicate that FSHD cells developed an adaptation to constitutive oxidative stress and a high level of DNA damage by increasing efficiency of DNA repair manifested by the overexpression of DNA damage-related genes (Dmitriev et al. submitted) and a superior ability to cope with supplementary DNA damage induced by moderate concentration of H_2O_2.

Although this adaptive reaction is clearly beneficial when FSHD cells have to deal with moderate level of oxidative stress, a higher basal level of DNA damage results in a faster saturation of DNA repair machinery when FSHD cells have to face high levels of oxidative stress. Our results thus provide an explanation of previously observed vulnerability of FSHD cells to high concentration of H_2O_2.

Muscular dystrophies can predispose to cancer (Chamberlain et al. 2007; Fanzani et al. 2013; Fernandez et al. 2010; Schmidt et al. 2011); for example, myotonic dystrophy patients have a high risk of developing cancer (Gadalla et al. 2011; Win et al. 2012). Rhabdomyosarcoma (Sirvent et al. 2009), Ewing's sarcoma (Kawamura-Saito et al. 2006) and undifferentiated soft tissue sarcoma (Graham et al. 2012; Italiano et al. 2012; Yoshimoto et al. 2009) share the same rearrangement of the 4q35 locus as for FSHD, and the transcription signature of FSHD myoblasts and myotubes reveals a differential expression of cancer-related genes and similarities between Ewing's sarcoma and FSHD cells (Dmitriev et al. 2014). These data suggest that FSHD patients could be more susceptible to develop cancer, but with the exception of several reports describing isolated cases of FSHD patients with cancer (Kazakov et al. 2009; Yazici et al. 2013), medical histories of FSHD families did not show, for now, any higher prevalence of FSHD patients developing cancer than the population. Our work shows that the DNA repair capacity of FSHD myoblasts subjected to a punctual and moderate oxidative stress is functional, and at high doses of oxidants, the threshold of tolerated-DNA damage is reached and FSHD myoblasts undergo apoptosis as previously described. The efficient DNA repair system and cell cycle arrest and apoptosis could explain, at least partly, the reason why DNA damage and oxidative stress do not lead to cancer in FSHD.

Acknowledgments This research was supported by the MEGAFSHD grant from the Association Française contre les Myopathies (AFM) to YSV.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

References

Barro M, Carnac G, Flavier S, Mercier J, Vassetzky Y, Laoudj-Chenivesse D (2010) Myoblasts from affected and non-affected FSHD muscles exhibit morphological differentiation defects. J Cell Mol Med 14:275–289

Bosnakovski D, Xu Z, Gang EJ, Galindo CL, Liu M, Simsek T, Garner HR, Agha-Mohammadi S, Tassin A, Coppee F, Belayew A, Perlingeiro RR, Kyba M (2008) An isogenetic myoblast expression screen identifies DUX4-mediated FSHD-associated molecular pathologies. EMBO J 27:2766–2779

Brouwer OF, Padberg GW, Ruys CJ, Brand R, de Laat JA, Grote JJ (1991) Hearing loss in facioscapulohumeral muscular dystrophy. Neurology 41:1878–1881

Burdon RH, Gill V, Rice-Evans C (1990) Oxidative stress and tumour cell proliferation. Free Radical Res Commun 11:65–76

Chamberlain JS, Metzger J, Reyes M, Townsend D, Faulkner JA (2007) Dystrophin-deficient mdx mice display a reduced life span and are susceptible to spontaneous rhabdomyosarcoma. FASEB J 21:2195–2204

Cheli S, Francois S, Bodega B, Ferrari F, Tenedini E, Roncaglia E, Ferrari S, Ginelli E, Meneveri R (2011) Expression profiling of FSHD-1 and FSHD-2 cells during myogenic differentiation evidences common and distinctive gene dysregulation patterns. PLoS ONE 6:e20966

Clapp J, Mitchell LM, Bolland DJ, Fantes J, Corcoran AE, Scotting PJ, Armour JA, Hewitt JE (2007) Evolutionary conservation of a coding function for D4Z4, the tandem DNA repeat mutated in facioscapulohumeral muscular dystrophy. Am J Hum Genet 81:264–279

Coussens LM, Werb Z (2002) Inflammation and cancer. Nature 420:860–867

Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A (2006) Biomarkers of oxidative damage in human disease. Clin Chem 52:601–623

Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T (2000) Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. J Hypertens 18:655–673

Dmitriev P, Lipinski M, Vassetzky YS (2009) Pearls in the junk: dissecting the molecular pathogenesis of facioscapulohumeral muscular dystrophy. Neuromuscul Disord 19:17–20

Dmitriev P, Stankevicins L, Ansseau E, Petrov A, Barat A, Dessen P, Robert T, Turki A, Lazar V, Labourer E, Belayew A, Carnac G, Laoudj-Chenivesse D, Lipinski M, Vassetzky YS (2013) Defective regulation of microRNA target genes in myoblasts from facioscapulohumeral dystrophy patients. J Biol Chem 288:34989–35002

Dmitriev P, Kairov U, Robert T, Barat A, Lazar V, Carnac G, Laoudj-Chenivesse D, Vassetzky YS (2014) Cancer-related genes in the transcription signature of facioscapulohumeral dystrophy myoblasts and myotubes. J Cell Mol Med 18:208–217

Durackova Z (2010) Some current insights into oxidative stress. Physiol Res 59:459–469

Fanzani A, Monti E, Donato R, Sorci G (2013) Muscular dystrophies share pathogenetic mechanisms with muscle sarcomas. Trends Mol Med 19:546–554

Ferguson DO, Alt FW (2001) DNA double strand break repair and chromosomal translocation: lessons from animal models. Oncogene 20:5572–5579

Fernandez K, Serinagaoglu Y, Hammond S, Martin LT, Martin PT (2010) Mice lacking dystrophin or alpha sarcoglycan spontaneously develop embryonal rhabdomyosarcoma with cancer-associated p53 mutations and alternatively spliced or mutant Mdm2 transcripts. Am J Pathol 176:416–434

Fitzsimons RB, Gurwin EB, Bird AC (1987) Retinal vascular abnormalities in facioscapulohumeral muscular dystrophy. A general association with genetic and therapeutic implications. Brain 110((Pt 3)):631–648

Gabriels J, Beckers MC, Ding H, De Vriese A, Plaisance S, van der Maarel SM, Padberg GW, Frants RR, Hewitt JE, Collen D, Belayew A (1999) Nucleotide sequence of the partially deleted D4Z4 locus in a patient with FSHD identifies a putative gene within each 3.3 kb element. Gene 236:25–32

Gadalla SM, Lund M, Pfeiffer RM, Gortz S, Mueller CM, Moxley RT 3rd, Kristinsson SY, Bjorkholm M, Shebl FM, Hilbert JE, Landgren O, Wohlfahrt J, Melbye M, Greene MH (2011) Cancer risk among patients with myotonic muscular dystrophy. JAMA 306:2480–2486

Geng LN, Yao Z, Snider L, Fong AP, Cech JN, Young JM, van der Maarel SM, Ruzzo WL, Gentleman RC, Tawil R, Tapscott SJ (2012) DUX4 activates germline genes, retroelements, and immune mediators: implications for facioscapulohumeral dystrophy. Dev Cell 22:38–51

Graham C, Chilton-MacNeill S, Zielenska M, Somers GR (2012) The CIC-DUX4 fusion transcript is present in a subgroup of pediatric primitive round cell sarcomas. Hum Pathol 43:180–189

Halliwell B (2007) Oxidative stress and cancer: have we moved forward? Biochem J 401:1–11

Helleday T (2003) Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells. Mutat Res 532:103–115

Iarovaia OV, Rubtsov M, Ioudinkova E, Tsfasman T, Razin SV, Vassetzky YS (2014) Dynamics of double strand breaks and chromosomal translocations. Mol Cancer 13:249

Italiano A, Sung YS, Zhang L, Singer S, Maki RG, Coindre JM, Antonescu CR (2012) High prevalence of CIC fusion with double-homeobox (DUX4) transcription factors in EWSR1-negative undifferentiated small blue round cell sarcomas. Genes Chromosom Cancer 51:207–218

Jenner P (2003) Oxidative stress in Parkinson's disease. Ann Neurol 53(Suppl 3):S26–S36 **(discussion S36–S28)**

Kawamura-Saito M, Yamazaki Y, Kaneko K, Kawaguchi N, Kanda H, Mukai H, Gotoh T, Motoi T, Fukayama M, Aburatani H, Takizawa T, Nakamura T (2006) Fusion between CIC and DUX4 up-regulates PEA3 family genes in Ewing-like sarcomas with t(4;19)(q35;q13) translocation. Hum Mol Genet 15:2125–2137

Kazakov V, Rudenko D, Schulev J, Pozdnyakov A (2009) Unusual association of FSHD and extramedullary thoracic tumour in the same patient: a case report. Acta Myol 28:76–79

Knoch J, Kamenisch Y, Kubisch C, Berneburg M (2012) Rare hereditary diseases with defects in DNA-repair. Eur J Dermatol 22:443–455

Kowaljow V, Marcowycz A, Ansseau E, Conde CB, Sauvage S, Matteotti C, Arias C, Corona ED, Nunez NG, Leo O, Wattiez R, Figlewicz D, Laoudj-Chenivesse D, Belayew A, Coppee F, Rosa AL (2007) The DUX4 gene at the FSHD1A locus encodes a pro-apoptotic protein. Neuromuscul Disord 17:611–623

Laoudj-Chenivesse D, Carnac G, Bisbal C, Hugon G, Bouillot S, Desnuelle C, Vassetzky Y, Fernandez A (2005) Increased levels of adenine nucleotide translocator 1 protein and response to oxidative stress are early events in facioscapulohumeral muscular dystrophy muscle. J Mol Med 83:216–224

Larsen M, Rost S, El Hajj N, Ferbert A, Deschauer M, Walter MC, Schoser B, Tacik P, Kress W, Muller CR (2015) Diagnostic approach for FSHD revisited: SMCHD1 mutations cause FSHD2 and act as modifiers of disease severity in FSHD1. Eur J Hum Genet 23:808–816

Lemmers RJ, Van Overveld PG, Sandkuijl LA, Vrieling H, Padberg GW, Frants RR, van der Maarel SM (2004) Mechanism and timing of mitotic rearrangements in the subtelomeric D4Z4 repeat involved in facioscapulohumeral muscular dystrophy. Am J Hum Genet 75:44–53

Lemmers RJ, van der Vliet PJ, Klooster R, Sacconi S, Camano P, Dauwerse JG, Snider L, Straasheijm KR, van Ommen GJ, Padberg GW, Miller DG, Tapscott SJ, Tawil R, Frants RR, van der Maarel SM (2010) A unifying genetic model for facioscapulohumeral muscular dystrophy. Science 329:1650–1653

Lemmers RJ, Tawil R, Petek LM, Balog J, Block GJ, Santen GW, Amell AM, van der Vliet PJ, Almomani R, Straasheijm KR, Krom YD, Klooster R, Sun Y, den Dunnen JT, Helmer Q, Donlin-Smith CM, Padberg GW, van Engelen BG, de Greef JC, Aartsma-Rus AM, Frants RR, de Visser M, Desnuelle C, Sacconi S, Filippova GN, Bakker B, Bamshad MJ, Tapscott SJ, Miller DG, van der Maarel SM (2012) Digenic inheritance of an SMCHD1 mutation and an FSHD-permissive D4Z4 allele causes facioscapulohumeral muscular dystrophy type 2. Nat Genet 44:1370–1374

Lyle R, Wright TJ, Clark LN, Hewitt JE (1995) The FSHD-associated repeat, D4Z4, is a member of a dispersed family of homeobox-containing repeats, subsets of which are clustered on the short arms of the acrocentric chromosomes. Genomics 28:389–397

Marechal A, Zou L (2013) DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. Cold Spring Harb Perspect Biol 5:a012716

Nicco C, Laurent A, Chereau C, Weill B, Batteux F (2005) Differential modulation of normal and tumor cell proliferation by reactive oxygen species. Biomed Pharmacother 59:169–174

Padberg GW, Brouwer OF, de Keizer RJ, Dijkman G, Wijmenga C, Grote JJ, Frants RR (1995) On the significance of retinal vascular disease and hearing loss in facioscapulohumeral muscular dystrophy. Muscle Nerve Suppl 2:S73–S80

Petrov A, Pirozhkova I, Carnac G, Laoudj D, Lipinski M, Vassetzky YS (2006) Chromatin loop domain organization within the 4q35 locus in facioscapulohumeral dystrophy patients versus normal human myoblasts. Proc Natl Acad Sci USA 103:6982–6987

Pirozhkova I, Petrov A, Dmitriev P, Laoudj D, Lipinski M, Vassetzky Y (2008) A functional role for 4qA/B in the structural rearrangement of the 4q35 region and in the regulation of FRG1 and ANT1 in facioscapulohumeral dystrophy. PLoS ONE 3:e3389

Sayre LM, Smith MA, Perry G (2001) Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. Curr Med Chem 8:721–738

Schmidt WM, Uddin MH, Dysek S, Moser-Thier K, Pirker C, Hoger H, Ambros IM, Ambros PF, Berger W, Bittner RE (2011) DNA damage, somatic aneuploidy, and malignant sarcoma susceptibility in muscular dystrophies. PLoS Genet 7:e1002042

Sharma V, Harafuji N, Belayew A, Chen YW (2013) DUX4 differentially regulates transcriptomes of human rhabdomyosarcoma and mouse C2C12 cells. PLoS ONE 8:e64691

Sirvent N, Trassard M, Ebran N, Attias R, Pedeutour F (2009) Fusion of EWSR1 with the DUX4 facioscapulohumeral muscular dystrophy region resulting from t(4;22)(q35;q12) in a case of embryonal rhabdomyosarcoma. Cancer Genet Cytogenet 195:12–18

Snider L, Geng LN, Lemmers RJ, Kyba M, Ware CB, Nelson AM, Tawil R, Filippova GN, van der Maarel SM, Tapscott SJ, Miller DG (2010) Facioscapulohumeral dystrophy: incomplete suppression of a retrotransposed gene. PLoS Genet 6:e1001181

Statland JM, McDermott MP, Heatwole C, Martens WB, Pandya S, van der Kooi EL, Kissel JT, Wagner KR, Tawil R (2013) Reevaluating measures of disease progression in facioscapulohumeral muscular dystrophy. Neuromuscul Disord 23:306–312

Tawil R, Van Der Maarel SM (2006) Facioscapulohumeral muscular dystrophy. Muscle Nerve 34:1–15

Tsumagari K, Chang SC, Lacey M, Baribault C, Chittur SV, Sowden J, Tawil R, Crawford GE, Ehrlich M (2011) Gene expression during normal and FSHD myogenesis. BMC Med Genomics 4:67

Tupler R, Berardinelli A, Barbierato L, Frants R, Hewitt JE, Lanzi G, Maraschio P, Tiepolo L (1996) Monosomy of distal 4q does not cause facioscapulohumeral muscular dystrophy. J Med Genet 33:366–370

Turki A, Hayot M, Carnac G, Pillard F, Passerieux E, Bommart S, Raynaud de Mauverger E, Hugon G, Pincemail J, Pietri S, Lambert K, Belayew A, Vassetzky Y, Juntas Morales R, Mercier J, Laoudj-Chenivesse D (2012) Functional muscle impairment in facioscapulohumeral muscular dystrophy is correlated with oxidative stress and mitochondrial dysfunction. Free Radic Biol Med 53:1068–1079

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol 39:44–84

van der Maarel SM, Tawil R, Tapscott SJ (2011) Facioscapulohumeral muscular dystrophy and DUX4: breaking the silence. Trends Mol Med 17:252–258

van Overveld PG, Lemmers RJ, Sandkuijl LA, Enthoven L, Winokur ST, Bakels F, Padberg GW, van Ommen GJ, Frants RR, van der Maarel SM (2003) Hypomethylation of D4Z4 in 4q-linked and non-4q-linked facioscapulohumeral muscular dystrophy. Nat Genet 35:315–317

Vanderplanck C, Ansseau E, Charron S, Stricwant N, Tassin A, Laoudj-Chenivesse D, Wilton SD, Coppee F, Belayew A (2011) The FSHD atrophic myotube phenotype is caused by DUX4 expression. PLoS ONE 6:e26820

Wallace LM, Garwick SE, Mei W, Belayew A, Coppee F, Ladner KJ, Guttridge D, Yang J, Harper SQ (2011) DUX4, a candidate gene for facioscapulohumeral muscular dystrophy, causes p53-dependent myopathy in vivo. Ann Neurol 69:540–552

Win AK, Perattur PG, Pulido JS, Pulido CM, Lindor NM (2012) Increased cancer risks in myotonic dystrophy. Mayo Clin Proc 87:130–135

Winokur ST, Barrett K, Martin JH, Forrester JR, Simon M, Tawil R, Chung SA, Masny PS, Figlewicz DA (2003) Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) myoblasts demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. Neuromuscul Disord 13:322–333

Wohlgemuth M, van der Kooi EL, van Kesteren RG, van der Maarel SM, Padberg GW (2004) Ventilatory support in facioscapulohumeral muscular dystrophy. Neurology 63:176–178

Wuebbles RD, Long SW, Hanel ML, Jones PL (2010) Testing the effects of FSHD candidate gene expression in vertebrate muscle development. Int J Clin Exp Pathol 3:386–400

Yazici O, Aksoy S, Ozdemir N, Sendur MA, Dogan M, Zengin N (2013) A rare coincidence: facioscapulohumeral muscular dystrophy and breast cancer. Exp Oncol 35:311–312

Yoshimoto M, Graham C, Chilton-MacNeill S, Lee E, Shago M, Squire J, Zielenska M, Somers GR (2009) Detailed cytogenetic and array analysis of pediatric primitive sarcomas reveals a recurrent CIC-DUX4 fusion gene event. Cancer Genet Cytogenet 195:1–11

Zeng W, de Greef JC, Chen YY, Chien R, Kong X, Gregson HC, Winokur ST, Pyle A, Robertson KD, Schmiesing JA, Kimonis VE, Balog J, Frants RR, Ball AR Jr, Lock LF, Donovan PJ, van der Maarel SM, Yokomori K (2009) Specific loss of histone H3 lysine 9 trimethylation and HP1gamma/cohesin binding at D4Z4 repeats is associated with facioscapulohumeral dystrophy (FSHD). PLoS Genet 5:e1000559

Pris ensemble, ces résultats confirment que la présence constitutive de ROS et de dommages oxydatifs de l'ADN sensibilise les myoblastes FSHD au stress oxydant en provoquant, entre autres, la surexpression des gènes de réparation de l'ADN. Cela confère aux myoblastes FSHD une résistance aux dommages de l'ADN supplémentaires pouvant provenir d'un stress oxydant ponctuel et modéré, marquée par la réparation rapide et efficace des lésions de l'ADN.

Cependant, une exposition prolongée à des concentrations élevées de l'agent oxydant est accompagnée d'une saturation des mécanismes de réparation de l'ADN dans les myoblastes FSHD ; ~~l~~es dommages de l'ADN supplémentaires induits par ce stress oxydant exogène viennent s'ajouter aux lésions de l'ADN présentes à l'état basal dans les cellules des patients FSHD, qui atteignent alors le seuil de tolérance des lésions de l'ADN d'une façon précoce par rapport aux myoblastes normaux. Cela peut expliquer leur hypersensibilité au stress oxydant.

En conclusion, ces résultats mettent en évidence :

- l'adaptabilité des myoblastes FSHD aux dommages de l'ADN constitutifs,
- l'activation de leurs mécanismes de réparation de l'ADN en lien avec le sur-endommagement relatif de leur ADN,
- la bonne fonctionnalité de la réparation de l'ADN en réponse à un stress oxydant ponctuel et modéré,
- et le dépassement précoce du seuil de tolérance des dommages de l'ADN suite à une longue exposition des myoblastes FSHD à de fortes doses d'oxydant.

La bonne fonctionnalité du système de réparation de l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose pourraient expliquer, au moins en partie, pourquoi les dommages de l'ADN et le stress oxydant ne mènent pas à l'apparition de cancer chez les patients FSHD.

3 Stratégies de correction génomique de la FSHD

La forme la plus courante de la FSHD (FSHD1) résulte de la combinaison de 3 évènements génétiques au niveau du locus 4q35 : la diminution du nombre de répétitions D4Z4 (R. J. Lemmers et al. 2010), le polymorphisme centromérique 4qA161 (Lemmers et al. 2007; Kisseljova et al. 2014) et le polymorphisme télomérique 4qA (Lemmers et al. 2002). Corriger au moins un de ces trois évènements dans les cellules FSHD pourrait potentiellement arrêter/retarder la maladie. Etant donné qu'avec les moyens et les techniques actuelles, les thérapies cellulaires sont techniquement irréalisables dans le cadre des myopathies en général et sur les patients FSHD spécifiquement (revue détaillée dans **4.1**), nous visons donc à corriger *in vitro* un de ces défauts génomiques, le polymorphisme 4qA161, en ayant recours aux TALENs et aux CRISPR/Cas9 (**Figure 17**).

Dans le cadre de la correction génomique *in vitro* de la FSHD, nous nous concentrons majoritairement sur le polymorphisme 4qA161 de l'insulateur FR-MAR. En effet, ce dernier joue un rôle clé dans la régulation de la conformation chromatinienne et de l'expression génique du locus 4q35 (Petrov et al. 2006; Petrov et al. 2008; Kisseljova et al. 2014) (**Figure 4**). Dans les myoblastes normaux, l'insulateur est fonctionnel et limite l'effet des « enhancers » de part et d'autre sur leurs gènes cibles en séparant la région 4q35 en deux boucles chromatiniennes indépendantes. Dans les myoblastes FSHD, ces boucles chromatiniennes fusionnent et l'activité insulatrice est abolie, permettant ainsi l'expression des gènes en 4q35 (Petrov et al. 2006).

Nous visons donc à cibler la séquence 4qA161 pour réactiver sa fonction insulatrice et établir à nouveau une structure chromatinienne normale du locus 4q35. Cela se fera sur les cellules FSHD à l'aide de deux stratégies d'édition génomique différentes : la première étant de remplacer le variant 4qA161 par un variant non-pathogénique (par exemple 4qA166), et la deuxième d'amener le répresseur transcriptionnel CTCF (CCCTC-binding factor) jusqu'à la séquence insulatrice 4qA161 à l'aide du système CRISPR/dCas9.

Notre démarche expérimentale est divisée en trois parties : dans la première partie des résultats, nous vérifions la faisabilité de l'obtention *in vitro* de myotubes hybrides ayant un phénotype et un profil transcriptomique proches de ceux des myotubes normaux, et cela en fusionnant des myoblastes

FSHD avec des myoblastes provenant de donneurs sains. Dans la deuxième partie, nous traitons le développement et la validation des outils de l'ingénierie génétique, à savoir les TALENs et les CRISPR/Cas9 introduisant des coupures spécifiques au niveau de 4q35. Enfin, dans la troisième partie des résultats, nous exposons la conception du système CRISPR/dCas9 fusionné au répresseur transcriptionnel CTCF, dans le but ultime de proposer deux stratégies de correction génomique *in vitro* de la FSHD.

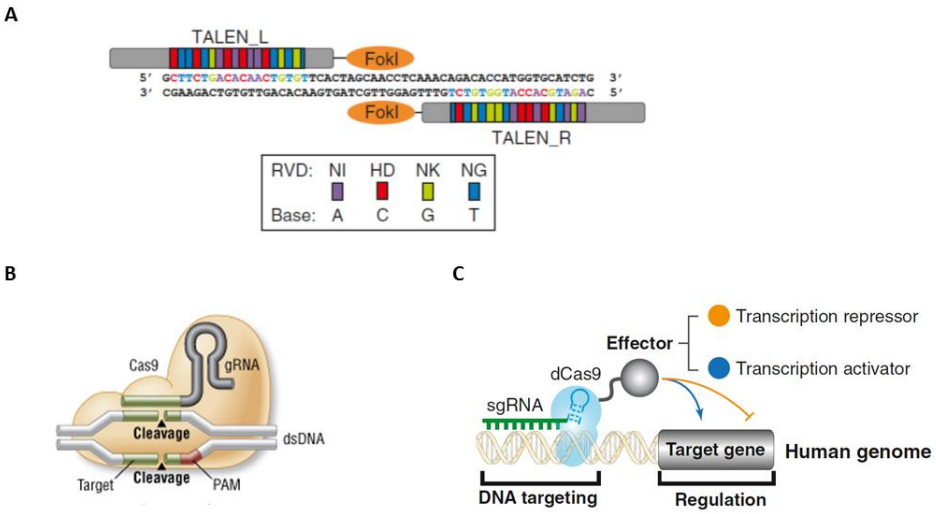


Figure 17. Représentation schématique d'une paire de TALEN ainsi que des systèmes CRISPR/Cas9 et CRISPR/dCas9 associés à leur séquence génomique cible. (A) Chaque monomère de TALEN est formé d'un domaine de liaison à l'ADN (TALE), constitué de répétitions de 33 ou 34 acides aminés identiques à l'exception de ceux en position 12 et 13 appelés RVD (Repeat-Variable Diresidues), dont l'extrémité C-terminale est fusionnée à un domaine de clivage de l'ADN non spécifique de l'endonucléase FokI. Chaque répétition au sein du domaine TALE reconnait spécifiquement une paire de base à l'aide du RVD qui confère alors la spécificité de liaison à l'ADN et l'identité de la séquence cible (bases en couleurs). Puisque le domaine FokI fonctionne en dimère, les TALENs fonctionnent toujours en paire : TALEN_L (pour Left) et TALEN_R (pour Right). La distance entre les sites de liaison de TALEN_L et TALEN_R définit la région « spacer » dans laquelle le dimère FokI coupe l'ADN double-brin. HD : reconnait une cytosine, NI : adénine, NG : thymine et NN : guanine. D'après Ramalingam et al. *Genome Biology* 2013. (B) L'ARN guide (gRNA) guide le complexe Cas9- gRNA vers la séquence génomique cible, séquence de 20 nucléotides complémentaire à celle du sgRNA (en vert) et suivie en 3' d'une séquence de 2 à 5 nucléotides nommée PAM (protospacer-associated motif, en rouge). La Cas9 induit une cassure double brin en amont de la séquence PAM. D'après www.neb.com. (C) Un variant de la Cas9 (dCas9) comprenant les mutations H840A et D10A dans les domaines HNH et RuvC respectivement inactivant la fonction catalytique de la nucléase, est utilisé dans le complexe dCas9-gRNA afin de cibler une séquence génomique spécifique sans la couper. En fusionnant un activateur/répresseur transcriptionnel à la dCas9, le système dCas9-gRNA est employé dans le but d'activer ou de réprimer l'expression des gènes cibles. D'après Gilbert et al. *Cell* 2013.

3.1 Correction phénotypique et transcriptomique des myotubes hybrides normaux-FSHD

Dib C, **Bou Saada Y**, Dmitriev P, Richon C, Dessen P, Laoudj-Chenivesse D, Carnac G, Lipinski M, Vassetzky Y.S. Correction of the FSHD myoblast differentiation defect by fusion with healthy myoblasts. *J. Cell. Physiol*. 231 : 62-71, 2016.

Les myoblasts FSHD manifestent des défauts morphologiques suite à la différenciation myogénique. En effet, lors de ce processus les myoblastes issus d'individus sains fusionnent et forment des myotubes ramifiés à noyaux alignés, tandis que les myotubes FSHD se présentent soit sous une forme atrophique, soit sous une forme large et désorganisée à distribution aléatoire des noyaux (Barro et al. 2010; Dib et al. 2015). Au niveau transcriptomique, les myoblastes FSHD présentent une dérégulation de l'expression de plusieurs gènes et voies de signalisation, notamment les gènes impliqués dans la différenciation myogénique (Winokur, Chen, et al. 2003; Tsumagari et al. 2011; Cheli et al. 2011; Dmitriev et al. 2013; Portilho et al. 2015). Dans cette première partie du projet, l'équipe a cherché à tester la faisabilité de la correction *in vitro* de ces défauts phénotypiques et transcriptomiques en co-cultivant dans plusieurs proportions différentes des myoblastes normaux avec des myoblastes FSHD, en induisant la différenciation myogénique par carence en sérum et en caractérisant les myotubes hybrides ainsi obtenus.

L'immunomarquage de la Troponine-T à 4 jours post-différenciation a révélé, d'un point de vue phénotypique, une relation directe entre la proportion de cellules normales initialement ensemencées et le nombre de myotubes hybrides à phénotype normal obtenu. La co-culture comprenant au moins 50% de myoblastes normaux a permis d'obtenir des myotubes hybrides dont la plupart manifestait un phénotype normal.

De plus, une analyse transcriptomique a été effectuée sur les myotubes normaux, les myotubes FSHD et les myotubes hybrides à l'aide de puces 44K+ d'*Agilent Technologies*. En comparant le profil transcriptomique des myotubes FSHD à celui des myotubes normaux, 65 gènes impliqués dans la contraction musculaire, la prolifération et la différenciation cellulaire, l'organisation du cytosquelette et dans l'inflammation ont été trouvés dérégulés dans la FSHD et sont impliqués dans

notamment 39 voies de signalisation identifiées comme dérégulées dans la FSHD, notamment les voies impliquées dans le développement du muscle squelettique, la régulation du cytosquelette, la migration transendothéliale des leucocytes et la voie de signalisation de VEGF. L'expression de ces gènes était corrigée dans les myotubes hybrides proportionnellement à la quantité de myoblastes normaux initialement ensemencés avec les myoblastes des patients, et une seule voie de signalisation, celle de la migration transendothéliale des leucocytes, demeurait dérégulée dans les myotubes hybrides issus de la co-culture comprenant 60% de myoblastes normaux.

Ces résultats préliminaires démontrent en effet la possibilité de corriger *in vitro* et aux niveaux phénotypique et transcriptomique les défauts présents dans les myotubes FSHD en incorporant au moins 50% de myoblastes normaux dans les cultures cellulaires. (Dib et al. 2015)

Comme une thérapie cellulaire n'est pas encore techniquement possible dans le cadre de la FSHD, les perspectives directes de ce travail sont d'étudier la fonctionnalité des myotubes hybrides obtenus *in vitro*, de vérifier leur niveau de dommages de l'ADN et leur sensibilité/résistance au stress oxydant afin de mieux les caractériser. Ces données seront ainsi utiles une fois qu'un protocole de thérapie cellulaire sera établi pour la FSHD.

Dans ce travail, j'ai participé à la mise au point des protocoles de fusion des myoblastes normaux et FSHD co-cultivés et de visualisation du signal fluorescent au microscope à épifluorescence. J'ai aussi participé dans les analyses des résultats d'expression génique obtenus par la qRT-PCR.

3.2 TALENs et CRISPR/Cas9 ciblant la région 4qA161 : conception et validation de ces outils

Dans le cadre de la première stratégie d'édition génomique visant à insérer le variant non-pathogénique 4qA166 au niveau de 4q35 afin qu'il remplace fonctionnellement 4qA161, il est nécessite nécessaire en premier temps de concevoir les TALENs et les CRISPR/Cas9 reconnaissant une séquence à proximité de 4qA161 **(Figure 18)** et valider leur capacité de cibler et de couper spécifiquement la séquence cible.

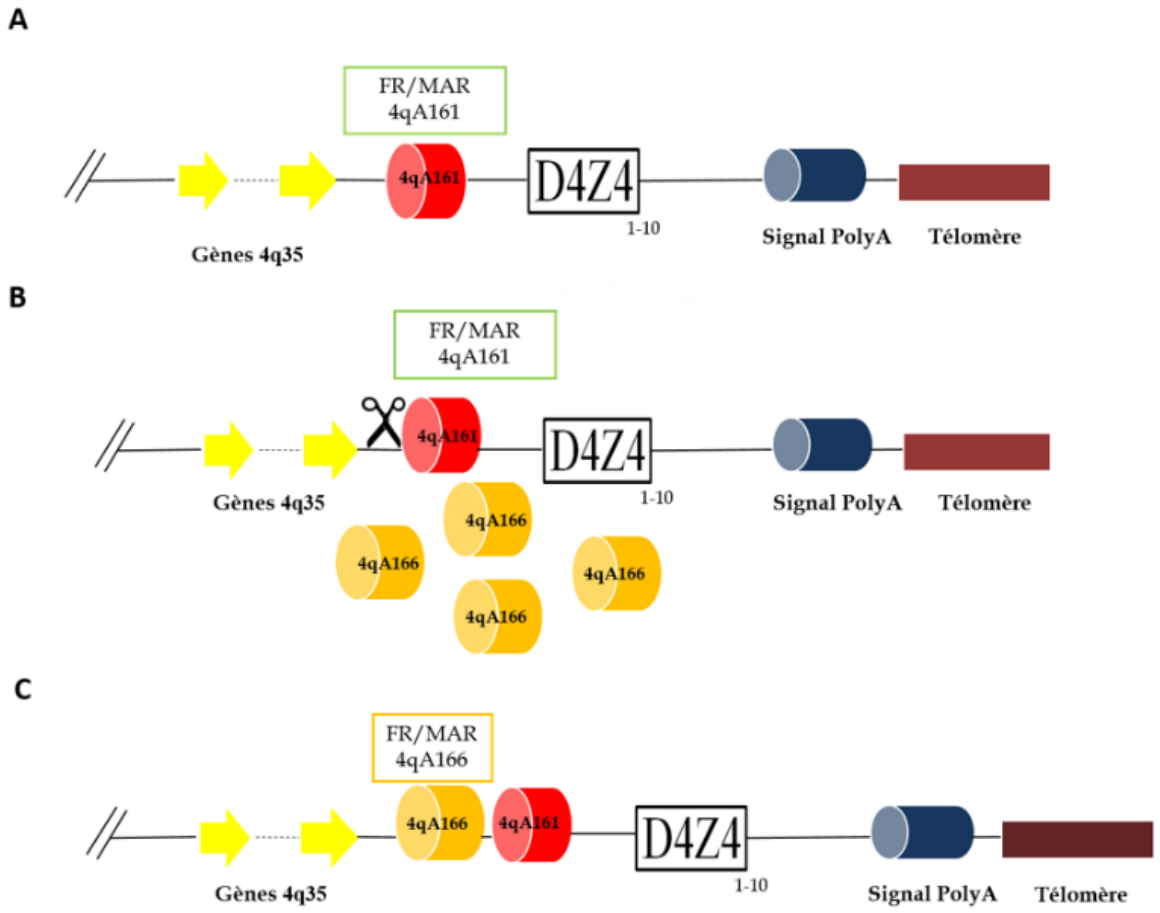


Figure 18. Représentation schématique de la stratégie de correction génomique visant le variant pathogénique 4qA161 à l'aide du système CRISPR/Cas9 et d'un couple de TALENs. Le couple de TALENs (TAL4) et le CRISPR/Cas9 (18g1) sont conçus pour reconnaitre un site cible à proximité de 4qA161 et d'induire une cassure double brin spécifique qui, en présence de la matrice d'ADN comprenant le variant non pathogénique 4qA166, est réparée par la recombinaison homologue en incorporant la séquence 4qA166 au niveau du site de coupure.

La conception des outils d'ingénierie génétique, TALENs (TAL4) et CRISPR/Cas9 (18g1) est détaillée dans la section Matériels et méthodes. Dans cette partie des résultats, nous exposons la validation de l'activité de ces outils développés pour cette première stratégie. Cette étape de validation de leur activité est cruciale afin de pouvoir par la suite effectuer les études cellulaires et fonctionnelles.

Plusieurs méthodes permettant la détection des coupures de l'ADN par les TALENs et les CRISPR/Cas9 ont été décrites dans la littérature. Ces techniques se basent sur la mise en évidence de la présence de mésappariements de bases dans la séquence cible, introduits par le mécanisme de réparation de l'ADN par jonction d'extrémités non homologues (NHEJ). En effet, en absence d'une matrice d'homologie, la réparation des DSBs se fait par la voie de NHEJ, mécanisme non-conservatif qui joint les extrémités des chromosomes, induisant souvent des mutations de type insertion/délétion (indels) (Lieber 2010). Le séquençage de l'ADN demeure la méthode la plus fiable pour identifier ces mutations, mais nécessite un tri cellulaire à partir de la culture initiale de cellules transfectées et l'établissement de clones cellulaires. Cette procédure est longue et n'est pas faisable pour tout type cellulaire notamment pour les cellules primaires. D'autres techniques permettant une détection plus rapide des mésappariements de bases ont été employées (Hayashi & Yandell 1993; Inazuka et al. 1997; Underhill et al. 1997; Yu et al. 2006), mais l'analyse restreinte aux fragments d'ADN de moins de 1000bp et la difficulté de localiser la mutation au sein de la séquence, constituaient leurs limitations majeures. Par la suite ont émergé deux techniques similaires, le test de la digestion par la T7 endonucléase I et le test de Surveyor (Qiu et al. 2004), maintenant couramment utilisées du fait qu'elles détectent l'emplacement des mutations et permettent le calcul de la fréquence des mutations. Ces deux tests comprennent quatre étapes successives : une PCR génomique pour amplifier la séquence d'ADN de part et d'autre du site de coupure, une dénaturation et une renaturation lente des amplicons pour former les hétéroduplexes d'ADN, leur traitement par la T7 endonucléase I ou la nucléase Surveyor qui coupent au niveau des mésappariements de bases, et finalement l'analyse des produits de la digestion suite à leur migration par électrophorèse dans un gel d'agarose. Un séquençage des produits de PCR vient enfin confirmer si la mutation a été introduite au niveau du site de clivage prédictif. Techniquement, ces 2 tests sont assez longs, les protocoles varient considérablement entre les laboratoires et des problèmes de reproductibilité sont souvent rencontrés.

A partir de là, nous proposons dans cette partie une méthode alternative pour la détection de l'efficacité de nos outils d'édition génomique : **une PCR pour la détection des translocations déclenchées par les nucléases artificielles.** En effet, cette méthode est basée sur le fait que deux DSBs induits sur deux chromosomes différents au même moment peuvent générer des translocations chromosomiques (Richardson & Jasin 2000; Mani & Chinnaiyan 2010). La méthode que nous proposons est rapide, sensible, reproductible, peu coûteuse, requiert peu de matériel biologique et est adaptée aux cellules difficilement transfectables (**Germini*, Bou Saada* et al., en préparation**).

3.2.1 La détection par PCR génomique de la translocation t(8 ;14) reproduite à l'aide de deux nucléases artificielles

Dans un premier temps, nous avons évalué l'adaptabilité de cette méthode à nos outils d'édition génomique en essayant de reproduire la translocation t(8 ;14), translocation fréquemment trouvée dans le lymphome de Burkitt (Boxer & Dang 2001; Hecht & Aster 2000) et accompagnée d'une surexpression du gène *MYC*. Cela a été réalisé à l'aide de deux couples de TALENs ciblant les gènes *MYC* (TAL8F et TAL8R) et *IGH* (TAL14F et TAL14R). En co-transfectant des cellules HeLa avec ces deux couples de TALENs, et à l'aide de l'amorce sens de *MYC* et l'amorce anti-sens de *IGH*, nous avons pu amplifier par PCR génomique une séquence génomique unique non détectable dans les cellules non transfectées **(Figure 19 A, B)**. L'amplicon obtenu, extrait du gel d'agarose et purifié, a été ensuite séquencé et aligné avec les séquences génomiques spécifiques à *MYC* et *IGH* (NG_007161.1 et NG_001019.5) ; les extrémités 5' et 3' de l'amplicon s'alignaient parfaitement avec l'extrémité 5' de *MYC* et l'extrémité 3' de *IGH* respectivement, mais des mutations apparaissaient au niveau du site de coupure des TALENs, comme prévu **(Figure 19 C, D)**. Ce résultat confirme donc la formation d'une translocation entre ces deux gènes, liée spécifiquement aux DSBs induites par TAL8 et TAL14. Concomitamment à cela, nous avons pu reproduire la translocation t(8 ;14) en effectuant la même co-transfection sur des fibroblastes immortalisés (MRC5-SV2) **(Figure 19 E)**. Ceci démontre que la spécificité de la méthode proposée et la reproductibilité des résultats sont indépendantes du type cellulaire.

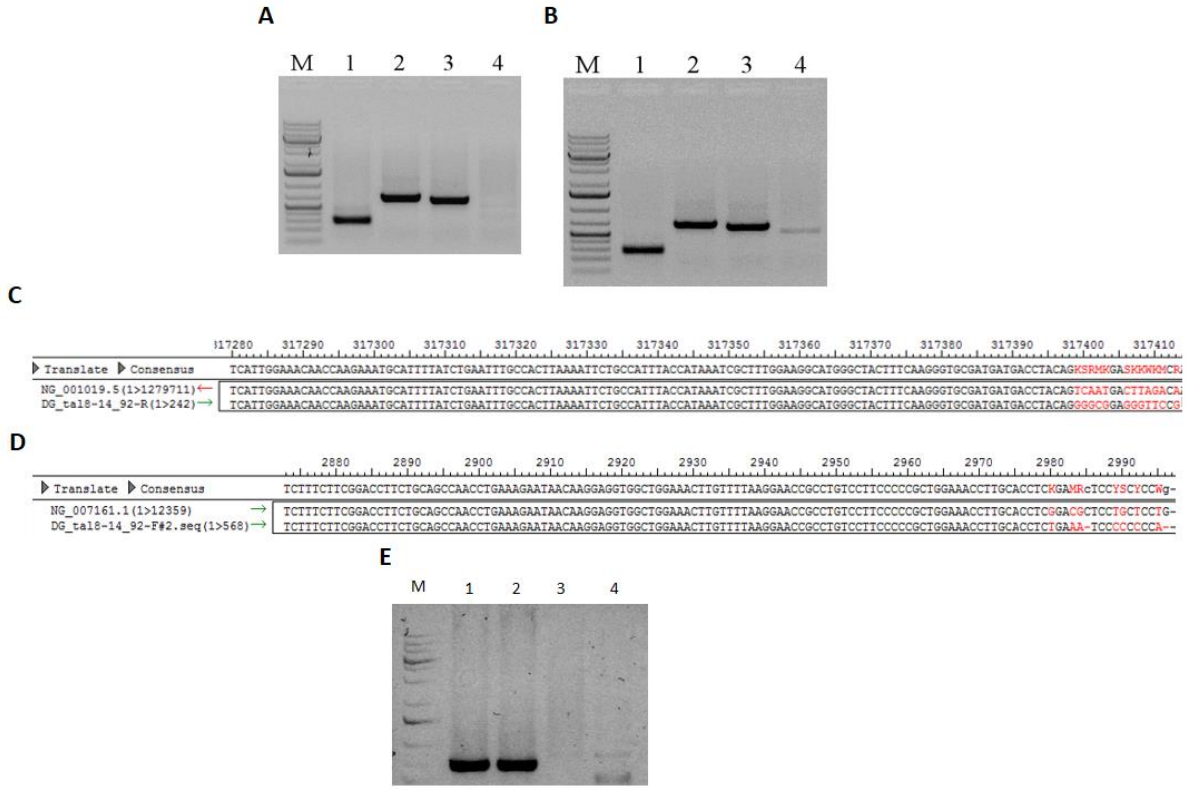


Figure 19. **Mise en évidence de l'efficacité de la technique d'amplification par PCR génomique de la translocation induite par TAL8 et TAL14.** La PCR génomique effectuée sur l'ADN génomique des cellules HeLa **(A)** non transfectées et **(B)** transfectées par les couples de TALENs Tal8 (MYC) et Tal14 (IGH) révèle une amplification spécifique relevant d'une translocation, à l'aide des amorces croisées MYC F et IGH R (amorce sens de *MYC* et amorce anti sens de IGH) observable uniquement dans les cellules transfectées. **Puits1** : GAPDH Forward (F) + Reverse (R). **Puits 2** : MYC F+R. **Puits 3** : IGH F + R. **Puits 4** : MYC F + IGH R. **M** : marqueur de poids moléculaire. L'alignement de la séquence «sauvage » de **(C)** *IGH* (NG_001019.5) et la séquence « sauvage » de **(D)** *MYC* (NG_007161.1) avec celle de l'amplicon obtenu par amplification génomique à l'aide des amorces croisées MYC F + IGH R, à partir de l'ADN génomique des HeLa transfectées. Les mésappariements de base sont marqués en rouge. **(E)** La PCR génomique sur l'ADN extrait des cellules MRC5-SV40 non transfectées (puits 3) et transfectées par les deux couples de TALENs, reconnaissant *MYC* et *IGH* (puits 1, 2 et 4), a permis l'amplification spécifique, à l'aide des amorces croisées MYC F + IGH R, d'une amplicon correspondant à une translocation uniquement dans les MRC5-SV40 transefctées. **Puits1** : ADN de MRC5-SV40 transfectées, amplification avec MYC F + MYC R. **Puits 2** : ADN de MRC5-SV40 transfectées, amplification avec IGH F + IGH R. **Puits 3** : ADN de MRC5-SV40 non transfectées, amplification avec MYC F + IGH R.. **Puits 4** : ADN de MRC5-SV40 transfectées, amplification avec MYC F + IGH R. **M** : marqueur de poids moléculaire.

3.2.2 La vérification de la capacité de coupure des TALENs et CRISPR/Cas9 ciblant 4q35

Dans un second temps, nous avons vérifié la fiabilité de cette technique en combinant les TAL8 avec le couple de TALENs TAL4 (TAL4-F et TAL-4R) conçu pour cibler la région 4q35 à proximité du polymorphisme 4qA161. De la même façon, une amplification spécifique par PCR génomique à l'aide de l'amorce sens *MYC* et l'amorce anti-sens de 4q35 a été observée, amplification non détectable dans les cellules non transfectées **(Figure 20 A, B)**. Ce résultat met en évidence l'efficacité de ciblage et de coupure des TAL4.

Parallèlement à cela, nous avons testé et validé de la même manière l'efficacité du CRISPR/Cas9 conçu aussi pour cibler la région 4q35 (18g1), et cela en co-transfectant les HeLa avec les plasmides TAL8 et le plasmide 18g1 (la conception et le clonage des vecteurs sont détaillés dans la section Matériels et méthodes) **(Figure 20 C)**.

Ainsi, les outils d'édition génomique dont nous disposons pour les expériences à venir s'avèrent être efficaces.

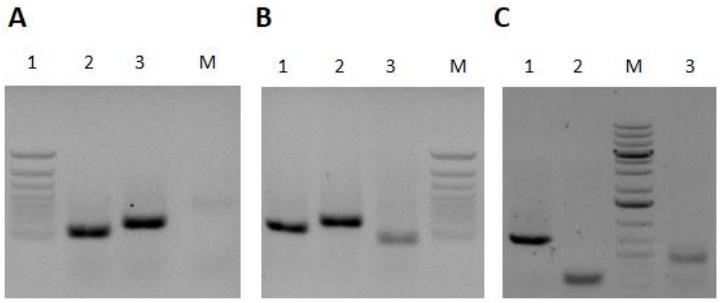


Figure 20. **Mise en évidence de l'efficacité de ciblage et de coupure spécifique en 4q35 de TAL4 et de 18g1.** La PCR génomique effectuée sur l'ADN génomique des cellules HeLa **(A)** non transfectées et **(B)** transfectées par les couples de TALENs TAL8 (MYC) et Tal4 (4q35) révèle une amplification spécifique relevant d'une translocation, à l'aide des amorces croisées MYC F et 4q R (amorce sens de *MYC* et amorce anti sens de 4q35) observable uniquement dans les cellules transfectées. **Puits1** : 4q F+R. **Puits 2** : MYC F+R. **Puits 3** : MYC F + 4q R. **M** : marqueur de poids moléculaire. **(C)** L'efficacité du CRISPR/Cas9 conçu pour cibler une séquence à proximité de 4qA161 (18g1) est évaluée et validée en co-transfectant les cellules HeLa avec 18g1 et TAL8 (MYC). Puits 1 : MYC F+R. **Puits 2** : 4qCRISPR F+R. **Puits 3** : MYC F + 4qCRISPR R. **M** : marqueur de poids moléculaire.

3.2.3 La sensibilité de la technique de détection par PCR génomique des translocations provoquées par les outils de l'édition génomique

Puisque l'efficacité des outils de l'édition du génome peut être faible (Harrison et al. 2014) et dépend de l'efficacité de la transfection et du type cellulaire, nous avons évalué la sensibilité de la méthode que nous proposons en déterminant sa limite de détection des translocations. Pour cela, nous avons entamé des dilutions en série (ratio 1/5) de l'ADN génomique issu des HeLa transfectées par TAL8 et TAL14 et celui des HeLa non transfectées, de 1000 ng à 0.8 ng, et nous avons effectué la PCR génomique à l'aide des amorces croisées (amorce sens de *MYC* et amorce anti sens de *IGH*). Nous avons aussi amplifié *MYC* dans tous les échantillons dilués afin de contrôler l'exactitude des dilutions. Nous avons ensuite calculé le nombre minimal de cellules transfectées requis pour détecter une translocation, en prenant en compte les facteurs suivants : la quantité d'ADN utilisée pour la PCR, la quantité moyenne d'ADN présente dans une cellule HeLa et le pourcentage de cellules transfectées. En se basant sur le fait qu'une cellule de mammifère contient approximativement 6.7 pg d'ADN et que cette quantité est doublée en phase G2 (Serth et al. 2000), nous avons considéré qu'une cellule HeLa contient 10pg d'ADN à peu près. Le calcul du nombre minimal de cellules transfectées est effectué suivant la formule suivante :

(Quantité d'ADN minimale pour détecter une translocation **x** *10pg)* **x** *pourcentage de transfection*

A partir de ces données et des calculs effectués, 2000 cellules transfectées s'avèrent suffisantes pour détecter une translocation par la présente méthode développée **(Figure 21)**.

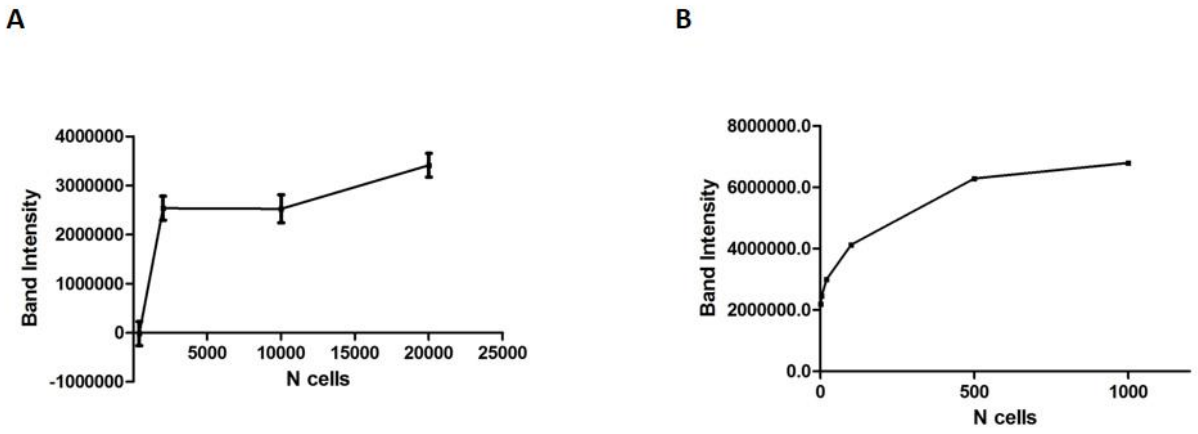


Figure 21. **Les limites de la détection des translocations basée sur la PCR génomique. (A)** Le nombre minimal de cellules transfectées requis pour la détection des translocations par cette technique correspond à 2000 cellules, et est calculé à partir de la mesure de l'intensité du signal des amplicons obtenus par PCR génomique à l'aide des amorces croisées MYC F et IGH R dans des échantillons d'ADN génomiques dilués en série (facteur de dilution 1/5, de 1000 ng à 0.8 ng). **(B)** L'exactitude des dilutions en série de l'ADN génomique des cellules HeLa transfectées par TAL8 et TAL14 est contrôlée à l'aide de la quantification du signal obtenu suite à l'amplification de *MYC* par PCR génomique dans tous les échantillons dilués.

En conclusion, cette méthode de PCR génomique à l'aide d'amorces croisées adéquates permet la visualisation et la quantification des translocations induites par les nucléases ciblant deux loci différents et conçues pour l'édition du génome, et cela dans pas plus de 2000 cellules transfectées et indépendamment de l'efficacité de la transfection et du type cellulaire (**Germini*, Bou Saada* et al., en préparation**).

3.3 La conception d'une protéine de fusion dCas9-CTCF-GFP ciblant 4qA161 comme stratégie de correction « épigénétique » de la FSHD

Dans cette troisième et dernière partie des résultats, nous exposons la deuxième stratégie de correction génomique de la FSHD, variante de la stratégie traditionnelle de CRISPR/Cas9, dans laquelle nous proposons une régulation épigénétique de la transcription de la région 4q35 qui n'inclut aucun changement dans la séquence d'ADN. En effet elle consiste à rapprocher le facteur de transcription CTCF (CCCTC-binding factor) de la région 4q35 ; CTCF est décrit comme impliqué dans plusieurs processus cellulaires notamment dans la régulation transcriptionnelle, dans l'activité insulatrice et dans la régulation de l'architecture chromatinienne (Ong & Corces 2014). En effet CTCF se lie à des séquences d'ADN diverses à fonction insulatrice chromatinienne et est considéré comme étant une composante principale dans l'activité des insulateurs (Phillips & Corces 2009; Xie et al. 2007). CTCF participe à la formation de boucles chromatiniennes et à l'attachement de l'ADN à la matrice nucléaire (Hou et al. 2008; Yusufzai et al. 2004).

L'interférence par le système CRISPR (CRISPRi) a été pour la première fois décrite par Qi *et al.* en 2013, système dans lequel une variante de l'endonucléase Cas9, nommée dCas9 (dead-Cas9) a été générée en mutant son domaine endonucléasique (D10A et H840A) pour donner une protéine Cas9 catalytiquement inactive (Qi et al. 2013). La dCas9 est en effet capable de se rapprocher de l'ADN cible, mais est incapable de le cliver. CRISPRi a été créé afin de réprimer la transcription du gène cible, et cela en étant recrutée au niveau du promoteur ou d'un exon de la séquence cible à l'aide d'un gARN, induisant ainsi un encombrement stérique et le blocage de l'initiation/l'élongation de la transcription.

La dCas9 a été ensuite utilisée dans le système CRISPR/dCas9 pour être fusionnée à des modulateurs transcriptionnels (activateurs ou répresseurs) afin de les recruter au niveau des gènes cibles (Gilbert et al. 2013). Notamment Gilbert *et al*. ont démontré l'efficacité de la répression transcriptionnelle ciblée médiée par la protéine de fusion dCas9-KRAB (Krüppel-associated box, répresseur transcriptionnel) guidée jusqu'aux gènes cibles à l'aide de gARN spécifiques, et cela en provoquant une hétérochromatinisation (Gilbert et al. 2013). Une étude a récemment démontré la répression de *DUX4* par cette protéine de fusion dCas9-KRAB (Himeda et al. 2015), mais la difficulté

de cette approche est la faible expression de *DUX4* qui est restreinte à un nombre limité de noyaux dans les myoblastes FSHD (Snider et al. 2010) et sa limitation majeure est le ciblage unique de *DUX4* dans le cadre de la FSHD.

La stratégie de correction via la régulation de l'activité transcriptionnelle du locus 4q35 que nous proposons dans la FSHD vise à cibler la région insulatrice non-fonctionnelle dans cette myopathie, en guidant la protéine de fusion dCas9-CTCF jusqu'à 4qA161 à l'aide d'un gARN spécifique. CTCF, une fois proche de 4qA161, pourra potentiellement exercer sa fonction de répression transcriptionnelle et d'organisation tridimensionnelle de la chromatine en 4q35 **(Figure 22)**.

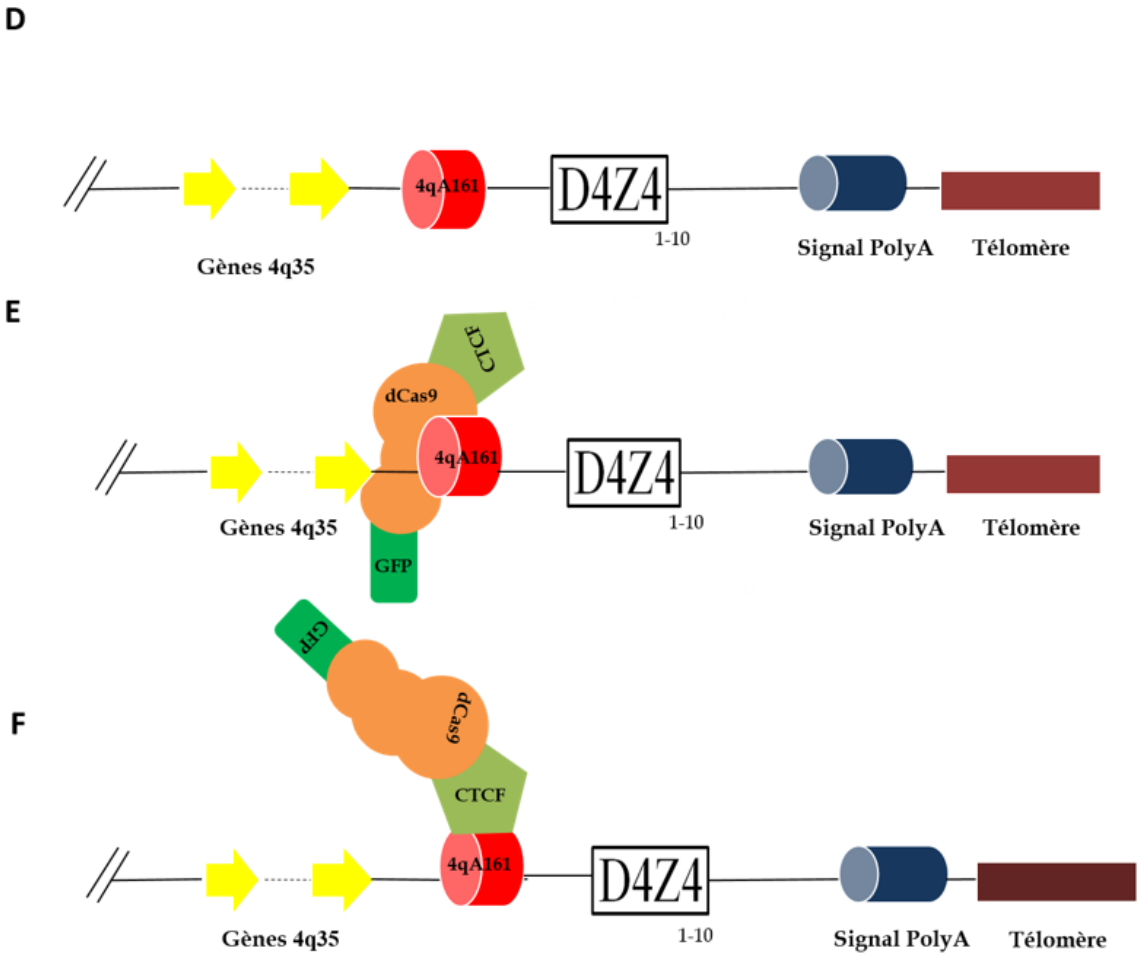


Figure 22. Représentation schématique de la stratégie de correction génomique visant le variant pathogénique 4qA161 à l'aide de la protéine de fusion CTCF-dCas9-GFP. L'approche alternative se basant sur le variant CRISPR/dCas9 consiste à diriger la protéine de fusion CTCF-dCas9-GFP à l'aide d'un ARN guide vers 4qA161 pour rapprocher physiquement le répresseur transcriptionnel CTCF de l'insulateur afin de rétablir sa fonction d'insulation et la conformation chromatinnienne normale de la région 4q35.

En effet et comme précédemment décrit, l'activité transcriptionnelle du locus 4q35 est régulée par deux « enhancers » transcriptionnels (Petrov et al. 2008; Dmitriev, Petrov, Ansseau, Stankevicins, et al. 2011; Himeda et al. 2014) séparés de leurs gènes cibles par l'insulateur 4qA161 (Petrov et al. 2006; Petrov et al. 2008; Kisseljova et al. 2014) non fonctionnel dans la FSHD. Rétablir une insulation et un profil transcriptionnel corrects de la région 4q35 (*DUX4* et les autres gènes à proximité) sans pour autant modifier la séquence d'ADN serait probablement l'approche idéale dans le cadre de la FSHD.

Pour ce faire, nous avons optimisé la séquence de CTCF dérivant du variant 2 du transcrit d'ARNm humain, et nous l'avons cloné en amont de la séquence de dCas9-GFP et en aval du promoteur dans le vecteur plasmidique pSLQ1658-dCas9-EGFP (l'optimisation de la séquence de CTCF et le clonage sont détaillés dans la section Matériels et méthodes) **(Figure 23)**.

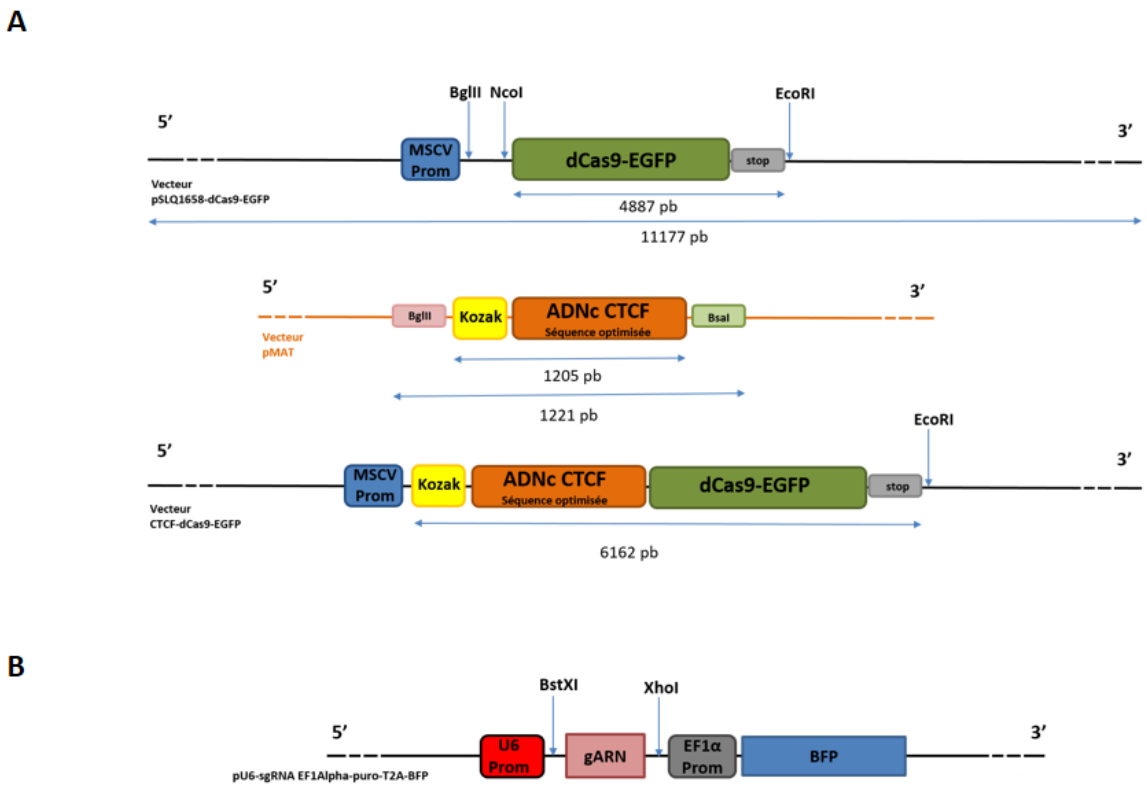


Figure 23. Conception des vecteurs plasmidiques relatifs à la stratégie de correction génomique à l'aide de la protéine de fusion CTCF-dCas9-GFP (A) la conception du vecteur comprenant la protéine de fusion CTCF-dCas9-GFP et (B) le vecteur comprenant la séquence du gARN relatif aux expériences avec CTCF-dCas9-GFP.

Nous avons par la suite séquencé la séquence chimérique CTCF-dCas9-GFP à l'aide de plusieurs amorces sens et anti-sens couvrant la totalité de la séquence. L'alignement de la séquence chimérique avec la séquence théorique optimisée de CTCF et de dCas9-GFP a confirmé la réussite du clonage et l'absence de mutations fortuites. L'analyse *in silico* du produit de la traduction de l'ARNm de CTCF-dCas9-GFP a confirmé la conformité du cadre de lecture ouvert (ORF) de cette protéine et l'absence d'apparition de codon stop prématuré.

La séquence du gARN ciblant la région 4qA161 et préalablement testé (séquence du 18g1, voir en détail les résultats détaillés dans **3.2.2**) a été ensuite clonée dans le vecteur plasmidique pU6-sgRNA EF1Alpha-puro-T2A-BFP en tenant compte des sites de restriction à rajouter à la séquence du gARN (le clonage est détaillé dans la section Matériels et méthodes).

Discussion

La FSHD est une myopathie à transmission autosomique dominante faisant partie des myopathies les plus fréquentes (Deenen et al. 2014). Les découvertes progressives de la génétique et de l'épigénétique associées à la FSHD ont complexifié le schéma habituel « un gène, une maladie ». Proposer un modèle animal représentatif de la FSHD et une stratégie thérapeutique adéquate étant jusqu'à maintenant impossibles, décortiquer les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents ainsi que leurs liens avec la pathophysiologie de la FSHD furent donc la priorité des chercheurs. Malgré les nombreuses avancées sur la FSHD, il existe encore des écarts entre les mécanismes moléculaires décrits comme associés à la pathogenèse de la FSHD et la pathologie musculaire observée.

1 Le stress oxydant et les dommages de l'ADN : composantes intrinsèques à la FSHD liées à l'expression aberrante de *DUX4* et impliquées dans la pathophysiologie de cette myopathie

Bien que la FSHD soit une maladie multifactorielle, beaucoup d'importance est accordée à *DUX4* du fait de sa présence au sein de D4Z4 (Hewitt et al. 1994; Gabriels et al. 1999), de son expression aberrante dans la FSHD (Kowaljow et al. 2007; M Dixit et al. 2007; R. J. Lemmers et al. 2010; Snider et al. 2010) et de ses différents effets pathologiques décrits expérimentalement sur des cultures cellulaires et des modèles animaux (M Dixit et al. 2007; Kowaljow et al. 2007; Wallace et al. 2011; Geng et al. 2012). Ce facteur de transcription affecte les cellules musculaires *in vitro* à plusieurs niveaux, notamment en les rendant hypersensibles au stress oxydant (Bosnakovski, Xu, et al. 2008), en dérégulant le programme de la différenciation myogénique (Bosnakovski, Xu, et al. 2008) et en altérant la morphologie des myotubes (Vanderplanck et al. 2011). D'une façon intéressante, ces caractéristiques sont aussi retrouvées dans les myoblastes primaires en culture, issus de patients FSHD (Winokur, Chen, et al. 2003; Winokur, Barrett, et al. 2003; Barro et al. 2010; Bou Saada et al. 2016; Dib et al. 2015). Le stress oxydant et les dommages de l'ADN peuvent affecter la différenciation myogénique et, d'une façon générale, la morphologie et la fonction du muscle squelettique (Powers et al. 2005; Tidball 2005; Powers et al. 2007; Reid 2008; Puri et al. 2002), d'où l'intérêt que nous avons porté à l'étude du stress oxydant, des dommages de l'ADN comme produit majeur du stress oxydant,

et du lien entre le stress oxydant et la différenciation myogénique *in vitro* des myoblastes FSHD. Concomitamment à cela, nous nous sommes intéressés à l'implication de *DUX4* dans ces évènements pathologiques.

L'ensemble de nos résultats démontrent que la présence à l'état basal d'une quantité plus importante de ROS dans les myoblastes FSHD en culture affecte continuellement l'ADN génomique de ces cellules. Cette observation est d'une part reproduite lorsqu'une expression forcée de *DUX4* est réalisée dans des myoblastes immortalisés humain sains, et d'autre part abolie quand l'expression de *DUX4* est inhibée à l'aide de l'interférence par ARN. Malgré le fait que les myoblastes FSHD semblent être adaptés au stress oxydant et aux dommages oxydatifs de l'ADN chroniques qui n'affectent pas leurs divisions cellulaires, ils exercent cependant leur toxicité sur la différenciation myogénique *in vitro,* et plus précisément sur la morphologie des myotubes FSHD. En effet, le traitement antioxydant des myoblastes FSHD et des iMyo-DUX4 réduit d'une façon efficace le taux de ROS et les dommages oxydatifs de l'ADN, et améliore le phénotype des myotubes FSHD lorsqu'il est maintenu pendant le processus de la différenciation myogénique *in vitro*.

Le seuil de résistance au stress oxydant des cellules musculaires étant plus élevé par rapport à d'autres types cellulaires, cela pourrait expliquer l'adaptabilité des myoblastes FSHD aux dommages de l'ADN constitutivement présents et par conséquent leur capacité à poursuivre leur cycle cellulaire et leurs divisions. Cependant le seuil de tolérance pourrait être atteint plus rapidement par les myoblastes FSHD. L'hypersensibilité au stress oxydant, attribuée aux myoblastes FSHD, peut être causée majoritairement par une déficience dans la réparation de l'ADN ou par une saturation de la réparation et une accumulation irréversible des dommages de l'ADN. La deuxième partie de nos résultats traitant ce sujet démontre qu'en réponse à un stress oxydant exogène modéré et ponctuel, les myoblastes FSHD sont capables de réparer rapidement les dommages de l'ADN supplémentaires induits par l'agent oxydant, probablement parce que les mécanismes de réparation de l'ADN sont actifs à l'état basal dans ces cellules. De la même façon, les myoblastes normaux, sensibilisés au stress oxydant par un traitement continu à une faible dose de H_2O_2 présentant ainsi à l'état basal des dommages de l'ADN, sur-expriment aussi certains gènes de réparation de l'ADN et sont capables de résister à une exposition modérée et ponctuelle à l'agent oxydant. Ainsi, l'adaptabilité des myoblastes

FSHD aux dommages oxydatifs de l'ADN constitutifs est accompagnée d'une activation à l'état basal des mécanismes de réparation de l'ADN et sensibilise ainsi les myoblastes FSHD au stress oxydant. Cela confère aux myoblastes FSHD une résistance aux dommages de l'ADN supplémentaires pouvant provenir d'un stress oxydant ponctuel et modéré. Cependant, une exposition prolongée à de fortes concentrations de l'agent oxydant est suivie d'une accumulation additive de dommages à l'ADN dépassant d'une façon précoce, dans les myoblastes FSHD, le seuil de tolérance des lésions de l'ADN à des concentrations moins importantes par rapport aux myoblastes normaux, compromettant ainsi la viabilité cellulaire des myoblastes FSHD. Cela peut expliquer, au moins en partie, l'hypersensibilité des myoblastes FSHD au stress oxydant.

Enfin, du fait que les dommages de l'ADN et le stress oxydant soient intimement liés et que leurs chronicités sont associées au vieillissement en général, et à la perte de la régénération et de la fonction musculaire en particulier, une question semble être pertinente à poser : ***les dommages de l'ADN et le stress oxydant chroniques dans la FSHD sont-ils des causes potentielles de la sévérité et de la progression de la myopathie ?*** Avec l'âge, l'atteinte musculaire chez les patients FSHD s'étend souvent pour atteindre d'autres muscles squelettiques, et peut devenir plus sévère. Cette progression « temporelle » pourrait être la conséquence de la présence chronique d'un état de stress oxydant et de dommages de l'ADN dans les muscles FSHD, les altérant progressivement. Si le niveau d'endommagement de l'ADN et celui de stress oxydant sont proportionnels au niveau d'expression de *DUX4*, alors le raccourcissement des télomères avec l'âge, accompagné d'une expression plus importante de *DUX4*, pourrait renforcer l'hypothèse de la progression et de la sévérité « temporelles » de l'atteinte musculaire avec l'âge chez les patients FSHD. Dans la maladie de Huntington, maladie neurologique se manifestant généralement chez les personnes âgées et plus rarement de façon précoce chez des personnes jeunes, un lien a été établi entre des haplotypes de *OGG1* (glycosylase impliquée dans la réparation des bases de l'ADN altérées par le stress oxydant) et de *XPC* (gène *Xeroderma pigmentosum* groupe C, impliqué aussi dans la réparation des lésions de l'ADN et dans l'homéostasie redox) avec l'apparition précoce des symptômes (Berger et al. 2013). Cela pourrait être dû au stress oxydant accompagnant ces haplotypes. De la même façon, établir un lien entre l'invalidité musculaire précoce et la surabondance de dommages oxydatifs de l'ADN et des ROS pourrait justifier, au moins

en partie, la survenue d'un « vieillissement musculaire accéléré » chez les jeunes patients FSHD ayant un nombre très limité d'unités D4Z4, et qui sont dans la plupart des cas atteints sévèrement de la FSHD dès leur plus jeune âge.

2 Vers une stratégie thérapeutique ciblée en remaniant le génome et l'épigénome : approches thérapeutiques potentielles

La FSHD résulte de la présence simultanée de trois évènements génétiques sur 4q35 : la réduction du nombre de répétitions D4Z4 (R. J. Lemmers et al. 2010) et la présence simultanée de deux polymorphismes permissifs à la maladie, 4qA (Lemmers et al. 2002) et 4qA161 (Lemmers et al. 2007; Kisseljova et al. 2014). Corriger au moins un des trois évènements pourrait bloquer la maladie. Le site polymorphique 4qA161 comprend un site d'attachement à la matrice nucléaire, FR-MAR, agissant comme un insulateur essentiel au contrôle de l'activité des gènes à proximité (Petrov et al. 2006; Petrov et al. 2008). Ses fonctions de remodelage tridimensionnel de la chromatine et d'insulation sont médiées par la protéine CTCF, répresseur transcriptionnel (Ong & Corces 2014), et sont perdues dans la FSHD (Petrov et al. 2006). Rétablir les fonctions de FR-MAR pourrait rétablir une structure chromatinienne et une expression génique normales en 4q35, pour cela mon travail propose de cibler le polymorphisme 4qA161 par deux approches différentes. La première consiste à remplacer le variant pathogénique par un autre variant non associé à la FSHD et cela à l'aide du système « classique » de CRISPR/Cas9 ou des TALENs, et la deuxième approche consiste à utiliser le variant CRISPR/dCas9 afin de fusionner le répresseur transcriptionnel CTCF à la dCas9 et le ramener ainsi au niveau de l'insulateur FR-MAR pour rétablir sa fonction.

Dans le cadre de la première approche, deux outils d'édition génomique, une paire de TALENs (TAL4) et un vecteur CRISPR/Cas9 (18g1), ont été conçus de façon à cibler spécifiquement le site polymorphique 4qA161. Leur capacité de coupure ont été ensuite individuellement démontrée dans des cellules en culture à l'aide d'une amplification par PCR des translocations chromosomiques potentiellement déclenchées par TAL4 ou 18g1 co-transfecté avec des TALENs coupant sur un

chromosome différent. Cette approche employée au laboratoire s'est avérée sensible, rapide et reproductible.

Dans le cadre de la deuxième approche, nous proposons une régulation épigénétique de la transcription en 4q35. Nous avons tiré profit du variant CRISPR/dCas9 dans lequel la dCas9, catalytiquement inactive (Qi et al. 2013), peut être fusionnée à un modulateur transcriptionnel tel que CTCF et guidée au site cible par l'ARN guide, permettant ainsi le recrutement du répresseur transcriptionnel au niveau de la séquence d'intérêt. Nous avons donc créé une protéine de fusion CTCF-dCas9-GFP ainsi que l'ARN guide correspondant qui permettra son recrutement au niveau de 4qA161. A partir de ces constructions plasmidiques, plusieurs manipulations seront nécessaires afin de valider d'un côté la production et l'interaction de la protéine de fusion avec la séquence 4qA161, et de l'autre côté le rétablissement de la fonction d'insulation de 4qA161 en présence de CTCF. Cette approche thérapeutique est en théorie la moins dangereuse du fait qu'aucune modification de la séquence d'ADN n'est apportée et que le risque de coupure non spécifique potentiellement causée par Cas9 n'est pas présent.

Plus de 25 ans sont passés depuis le développement du modèle murin *mdx* représentant la dystrophie de Duchenne et ce n'est que récemment qu'un potentiel traitement spécifique à la DMD a vu le jour, et nécessitera probablement plusieurs années supplémentaires pour être appliqué chez l'Homme. L'urgence de développer un modèle animal FSHD est toujours présente, mais ne devra pas empêcher la conception de stratégies thérapeutiques *in vitro* et *in vivo*, dans l'espoir de pouvoir les tester rapidement une fois le modèle animal établi.

Conclusions

En conclusion, mon travail de thèse apporte principalement un éclairage nouveau sur les mécanismes moléculaires pathologiques impliqués dans la FSHD, en mettant en évidence une nouvelle caractéristique cellulaire et phénotypique des myoblastes FSHD *in vitro* : un stress oxydant à l'état basal lié à la surexpression de *DUX4* et induisant des dommages de l'ADN. Ces phénomènes omniprésents dans les myoblastes FSHD participent à la pathophysiologie de cette myopathie en affectant la morphologie des myotubes obtenus *in vitro*. Cet effet pathologique est atténué par un traitement antioxydant. L'absence à ce jour d'une thérapie cellulaire ou génique applicable à la FSHD rend difficile le traitement de cette maladie, et le recours à des traitements symptômatiques tels que la supplémentation en antioxydant, en parallèle à un rythme de vie sain et un suivi médical continu, restent le seul moyen pour atténuer les symptômes liés à la FSHD.

Enfin, les outils de l'édition du génome, conçus et développés afin de cibler spécifiquement un des évènements génétiques causal de la FSHD (le variant pathogénique 4qA161 touchant le site FR-MAR), permettront de tester sur les cellules FSHD *in vitro* deux approches distinctes de corrections génomique et épigénomique à visée thérapeutique. En rétablissant la fonction d'insulation de FR-MAR et la conformation chromatinienne de la région 4q35, les cellules FSHD pourraient être possiblement corrigées *in vitro*.

Perspectives

Dans le cadre de l'étude des effets du stress oxydant et des dommages oxydatifs de l'ADN sur la pathophysiologie de la FSHD, la mise en évidence de la présence à l'état basal d'un stress oxydant lié à la surexpression de *DUX4* provoquant des dommages de l'ADN, a permis de dévoiler une nouvelle caractéristique cellulaire des myoblastes FSHD *in vitro* qui s'avère affecter la morphologie des myotubes FSHD en culture. Ces phénomènes cellulaire et phénotypique sont efficacement atténués par un traitement antioxydant. Ces avancements donnent alors espoir aux études concentrées sur les traitements antioxydants ou anti-inflammatoires dans la potentielle atténuation de l'atteinte musculaire liée à la FSHD. Néanmoins, à partir de ces découvertes découlent plusieurs questions qui restent à être élucidées et constituent la première partie des perspectives de ce travail.

Les mécanismes moléculaires induits par DUX4 et menant à une surproduction de ROS ne sont pas encore élucidés, il serait donc intéressant de déterminer comment DUX4 rompt l'homéostasie cellulaire redox.

Afin de compléter ce schéma, il serait intéressant de définir la source principale des ROS dans les myoblastes FSHD et dans les iMyo-DUX4 (ROS mitochondriaux, cytoplasmiques, etc.) et de tester des antioxydants ciblant des compartiments cellulaires spécifiques produisant des ROS. Cibler le site producteur de ROS dans la FSHD aiderait dans le choix du meilleur antioxydant qui donnerait des résultats plus prometteurs.

Traiter les myoblastes en prolifération à un antioxydant et maintenir le traitement pendant la différenciation myogénique *in vitro*, comme ce qui a été effectué lors de ce travail, correspondrait physiologiquement à un traitement continu des cellules satellites FSHD. Ainsi rétablir l'homéostasie redox des cellules satellites pourrait favoriser une régénération et une morphologie musculaires saines nécessaires à la fonction du muscle squelettique. En outre, l'étude *in vitro* de la fonction anabolique et catabolique (synthèse protéique plus élevée (augmentation du ratio p-AKT/AKT), diminution de la production de myostatine qui est un inhibiteur de la croissance musculaire, et d'atrogine-1, ubiquitine E3 ligase) (Pomi??s et al. 2015) ainsi que la force contractile (Griffin et al. 2004; Guo et al. 2014) des myotubes FSHD issus des myoblastes traités à un antioxydant pourrait confirmer leur fonctionnalité concomitante à leur correction morphologique.

D’autre part, traiter les myotubes FSHD à un antioxydant seulement après la différenciation myogénique et regarder leur phénotype ainsi que leurs caractéristiques fonctionnelles pourraient nous indiquer si le phénotype des myotubes FSHD pourrait être inversé et leur fonction améliorée.

Il a été démontré que les dommages de l’ADN dus au stress oxydant contribuent à la dégénérescence des fibres musculaires et au vieillissement musculaire (Short et al. 2005; Puri et al. 2002; Powers et al. 2005; Powers et al. 2007). Dans ce cadre précis, il serait intéressant de tester *in vivo* le niveau de dommages de l’ADN seuil, au-delà duquel la forme et la fonction du muscle squelettique se trouvent altérées.

Dans le cadre de l’étude de la réponse des myoblastes FSHD au stress oxydant, il serait important d’explorer la fonctionnalité de chaque mécanisme de réparation de l’ADN, car la possibilité qu’une voie soit défectueuse et compensée par une autre voie de réparation de l’ADN ne peut être écartée. Cibler séparément chaque mécanisme de réparation de l’ADN en exposant les myoblastes FSHD à différents agents génotoxiques et évaluer la réparation des lésions génomiques spécifiques donneront une réponse plus claire à cette question.

De plus, effectuer les mêmes analyses de réponse au stress oxydant modéré ou accru, ponctuel ou prolongé, sur les myotubes FSHD issus de la différenciation myogénique *in vitro* reflèterait la réaction physiologique des fibres musculaires face à un stress oxydant exogène provenant de l’environnement du muscle squelettique.

Dans le cadre des approches de correction génomique à visée thérapeutique et adaptées à la FSHD, plusieurs démarches expérimentales sont nécessaires afin d’obtenir des cellules FSHD « corrigées ».

Suite à la validation de l’efficacité des TAL4 et 18g1 et dans le but d’insérer le variant 4qA166 non-pathogénique en 4q35 dans les cellules FSHD, l’étape suivante consiste à concevoir une séquence d’ADN double brin servant de matrice à la recombinaison homologue. Cette dernière sera en effet déclenchée suite à la DSB provoquée par TAL4/18g1 afin de la réparer. La matrice devra comprendre, en plus de la séquence 4qA166, un gène de fluorescence (gène rapporteur) et deux bras d’homologie les entourant, complémentaires aux séquences d’ADN génomique de part et d’autre du site d’intégration et chacun étant de 700 à 1000 nucléotides. Une fois conçue, la matrice sera introduite

dans les cellules FSHD en même temps que la TAL4/18g1. Les cellules fluorescentes seront ensuite sélectionnées par cytométrie en flux et mises en puits (une cellule/puits) afin de générer des clones cellulaires. Les clones ayant gardé avec le temps la fluorescence sont en théorie ceux qui ont réussi à intégrer la matrice d'ADN dans le génome. Un séquençage de la région 4q35 de chaque clone cellulaire permettra de confirmer l'incorporation de la matrice au niveau du site d'intégration cible. Une PCR génomique à l'aide d'amorces spécifiques de la matrice d'ADN intégrée sera aussi nécessaire afin de vérifier qu'elle s'est intégrée à un endroit unique, à savoir dans 4q35.

Dans le but de valider l'activité de CTCF-dCas9-GFP et le rétablissement de la fonction insulatrice de 4qA161, le plasmide cloné sera en premier temps transfecté dans des lignées cellulaires humaines afin de valider par Western Blot la production de la protéine de fusion. Ensuite, il sera co-transfecté avec le gARN le guidant vers 4qA161, et l'interaction spécifique de CTCF avec le site d'insulation sera vérifiée par une immunoprécipitation de la chromatine (ChIP). Dans un second temps, l'activité de CTCF sera testée dans une lignée cellulaire CTCF(-), HAP1, en y introduisant simultanément CTCF-dCas9-GFP, le vecteur gARN ainsi qu'une construction contenant l' « enhancer » en D4Z4 et un gène rapporteur, séparés entre eux par l'insulateur à activité réduite, 4qA161 (Petrov et al. 2008). En présence de CTCF-dCas9-GFP, l'insulateur doit exercer son activité d'insulation empêchant ainsi l' « enhancer » contenu dans la constuction d'activer le gène rapporteur, tandis qu'en absence de CTCF il doit être inactif dans les cellules et le gène rapporteur s'exprimera ainsi.

Une fois les corrections génomiques effectuées à l'aide des deux approches thérapeutiques proposées, des analyses communes sur l'ensemble des anomalies *in vitro* décrites comme associées à la FSHD devraient être réalisées dans le but ultime de vérifier la fonctionnalité des cellules FSHD « corrigées ». Cela nécessitera des analyses transcriptomique, protéomique et fonctionnelles (tels que la morphologie des myotubes obtenus, le niveau basal de dommages de l'ADN et la sensibilité au stress oxydant) des clones cellulaires corrigés. Il serait aussi intéressant de tester si la correction génétique simultanée du nombre de répétitions D4Z4 en introduisant, suivant le même schéma décrit, des unités D4Z4 supplémentaires donnerait des résultats plus prometteurs.

Enfin les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des myotubes hybrides issus de la co-culture des myoblastes FSHD avec les myoblastes corrigés sera évaluée afin de déterminer la possibilité de corriger *in vitro* les défauts des cellules FSHD. Ces données seront potentiellement utiles quand un protocole optimisé de thérapie cellulaire autologue adapté à la FSHD verra le jour.

Matériels & Méthodes

1 Lignées cellulaires

1.1 Préparation des flasques de culture / boites de Pétri à collagène

Le collagène est une des protéines les plus abondantes dans le tissu connectif des organes internes des mammifères. La solution de collagène de type I, sous forme d'une fine couche sèche déposée sur la surface des flasques ou des boites de culture, facilite l'attachement des cellules dépendantes d'un système d'ancrage.

La solution stock de collagène extrait à partir de la peau de veau à 0.1% (dans 0.1 M d'acide acétique) est diluée 10 fois dans de l'eau stérile afin d'obtenir une solution à 0.01% de collagène. Le fond des boites de culture est alors couvert de 5 mL (pour les boites de Pétri de 10 cm et les flasques de culture T75 cm^2) ou 2 mL (pour les boites de Pétri de 35 mm) de la solution de collagène dilué. Les boites sont gardées sous la hotte de culture de 2 à 3 heures afin de permettre l'attachement du collagène à la surface. Le surplus de collagène est ensuite collecté et les boites de culture gardées entrouvertes pour permettre le séchage complet de la surface de culture pendant la nuit. Finalement, les boites de culture sont rincées 2 fois avec du PBS 1X avant la mise en culture des cellules.

1.2 Culture des myoblastes primaires en condition de prolifération

Les myoblastes primaires (pMyo) proviennent de biopsies de muscles squelettiques issues de patients FSHD et de personnes saines, et purifiés à l'aide de billes magnétiques CD56/NCAM (*Miltenyi Biotec*) selon le protocole précédemment décrit (Barro et al. 2010).

Afin de les maintenir en prolifération, les myoblastes primaires sont cultivés dans des boites de Pétri à collagène dans le milieu de prolifération constitué de DMEM (*Sigma* #D6546), 20% sérum de vœu fœtal (SVF) (*Millerium* #BWSTS1810/500), 1% sérum UltoserG (*Biosepra* #15950-017) et 50 µg/mL gentamicine (*Sigma* #G1397) à une confluence ne dépassant pas les 50% pour éviter leur différenciation spontanée. Afin d'éviter leur sénescence, les myoblastes primaires sont gardés en culture jusqu'au $10^{ème}$ passage uniquement (**Tableau 3**).

Tableau 3. Caractéristiques des cultures de myoblastes primaires normaux et FSHD

	Patient	Muscle(s)	Sexe	Nombre de D4Z4
Contrôles	Norm-1	Paravertébraux	Féminin	Non déterminé
	Norm-2	Quadriceps	Masculin	Non déterminé
	Norm-3	Quadriceps	Féminin	Non déterminé
	Norm-4	Quadriceps	Masculin	Non déterminé
	Norm-5	Quadriceps	Masculin	Non déterminé
	Norm-6	Quadriceps	Masculin	Non déterminé
	Norm-7	Quadriceps	Féminin	Non déterminé
FSHD	FSHD-A	Quadriceps	Féminin	8
	FSHD-B	Piriforme	Féminin	5/7
	FSHD-C	Quadriceps	Féminin	7
	FSHD-D	Quadriceps	Féminin	7
	FSHD-E	Quadriceps	Féminin	4
	FSHD-F	Trapèze	Masculin	5
	FSHD-G	Infra-épineux	Masculin	Non déterminé
	FSHD-H	Quadriceps	Masculin	5
	FSHD-I	Quadriceps	Masculin	7
	FSHD-J	Quadriceps	Masculin	6

1.3 Culture des myoblastes humains immortalisés (LHCN-M2)

Les myoblastes humains immortalisés (LHCN-M2) provenant d'un sujet sain ont été générés comme décrit précédemment dans la littérature (Zhu et al. 2007) et fourni par le Dr. V. Mouly (Institut de Myologie, Paris). Les LHCN-M2 sont mis en culture à une confluence n'excédant pas les 70% dans le milieu de prolifération constitué de 4 parts de DMEM et d'1 part du milieu 199, et supplémenté en 20% SVF, 100 unités/mL Pénicilline G, 100 µg/mL Streptomycine (*Gibco* #15070-063) et de 2.5 µg/mL de plasmocine.

1.4 Culture de la lignée cellulaire de rhabdomyosarcome TE-671

La lignée cellulaire de rhabdomyosarcome TE-671 (fournie par le Dr. S. Leibowitz, *Institut Gustave Roussy*, France) est cultivée dans un milieu de culture constitué de DMEM, supplémenté avec 10% de SVF, 2 mM de Glutamine, 100 unités/mL de Pénicilline G, 100 µg/mL de Streptomycine et 1 µg/mL d'Amphotéricine B.

1.5 Culture de la lignée cellulaire HeLa

Les cellules HeLa sont cultivées dans un milieu de culture constitué de DMEM, supplémenté avec 10% de SVF, 100 unités/mL de Pénicilline G et 100 µg/mL de Streptomycine.

1.6 Différenciation myogénique des myoblastes primaires en myotubes par déplétion en sérum

Dans le but d'induire la différenciation myogénique, les myoblastes primaires sont mis en culture à 100% de confluence dans des boites de Pétri de 35 mm de diamètre (*Corning* #430165) en présence du milieu de prolifération (5.10^5 cellules / boite de Pétri de 35mm de diamètre, 2 mL de milieu de culture). Après 4 heures de culture et vérification de la bonne adhérence des myoblastes, le milieu de prolifération est retiré et est remplacé par le milieu de différenciation pauvre en sérum (DMEM, 2% SVF, 50 µg/mL gentamicine). Les myoblastes sont alors gardés en culture pendant 6 jours en présence de ce milieu.

1.7 Différenciation myogénique des LHCN-M2 transfectés par DUX4

La veille de la transfection, 5.10^5 cellules de LHCN-M2 sont mises en culture dans 2 mL de milieu de prolifération dans des boites de Pétri de 35 mm à collagène (condition nécessaire pour la différenciation myogénique des LHCN-M2). Le lendemain, les cellules sont transfectées avec le plasmide *DUX4* ou le plasmide *GFP* comme décrit précédemment. La différenciation myogénique est alors induite 4 heures après la transfection par déplétion en sérum (milieu de différenciation constitué de DMEM, supplémenté avec 100 unités/mL de Pénicilline G, 100 µg/mL de Streptomycine, 0.01 mg/mL d'insuline (*Invitrogen* #12585014) et 0.1 mg/mL de transferrine (*Invitrogen* #11107018)). Les LHCN-M2 en différenciation étant très sensibles à la variation du pourcentage de CO_2, les cultures cellulaires sont gardées dans un incubateur fermé constamment pendant au moins les 3 premiers jours de la différenciation myogénique. Les LHCN-M2 sont gardés en culture pendant 7 jours sans changer le milieu de différenciation.

2 Transfections

2.1 Transfections des myoblastes primaires

Les pMyo sont transfectés à l'aide de l'agent transfectant siPORT™ NeoFX™ (*Thermo Fisher* #AM4511) suivant le protocole de transfection inverse précédemment décrit (Vanderplanck et al. 2011). Pour chaque boite de 35 mm à transfecter, 4 µL de siPORT NeoFX sont dilués dans 296 µL d'Opti-MEM. Le mélange est incubé 10 minutes à température ambiante. En parallèle, les siARN sont dilués également dans 300 µL d'Opti-MEM à une concentration finale de 20 nM. Le siPORT NeoFX dilué est ensuite ajouté sur la solution de siARN dilué. Le nouveau mélange est incubé 10 minutes à température ambiante. Les pMyo (MO43 et MO53) sont entretemps comptés et pour chaque transfection dans une boite de 35 mm, 10^5 cellules sont re-suspendues dans 2.4 mL de milieu de prolifération. Les complexes siPORT NeoFX+siARN sont alors dispersés dans la boite de culture, suivis des pMyo en suspension. Les boites de culture sont alors incubées à 37°C, 5% de CO_2 pendant 48 heures. Les siARN utilisés dans cette expérience sont : siDUX4 et siNeg (contrôle négatif) fournis par Dr. Alexandra Belayew, *Université de Mons*, Belgique.

2.2 Transfection des myoblastes humains immortalisés (LHCN-M2)

La veille de la transfection, 2.10^5 cellules de LHCN-M2 sont mises en culture dans 2 mL de milieu de prolifération par puits de plaques de 6 puits. Le lendemain, quelques heures avant la transfection, le milieu de culture est remplacé par 1.7 mL de milieu de prolifération chaud. Pour chaque puits transfectés, 1 µL de l'agent transfectant Lipofectamine 2000 (*Thermo Fisher* #11668027) est dilué dans 149 µL d'Opti-MEM et 2 µg d'ADN plasmidique sont re-suspendus dans un volume final de 150 µL d'Opti-MEM. Le mélange contenant le plasmide est alors ajouté sur le mélange contenant l'agent transfectant et incubé 20 minutes à température ambiante. Les 300 µL de complexes ainsi formés sont finalement ajoutés goutte à goutte sur les LHCN-M2 en culture et les cellules sont récoltées 48 heures post-transfection.

Tableau 4. Liste des plasmides utilisés dans les expériences de transfections

	Gène d'expression	Promoteur	Taille du plasmide (kb)	Gène rapporteur	Fournisseur
pCI-NeoDUX4	Cadre de lecture complet de *DUX4* humain	CMV	8.1	x	Dr. Alexandra Belayew, *Université de Mons*, Belgique
phrGFP-N1	GFP	CMV	4,3	GFP	Stratagen
pCI-Neo	x	CMV	5,4	x	Promega
pSLQ1658-dCas9-EGFP	dCas9-GFP	pMSCV	11,1	GFP	Addgene
pSLQ1658-CTCF-dCas9-EGFP	CTCF-dCas9-GFP	pMSCV	12,3	GFP	Cloné au laboratoire
pU6-sgRNA EF1Alpha-puro-T2A-BFP	gARN cloné	U6	8,2	BFP	*Addgene* #60955
Dirk_U6.stuffer.chimericgRNAbackbone.EFS.Flag.Cas9.P2A.eGFP (s-CRISPR-GFP)	gARN cloné	U6	13,5	eGFP	Fourni par Dr. Mehdi Khaled, *Gustave Roussy*, Villejuif
	Cas9	EFS			
13ACXKXC_Chr8-F_ pcDNA6.2_N-EmGFP-DEST_A341 (TAL8-F-GFP)	RVD de l'ADN, FokI et GFP	CMV	8,9	GFP	Life Technologies
13ACXK3C_Chr8-R_ pcDNA6.2_N-EmGFP-DEST_A341 (TAL8-R-GFP)	RVD de l'ADN, FokI et GFP	CMV	8,9	GFP	Life Technologies
13ACXKPC_Chr14-F_ pcDNA6.2_N-EmGFP-DEST_A341 (TAL14-F-GFP)	RVD de l'ADN, FokI et GFP	CMV	8,9	GFP	Life Technologies
13ACXKTC_Chr14-R_ pcDNA6.2_N-EmGFP-DEST_A341 (TAL14-R-GFP)	RVD de l'ADN, FokI et GFP	CMV	8,9	GFP	Life Technologies
13ACXK7C_Chr4-F_pcDNA6.2_N-EmGFP-DEST_A341 (TAL4-F-GFP)	RVD de l'ADN, FokI et GFP	CMV	8,9	GFP	Life Technologies
13ACXLDC_Chr4-R_ pcDNA6.2_N-EmGFP-DEST_A341 (TAL4-R-GFP)	RVD de l'ADN, FokI et GF	CM	8,9	GFP	Life Technologies
4qCRISPR18g1	gARN cloné	U6	11,7	eGFP	Cloné au laboratoire
	Cas9	EFS			

2.3 Transfection des TE-671 et des HeLa

La veille de la transfection, 5.10^5 cellules sont mises en culture dans 2 mL de milieu de prolifération par puits de plaques de 6 puits. Le lendemain, 1.5 µg d'ADN plasmidique est resuspendu dans un volume final de 100 µL de NaCl à 150 mM. En parallèle, 6 µL de l'agent transfectant JetPEI (*Polyplus* #101-10) est dilué dans un volume final de 100 µL de NaCl à 150 mM. Les deux mélanges sont ensuite ajoutés l'un à l'autre. Les 200 µL contenant les complexes de transfection sont alors ajoutés goutte à goutte sur les cellules en culture. Ces dernières sont collectées 24 heures ou 48 heures post-transfection.

2.4 Transfection des HeLa par les plasmides TALENs et les plasmides CRISPR-Cas9

La veille de la transfection, 2.10^6 cellules HeLa sont mises en culture dans une flasque de culture de 25 cm^2. Les transfections sont effectuées avec 2 couples de TALENs ou bien avec 1 couple de TALENs et le plasmide CRISPR-Cas9 simultanément. Les plasmides utilisés dans ces expériences sont : les plasmides TALEN-GFP conçus pour cibler le gène *CMYC* (TAL-8F-GFP et TAL-8R-GFP), le gène *IGH* (TAL-14F-GFP and TAL-14R-GFP), les TALEN-GFP conçus pour cibler la région 4q35 (TAL-4F-GFP and TAL-4R-GFP) et le plasmide CRISPR-Cas9 construit pour cibler 4q35 (18g1).

Pour chaque transfection, 3 µg de chaque plasmide sont dilués dans du NaCl à 150 mM dans un volume final de 500 µL. En parallèle, 3 µL de JetPEI par 1 µg de plasmide sont dilués dans du NaCl 150 mM dans un volume final de 500 µL. La solution contenant les plasmides et celle contenant l'agent transfectant sont alors mélangées, le mélange est laissé incuber à température ambiante pendant 30 minutes. Le mélange est finalement rajouté sur les cellules en culture dans 5 mL de milieu de culture. Les cellules sont récoltées 72 heures post-transfection dans 5 mL de milieu de culture, le taux de transfection (taux de cellules GFP(+)) est ensuite déterminé par cytométrie en flux au trieur de cellules par fluorescence (FACS) (BD Accuri C6 Cytometer, *BD Biosciences*). Enfin, l'ADN génomique est extrait et purifié à l'aide du kit Nucleospin Tissue kit pour la suite des expériences.

2.5 Transfection des fibroblastes immortalisés MRC5-SV2 par les plasmides TALENs et les plasmides CRISPR-Cas9

La lignée MRC5-SV2 dérive de cellules de fibroblastes pulmonaires de fœtus MRC-5 transformées par infection par le virus SV40 (Huschtscha & Holliday 1983).

7.10^5 cellules de MRC5-SV2 sont mises en culture 24 heures pré-transfection dans une flasque de culture de $25cm^2$, dans 4 mL de milieu de culture RPMI 1640 1X (*Gibco* #52400-025) supplémenté en 10% SVF et 100 unités/mL Pénicilline G, 100 µg/mL Streptomycine. Afin de co-transfecter les plasmides TAL8 et TAL14, 1.3 µg de chaque plasmide sont mélangés avec de l'Opti-MEM dans un volume final de 390 µl. En parallèle 2.6 µl de Lipofectamine 2000 sont dilués dans de l'Opti-MEM dans un volume final de 390 µl. La solution contenant les plasmides et celle contenant l'agent transfectant sont alors mélangées, le mélange est laissé incuber à température ambiante pendant 20 minutes. Le mélange est finalement rajouté sur les cellules en culture dans 4.5 mL de milieu de culture. Les cellules sont récoltées 72 heures post-transfection dans 5 mL de milieu de culture et le taux de transfection (taux de cellules GFP(+)) est ensuite déterminé par cytométrie en flux. Enfin, l'ADN génomique est extrait et purifié à l'aide du kit Nucleospin Tissue kit pour la suite des expériences.

3 Traitements

3.1 Traitement des myoblastes primaires en prolifération ou en différenciation au Tempol ou à la N-acétylcystéine (NAC)

Les myoblastes primaires sont mis en culture en condition de prolifération dans des boites de Pétri de 10 cm à collagène (3.10^5 cellules dans 10 mL de milieu de culture), en supplémentant le milieu de culture de 100 µM de Tempol (*Enzo Life Sciences* #ALX-430-081) ou de 1 mM de NAC (*Sigma* #A7250). Après 48 heures de traitement, les cellules sont collectées et comptées. 5.10^5 cellules sont re-suspendues dans 2 mL de milieu de prolifération avec ou sans antioxydant, et transférées dans des boites de Pétri de 35 mm à collagène. Une fois que les myoblastes ont adhéré à la surface des boites de culture, la différenciation myogénique est induite en remplaçant le milieu de prolifération par

du milieu de différenciation avec ou sans antioxydant. Les myoblastes sont alors gardés en culture pendant 6 jours. Le milieu de différenciation est changé et supplémenté en antioxydant toutes les 72 heures afin d'assurer une concentration constante d'antioxydant, sans affecter le processus de différenciation.

3.2 Traitement au Tempol des myoblastes primaires et des LHCN-M2 transfectés par DUX4 antérieurement à l'évaluation des dommages à l'ADN

Deux jours avant le test des comètes, les myoblastes primaires sont traités au Tempol, en supplémentant le milieu de culture en Tempol à une concentration finale de 100 µM (2 µL à 100 mM dans un volume final de 2 mL de milieu de culture).

Dans le cadre de l'étude des dommages à l'ADN dans les LHCN-M2 transfectés par *DUX4*, les cellules sont traitées au Tempol à 100 µM 3 heures avant la transfection. Le traitement est renouvelé 24 heures après la transfection et le test des comètes est effectué 48 heures post-transfection.

3.3 Traitement des myoblastes primaires/immortalisés au H2O2

Les cellules sont mises en culture dans des plaques de 6 puits à la densité de 2.10^5 cellules/ puits dans 2 mL de milieu de culture. Le traitement au H_2O_2 est effectué 24 heures après la mise en puits des myoblastes primaires, et 24 heures post- transfection dans le cas du traitement des LHCN-M2. Une série de dilutions (1 M, 100 mM and 10 mM) est effectuée le jour du traitement à partir de la solution stock de H_2O_2 (*Sigma-Aldrich* #H1009-100mL) dans de l'eau stérile et la dilution à 10 mM est par la suite diluée directement dans le volume adéquat de milieu de culture afin d'obtenir les concentrations finales de H_2O_2 (25 µM, 50 µM, 100 µM and 500 µM). Suite au traitement au H_2O_2, les cellules sont lavées au PBS 1X et récoltées 15 minutes (traitement court) ou 24 heures (traitement long) post-traitement.

4 Test des comètes en condition alcaline et quantification des dommages à l'ADN

Le test des comètes en condition alcaline est réalisé à l'aide du kit Trevigen CometAssay kit (*Trevigen* #4250050-k) et des lames de 20 puits spécifiques au test des comètes, revêtues d'une fine couche d'agarose à point de fusion normal (20-well CometSlide™, *Trevigen* #4252-500-01), avec quelques modifications apportées suite aux optimisations du protocole.

Les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS 1X et trypsinisées. La viabilité cellulaire est estimée par le test au bleu de Trypan à l'aide du compteur de cellules Vi-Cell (*Beckman-Coulter*) sachant qu'une viabilité de plus que 75% est requise pour éviter les faux positifs. Les cellules sont enfin récoltées et suspendues dans du PBS 1X pour effectuer le test des comètes.

L'agarose à faible point de fusion (LMAgarose©) est tout d'abord fondu par chauffage à 95°C pendant 5 minutes puis sa température est stabilisée à 37°C pendant au moins 20 minutes afin que les cellules ne soient pas endommagées par ce facteur. Les cellules sont alors dispersées et suspendues dans cet agarose (1.10^5 cellules/mL et à un ratio de 1/10 (v/v)). Puis, 50 µL du mélange sont déposés sur chaque puits de la lame (*Trevigen* CometSlideTM). Les lames sont alors placées à +4°C à l'obscurité pour que l'agarose se gélifie tout en encapsulant les cellules. Les lames sont ensuite immergées pendant 1 heure à +4°C dans une solution de lyse pré-refroidie composée de : 2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Trizma Base, 200 mM NaOH, 1% Triton 100X et 10% DMSO. L'étape de dénaturation de l'ADN fait suite à la lyse en incubant les lames dans une solution alcaline de dénaturation (200 mM NaOH, 1mM EDTA pH>13) pendant 1 heure à l'obscurité et à température ambiante. L'électrophorèse est par la suite effectuée en condition alcaline à 21V 300 mA pendant 30 minutes et à +4°C. La solution alcaline d'électrophorèse a la même composition que la solution de dénaturation de l'ADN. Dans ces conditions, les cassures simples brins de l'ADN sont également révélées, contrairement à l'électrophorèse à pH neutre. Les lames sont ensuite immergées 2 fois dans de l'eau distillée dH_2O pendant 5 minutes, puis dans l'éthanol à 70 % pendant 5 minutes pour bien fixer les cellules. Les lames sont alors séchées à 37°C pendant 30 minutes. L'étape de séchage des lames permet d'avoir les comètes dans un seul plan facilitant ainsi leur visualisation. Finalement, 50 µL de SYBR Green diluée 10 000X dans le TE Buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA) sont

déposés sur chaque puits, les lames sont gardées pendant 10 minutes à +4°C à l'obscurité, et enfin l'excès de la solution de SYBR Green est éliminé et les lames sont maintenues à l'obscurité à température ambiante afin de permettre leur séchage complet. Toutes les étapes du test des comètes sont effectuées à l'obscurité afin d'éviter toute source externe de dommages à l'ADN.

Pendant l'étape d'électrophorèse, les fragments d'ADN endommagé migrent vers l'anode donnant l'aspect d'une queue de comète ; par contre l'ADN non endommagé, vu sa taille plus grande, reste dans le noyau, formant ainsi la « tête » de la comète, d'où le nom de la technique « Test des comètes ». Plus les fragments d'ADN sont petits, plus ils migrent rapidement et loin dans l'agarose. La quantité d'ADN qui a migré révèle le degré d'endommagement de l'ADN. La quantité d'ADN présente dans la tête ou dans la queue de la comète est directement proportionnelle à l'intensité du signal fluorescent, donc plus le signal dans la queue des comètes est fort, plus la quantité d'ADN endommagé est importante.

La visualisation des comètes obtenues se fait au microscope à fluorescence (excitation maximale du SYBR Green : 494 nm, émission maximale à 521 nm, grossissement x20). Des images comprenant au moins 100 comètes isolées par condition sont prises et les dommages à l'ADN sont analysés à l'aide du logiciel Tritek CometScore, mesurant ainsi plusieurs paramètres de la comète dont : le pourcentage de l'ADN dans la queue des comètes, la longueur de la queue des comètes mesurée à partir de la pointe de la tête de la comète, et le moment de la queue des comètes (Tail Moment, TM) qui est le produit de la longueur de la queue des comètes par l'intensité de son signal fluorescent.

Dans le but de générer des résultats statistiquement significatifs, des valeurs moyennes issues d'au moins 100 comètes analysées par condition sont calculées.

5 Détection et quantification des sites apuriniques/apyrimidiques (sites AP)

La quantification des sites AP se fait suivant le protocole proposé dans le kit de détection colorimétrique des sites AP « DNA Damage Colorimetric Assay Kit » (*Abcam* #ab65353). L'ADN génomique est extrait à l'aide du kit « Nucleospin Tissue kit » (*Macherey Nagel* #740952.50) et sa concentration est déterminée par spectrophotométrie à l'aide du Nanodrop 2000 (*Thermo Scientific*).

500 ng de l'ADN génomique sont ensuite marqués avec une sonde réagissant avec le groupe aldéhyde (Aldehyde-reactive probe, ARP) et contenant un fragment de biotine. L'ADN marqué à la biotine est alors immobilisé à la surface d'une plaque de 96 puits, puis incubé avec la HRP (horseradish peroxidase) couplée à la streptavidine ; Les complexes streptavidine-biotine sont révélés en rajoutant une solution contenant le substrat de la HRP et en quantifiant la coloration résultante. La densité optique est mesurée à 650 nm. Une courbe standard générée suivant le protocole décrit sur un échantillon contrôle contenant 40 sites AP par 10^5pb a permis d'estimer le nombre de sites AP dans les échantillons à tester.

6 Détection des espèces réactives de l'oxygène (ROS) par marquage au Dihydroéthidium dans les cellules vivantes

Cette expérience a été effectuée sur des pMyo FSHD et normaux, ainsi que sur des LHCN-M2 sur-exprimant pCI-NeoDUX4 ou phrGFP-N1 48 heures post-transfection.

Le milieu de culture est retiré, et les cellules en culture sont incubées sous agitation douce pendant 15 minutes, à température ambiante et à l'obscurité, avec une solution contenant le Dihydroéthidium (DHE) dilué au 1:8000 dans le tampon de dilution 1X correspondant (Millipore, Muse oxidative stress kit #MCH100111) (solution intermédiaire 1/100 suivie d'une dilution finale au 1/80). Les cellules sont ensuite lavées 3 fois au PBS 1X, une goutte de Vectashield contenant du DAPI est alors déposée et étalée à l'aide d'une fine lamelle et la fluorescence rouge du DHE est détectée et quantifiée au microscope à fluorescence (excitation/émission : 520/610 nm). Des images provenant de plusieurs champs adjacents ont été générées à l'aide du logiciel Cartograph. Une quantification du signal fluorescent est réalisée à l'aide du logiciel ImageJ comme précédemment décrit (CTCF, **C**orrected **T**otal **C**ell **F**luorescence).

7 Immunofluorescence

7.1 Immunofluorescence et quantification du signal fluorescent

Les pMyo cultivés dans des boites de culture de 35 mm à collagène sont fixés à l'aide d'une solution de Paraformaldéhyde (*Euromedex* #15710) diluée à 2 % dans du PBS 1X /0.5% BSA pendant 5 minutes, et perméabilisés avec une solution de 0.25 % Triton X-100 (*Sigma-Aldrich* #T8787) pendant 5 minutes. Ensuite, un blocage est effectué pendant 1 heure dans une solution de PBS 1X / 0.5% BSA (*Euromedex* #04-100-812-C), suivi d'une incubation pendant 1 heure avec l'anticorps primaire et de 3 lavages successifs au PBS 1X/ 0.5% BSA. L'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome est ensuite ajouté et gardé pendant 1 heure à l'obscurité. Les cellules fixées sont lavées 3 fois au PBS 1X / 0.5% BSA. Pour le double immunomarquage de DUX4 et γH2AX, les anticorps primaires reconnaissant DUX4 et γH2AX ont été ajoutés simultanément sur les LHCN-M2 transfectés par pCI-NeoDUX4 ou par phrGFP-N1 et fixés comme décrit précédemment.

Le milieu de montage contenant le DAPI, Vectashield avec DAPI (*Vector laboratories* #H-1200) est finalement déposé et étalé à l'aide d'une fine lamelle. Le marquage immunofluorescent est visualisé sur un microscope à fluorescence (Microvision instruments, excitation/émission : 488/519 nm, fluorescence verte, excitation/émission : 518/540 nm, fluorescence rouge).

Des images provenant de plusieurs champs adjacents ont été générées à l'aide du logiciel Cartographe (Microvision).

Dans le cas où une quantification du signal fluorescent est nécessaire, le logiciel ImageJ (NIH) est utilisé pour générer des valeurs quantitatives reflétant l'intensité du signal fluorescent par cellule quantifiée, pour un minimum de 100 cellules analysées par condition. La fluorescence cellulaire totale corrigée nommée CTCF (**C**orrected **T**otal **C**ell **F**luorescence) est calculée pour chaque cellule selon la formule suivante :

CTCF= Integrated_Density - (Area_of_selected_cell X Mean_fluorescence_of_background_readings)

Les anticorps primaires et secondaires utilisés pour les expériences d'immunofluorescence sont cités dans le **tableau 5** ci-dessous :

Tableau 5. Liste et caractéristiques des anticorps primaires et secondaires utilisés dans le cadre des expériences d'immunofluorescence.

	Anticorps primaire	Anticorps secondaire couplé à un fluorochrome
Immunomarquage de γH2AX	Anticorps polyclonal de lapin, anti-phospho Ser139 H2AX (Active Motif #39117), dilution 1:500 dans PBS 1X/ 0.5% BSA, incubation 1 heure	Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG (Life Technologies #A-21441), dilution 1:100, excitation/émission: 488/519 nm, fluorescence verte, incubation 2 heures
Immunomarquage de Troponine-T	Anticorps monoclonal de souris, anti-Troponine T (Sigma # T6277), dilution 1:50 dans PBS 1X/ 0.5% BSA, incubation 1 heure	Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG (Life Technologies #A-21200), dilution 1:100, excitation/émission: 488/519 nm, incubation 1 heure
Immunomarquage double de DUX4 et de γH2AX	Anticorps monoclonal de souris, anti-DUX4 (9A12) (en provenance du Dr. Alexandra Belayew, Université de Mons, Belgique), dilution 1 :50, incubation 1 heure	Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse IgG (Life Technologies #A-21200), dilution 1:100, excitation/émission: 488/519 nm, fluorescence verte, incubation 1 heure
	Anticorps polyclonal de lapin, anti-phospho Ser139 H2AX (Active Motif #39117), dilution 1:500 dans PBS 1X/ 0.5% BSA, incubation 1 heure	Alexa Fluor 514-conjugated anti-rabbit IgG (Life Technologies #A-31558), dilution 1:100, excitation/émission: 518/540 nm, fluorescence rouge

7.2 Analyse et quantification des myotubes à phénotype déformé

Suite à l'immunomarquage de la Troponine T et dans le cas des cultures FSHD donnant des myotubes désorganisés, au moins 100 myotubes à phénotype désorganisé sont comptés par condition et leur pourcentage est calculé. Dans le cas des cultures FSHD donnant des myotubes atrophiques, le diamètre de chaque myotube est mesuré en µm à 3 points différents à l'aide du logiciel ImageJ, et la moyenne des valeurs obtenues est calculée en µm. 100 myotubes au moins sont analysés par condition.

8 Transfert de protéines (Western blot)

Les extraits totaux de protéines sont préparés à partir de culots cellulaires avec le tampon TENT (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH7.5, 0.5% NP-40) supplémenté des cocktails inhibiteurs anti-protéases et anti-phosphatases (*Roche* #04693159001, #04906845001). Les lysats sont

soniqués pendant 15 secondes à une amplitude de 30%, quantifiées, puis supplémentés du tampon Laemmli 5X (10% SDS, 50% glycérol, 300 mM Tris pH 6.8, 25% 2-mercaptoéthanol, 0.05% bleu de bromophénol) et chauffés 10 minutes à 90°C. Les protéines sont chargées et séparées sur un gel de polyacrylamide à 8% dans le tampon de migration (250 mM Tris pH 8.3, 1.92 M glycine, 1% SDS) et transférées sur une membrane de nitrocellulose (*GE Healthcare Life Sciences* #10600016) dans le tampon de transfert (25 mM Tris, 12.9 mM Glycine, 20% méthanol). La membrane est alors incubée dans une solution de rouge ponceau (*Sigma-Aldrich* #7170) quelques minutes puis lavée 3 fois à l'eau distillée. Le blocage est effectué dans 5% de BSA/TBST 1X (10 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.2% Tween 20) ou 5% de BSA/PyTBST 1X (10 mM Tris pH 7.4, 75 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% Tween 20, dans le cas des protéines phosphorylées) pendant 1 heure à température ambiante sur un agitateur. La membrane est ensuite hybridée avec les anticorps primaires dirigés contre les protéines d'intérêt, dilués dans 5% de BSA/TBST 1X (ou 5% de BSA/PyTBST 1X) (**tableau 6**). La membrane est ensuite lavée 3 fois à l'aide de la solution TBST 1X (ou PyTBST 1X), réhybridée avec les anticorps secondaires adéquats conjugués à la HRP et dilués dans 5% de BSA/TBST (ou 5% de BSA/PyTBST 1X), et lavée 3 fois à l'aide de la solution TBST 1X (ou PyTBST 1X). Finalement, le marquage des protéines est révélé par chimiluminescence à l'aide d'une solution de révélation contenant le substrat de la HRP (*Millipore* #WBKLS0500).

Tableau 6. Liste et caractéristiques des anticorps primaires et secondaires utilisés dans les expériences de transfert de protéines (Western Blot).

	Anticorps primaire	**Anticorps secondaire**
γH2AX	Anticorps polyclonal de lapin anti-phospho Ser139 H2AX (Abcam, #ab11174), dilution 1:2000, poids moléculaire: 15 kD	IgG de chèvre anti-lapin HRP (SantaCruz #sc-2030), dilution 1:5000
H2B	Anticorps polyclonal de chèvre anti-H2B (SantaCruz #sc-8650), dilution 1:200, poids moléculaire: 18 kD	IgG de lapin anti-chèvre HRP (SantaCruz #sc-2768), dilution 1:5000
Actine	Anticorps monoclonal de souris, anti-actine (Millipore #mab1501), dilution 1:100, poids moléculaire : 43 kD	IgG de chèvre anti-souris HRP (SantaCruz #sc-2005), dilution 1:2000

9 Western blot pour la détection de la protéine DUX4

Les cellules sont lysées à froid dans du tampon hypertonique (50 mM Tris pH7, 500 mM NaCl, 0.1% NP40, 1 mM DTT, supplémenté du cocktail inhibiteur de protéases). Les protéines sont dosées selon le dosage de Bradford. Le tampon de charge Laemmli 2X (4%SDS, 20% glycérol, 120mM Tris pH 6.8, 10% 2-mercaptoéthanol, 0.02% bleu de bromophénol) est alors ajouté (ratio 1/1, v/v). Les lysats protéiques sont alors chauffés 5 minutes à 95°C. Les protéines sont chargées et séparées sur un gel de polyacrylamide à 10% dans le tampon de migration (250 mM Tris pH 8.3, 1.92 M glycine, 1% SDS) pendant 3-4 heures à 80 V, et transférées sur une membrane de nitrocellulose dans le tampon de transfert (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20% méthanol) pendant 1heur 45 minutes à 260 mA à 4°C. La membrane est alors incubée dans une solution de rouge ponceau quelques minutes puis lavée 3 fois à l'eau distillée. Le blocage est effectué dans 5% de lait/PBS1X pendant 1 heure à température ambiante sur un agitateur. La membrane est ensuite hybridée avec l'anticorps primaire anti-DUX4 (9A12) dilué au 1:1000 dans du 2% BSA/PBS 1X, rincée 3 fois au PBS 1X, réhybridée avec l'anticorps secondaire anti-souris couplé à la HRP (*SantaCruz* #sc-2005) dilué au 1:2000 dans 0.5% BSA/PBS 1X, et lavée 3 fois au PBS 1X. Finalement, le marquage des protéines est révélé par chimiluminescence à l'aide d'une solution de révélation contenant le substrat de la HRP (Millipore #WBKLS0500).

10 Transcription inverse et Réaction en chaîne par polymérase quantitative (qRT-PCR)

Les ARN totaux sont extraits des cultures cellulaires à l'aide du kit « Nucleospin RNA isolation kit » (*Macherey-Nagel* #740955). La transcription inverse est effectuée sur 100 ng d'ARN par échantillon, à l'aide de la transcriptase inverse « RevertAid Reverse Transcriptase » (*Thermo Fisher* #EP0441) selon le protocole décrit par le fournisseur afin d'obtenir de l'ADN complémentaire (ADNc). La PCR est ensuite réalisée sur 1 µL d'ADNc en utilisant le « FastStart SYBR Green Master » (*Roche* #04673484001) contenant la Taq polymérase, les nucléotides ainsi que le marqueur fluorescent SYBR Green I ; pour 1 µL d'ADNc, 10 µL du FastStart SYBR Green Master mix a été

mélangé avec 1 µL de l'amorce sens à 10 µM, 1 µL de l'amorce anti-sens à 10 µM et 7 µL d'eau stérile pour obtenir un volume final de 20 µL. Les réactions de PCR sont effectuées sur le thermocycleur StepOne Plus (*Life technologies*) selon le programme suivant : une étape à 95°C 10 minutes suivie de 40 cycles d'amplification incluant une étape à 95°C 15 secondes et une étape à 60°C 1 minute. L'expression relative à chaque gène est calculée suivant la méthode de quantification $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Les amorces utilisées dans les expériences de qRT-PCR sont listées dans le **Tableau 7**. Le gène de ménage choisi pour la normalisation des résultats d'expression des gènes de réparation de l'ADN est la Tubuline α.

La transcription inverse et l'amplification par PCR de *DUX4* est effectuée comme précédemment décrit (Vanderplanck et al. 2011).

Tableau 7. Liste des amorces sens (F) et anti-sens (R) utilisées dans les expériences de qRT-PCR.

	Amorce sens 5'-3'	**Amorce anti-sens 5'-3'**	**Référence**
RAD51	AGGTGAAGGAAAGGCCATGTAC	CATATGCTACATTATCCAGGACATCA	Lu *et al.* 2012, PMID: 22579953
RAD50	CCAGGGACAGACTTGCCAAAC	TCCAAATCTTGGCTACCACAAACA	Li *et al.* 2011, PMID: 21959603
FANCD2	CCTCGACTCATTGTCAGTCAAC	GATGATGTCATGCTGCAGGT	Ganzinelli *et al.* 2011, PMID: 21216588
BRCA2	CCAAGTGGTCCACCCCAAC	CACAATTAGGAGAAGACATCAGAAGC	
ERCC1	GGGAATTTGGCGACGTAATTC	GCGGAGGCTGAGGAACAG	Rosell *et al.* 2007, PMID: 17987116
MSH6	TCAGAGCCAGAAGAGGAAGAAGAG	CATCAGAGCCACCAATGTCAC	

11 Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software, San Diego California USA). Les résultats des différentes expériences sont analysés à l'aide de différents tests statistiques, suivant les paramètres des expériences ; le test paramétrique de l'analyse de la variance (one-way analysis of variance, ANOVA) ainsi que le test

non-paramétrique de Kruskal-Wallis sont effectués afin de comparer 3 échantillons ou plus, le test non paramétrique de Mann-Whitney et le test paramétrique de Student (test t) sont réalisés pour comparer 2 groupes. Une valeur *p* (p-value) inférieure à 0.05 est considérée comme le seuil de la significativité des tests statistiques.

12 Conception et clonage des outils de l'édition du génome

12.1 Conception de la protéine de fusion CTCF-dCas9-GFP et clonage de CTCF dans le vecteur plasmidique

12.1.1 Conception de la protéine de fusion CTCF-dCas9-GFP

La séquence d'ADN humain de *CTCF* à synthétiser et à cloner correspond à la séquence d'ADNc qui dérive du variant 2 du transcrit d'ARNm humain dont le cadre de lecture fait 1200 pb. Le vecteur plasmidique dCas9-GFP a été commandé sur *Addgene* (pSLQ1658-dCas9-EGFP, Ref. 51023).

Deux sites de restriction uniques sont identifiés en amont de la séquence dCas9-GFP du plasmide, ceux de BglII et NcoI. Afin de pouvoir obtenir la protéine de fusion CTCF-dCas9-GFP, la séquence CTCF doit être clonée en aval du promoteur et en amont de dCas9-GFP, et doit être dépourvue d'un codon stop. Pour cela, nous avons supprimé *in silico* le codon stop « TGA » de la séquence *CTCF* et nous avons ajouté une séquence Kozak en 5'. La traduction en séquence protéique de la séquence *CTCF* modifiée a révélé l'apparition d'un codon stop aberrant, nous avons donc créé une mutation silencieuse en rajoutant un nucléotide C en position 1209 pb au sein de la séquence modifiée qui a alors rétabli le cadre de lecture et a supprimé ce codon stop aberrant. Nous avons par la suite ajouté en 5' le site de restriction de BglII, et en 3' le site de restriction de NcoI. L'analyse de la séquence de *CTCF* obtenue a révélé la présence d'un site de restriction interne de NcoI. Nous avons donc remplacé le site de restriction de NcoI en 3' par celui de l'enzyme de restriction BsaI qui, une fois digéré, génère un bout cohésif similaire à celui obtenu après digestion par NcoI.

La séquence résultante d'ADN double brin de *CTCF* a été validée, synthétisée et clonée dans le vecteur pMAT pour la transformation bactérienne par Thermo Fischer.

12.1.2 Clonage de CTCF dans le vecteur plasmidique dCas9-GFP:

2 µg du plasmide *CTCF* sont digérés à l'aide des enzymes de restriction BglII (NEB #R0144S) et BsaI (NEB #R0535S) simultanément et pendant 2 heures à 37°C selon les consignes du fournisseur, et les enzymes sont par la suite inactivées à 65°C pendant 20 minutes. Cette double-digestion permet de libérer le fragment *CTCF*. En parallèle 2 µg du vecteur dCas9-GFP sont digérés à l'aide des enzymes de restriction BglII et NcoI (NEB #R0193S) simultanément et pendant 2 heures à 37°C selon les consignes du fournisseur, et les enzymes sont par la suite inactivées à 80°C pendant 20 minutes. Cette double-digestion permet de linéariser le plasmide afin de pouvoir spécifiquement cloner *CTCF*.

Les échantillons d'ADN double-digérés ainsi que les vecteurs plasmidiques non-digérés correspondants et le marqueur de poids moléculaire (1Kb Plus DNA ladder, *ThermoFisher* #10787018) sont déposés sur un gel d'agarose à 1% et sont laissés migrer à 100 V pendant 1 heure. Les fragments d'ADN d'intérêt (la séquence *CTCF* et le vecteur dCas9-GFP linéarisé) sont alors extraits du gel et purifiés à l'aide du kit « Nucleospin Gel and PCR clean-up » (Macherey-Nagel #740609.50).

La ligation est ensuite effectuée en incubant le mélange contenant le fragment *CTCF* et le vecteur dCas9-GFP linéarisé au ratio de molarité de 1:3 à 16°C sur la nuit, en présence de la T4 ADN ligase (*NEB* #M0202S) et de l'ATP selon le protocole décrit par le fournisseur. La ligase est finalement inactivée par chauffage du mélange à 65°C pendant 10 minutes. Le plasmide cloné est désigné par CTCF-dCas9-GFP.

4 µL du produit de ligation sont utilisés pour effectuer la transformation bactérienne par choc thermique des bactéries DH5-Alpha E.coli compétentes qui sont alors étalées et cultivées sur la nuit à 37°C sur des boites de Pétri de LB-agar supplémenté en antibiotiques. Plusieurs colonies bactériennes sont ensuite sélectionnées et laissées proliférer dans du milieu de culture liquide contenant l'antibiotique adéquat pour ensuite réaliser l'extraction et la purification plasmidique.

Enfin différentes méthodes ont permis de vérifier le clonage de *CTCF* : la double digestion à l'aide des enzymes de restriction BglII et EcoRI (*ThermoFisher* #ER0271) ayant des sites de

restriction uniques dans le plasmide cloné, la PCR sur l'ADN plasmidique avec les amorces adéquates, et le séquençage de la totalité de la protéine de fusion obtenue.

12.2 Conception et clonage des ARN guides

Les ARN guides (gARN) pour la technologie CRISPR/Cas9 sont conçus à l'aide de l'outil web de conception de CRISPR (http://crispr.mit.edu/). En résumé, la séquence d'ADN génomique à cibler est analysée pour des sites potentiels et hautement spécifiques de reconnaissance par les gARN, sachant que la séquence de 20 nucléotides reconnue par le gARN doit impérativement être précédée d'une séquence PAM (NGG). Différents gARN sont proposés et des scores leur sont attribués selon leur spécificité de ciblage. Les gARN ayant les scores les plus élevés sont donc sélectionnés. Puisque le promoteur U6 humain est celui présent dans les vecteurs plasmidiques pour l'expression des gARN, promoteur préférant le « G » comme premier nucléotide à transcrire, un « G » est rajouté en 5' de l'oligonucléotide sens (marqué en vert dans la séquence) si la séquence du gARN commence par un autre nucléotide. De plus, des sites de restriction leur sont rajoutés en 5' et/ou en 3', selon le plasmide dans lequel ils seront clonés. Ainsi les séquences d'ADN des gARN sont synthétisées sous forme d'oligonucléotides sens et anti-sens séparément.

Les oligonucléotides sens et anti-sens relatifs aux gARN sont mélangés à molarité égale et sont dénaturés à 95°C pendant 5 minutes, puis laissés pendant 1 heure à température ambiante pour permettre leur appariement. Les oligonucléotides doubles-brins obtenus comprennent une extrémité simple brin de 4 pb en 5' (marquée en bleu) et/ou en 3' (marquée en rouge) (selon la conception initiale de leurs séquences) qui est compatible avec les bouts cohésifs du vecteur plasmidique linéaire suite à sa digestion par la(les) enzyme(s) de restriction adéquate(s).

Une réaction de ligation des oligonucléotides doubles-brins avec le plasmide est par la suite entamée au ratio 1:7 selon le protocole de ligation précédemment décrit. Les produits de la ligation sont finalement amplifiés suite à la transformation bactérienne comme précédemment décrit.

Des variants de gARN ayant 2 nucléotides en moins en 5' (18 nucléotides en total), s'avérant être plus efficaces (Fu et al. 2014), ont été aussi conçus et testés.

12.2.1 Conception et clonage des gARN relatifs aux expériences avec le vecteur plasmidique CTCF-dCas9-GFP

Les séquences des gARN ayant obtenu les scores les plus élevés ont été sélectionnées pour les cloner dans le plasmide pU6-sgRNA EF1Alpha-puro-T2A-BFP (*Addgene* #60955). Le vecteur plasmidique est digéré simultanément par BstXI (*NEB* #R0113S) et XhoI (*ThermoFisher* #ER0691) et extrait et purifié sur gel d'agarose. Les gARN sont synthétisés sous forme d'oligonucléotides doubles-brins sens et anti-sens séparément, avec l'oligonucléotide anti-sens ayant en 5' une extrémité simple-brin TCGA et en 3' une extrémité simple-brin CAAG (**Tableau 8**). La dénaturation et l'appariement des oligonucléotides sens et anti-sens réalisée comme décrit précédemment permet d'obtenir une séquence d'ADN du gARN avant des bouts cohésifs compatibles avec ceux du plasmide doublement digéré. Le clonage des gARN est effectué comme décrit précédemment.

Tableau 8. Liste des oligonucléotides double-brin sens et anti-sens conçus pour le clonage des séquences des ARN guides dans le plasmide pU6-sgRNA EF1Alpha-puro-T2A-BFP.

Nom de l'oligonucléotide	Séquence 5'→3'
CTCF-4qCRISPR-20guide1-F (sens)	gataccgacagcaatagtcc
CTCF-4qCRISPR-20guide1-R (anti-sens)	TCGAggactattgctgtcggtatcCAAG
CTCF-4qCRISPR-18guide1-F (sens)	gtaccgacagcaatagtcc
CTCF-4qCRISPR-18guide1-R (anti-sens)	TCGAggactattgctgtcggtacCAAG
CTCF-4qCRISPR-18guide2-F (sens)	gcacctagaatctatagcc
CTCF-4qCRISPR-18guide2-R (anti-sens)	TCGAggctatagattctaggtgcCAAG

12.2.2 Conception et clonage des gARN relatifs aux expériences avec le vecteur plasmidique CRISPR/Cas9

Les séquences des gARN ayant obtenu les scores les plus élevés ont été sélectionnées pour les cloner dans le plasmide Dirk_U6.stuffer.chimericgRNAbackbone.EFS.Flag.Cas9.P2A.eGFP (s-CRISPR-GFP) (fourni par Dr. Khaled Mehdi, Gustave Roussy, Villejuif), contenant le promoteur U6 et la séquence de Cas9 (**Figure 24**). Le vecteur plasmidique est digéré par BsmBI (*NEB* #R0580S), enzyme ayant 2 sites de restriction dans le plasmide, créant des bouts cohésifs sur les 2 brins de

l'ADN plasmidique. Le vecteur digéré et linéaire est alors extrait et purifié sur gel d'agarose. Les gARN sont synthétisés sous forme d'oligonucléotides doubles-brins sens et anti-sens séparément, avec l'oligonucléotide sens ayant en 5' une extrémité simple-brin CACCG, et l'oligonucléotide anti-sens ayant en 5' une extrémité simple-brin AAAC (**Tableau 9**). La dénaturation et l'appariement des oligonucléotides sens et anti-sens réalisée comme décrit précédemment permet d'obtenir une séquence d'ADN du gARN avant des bouts cohésifs compatibles avec ceux du plasmide digéré par BsmBI. Le clonage des gARN est effectué comme décrit précédemment.

Tableau 9. Liste des oligonucléotides double-brin sens et anti-sens conçus pour le clonage des séquences des ARN guides dans le plasmide CRISPR/Cas9.

Nom de l'oligonucléotide	Séquence 5'→3'
4qCRISPR-20guide1-F (sens)	CACCGgataccgacagcaatagtcc
4qCRISPR-20guide1-R (anti-sens)	AAACggactattgctgtcggtatcC
4qCRISPR-20guide2-F (sens)	CACCGgagcacctagaatctatagcc
4qCRISPR-20guide2-R (anti-sens)	AAACggctatagattctaggtgctcC
4qCRISPR-20guide3-F (sens)	CACCGgatagcctggactattgctgt
4qCRISPR-20guide3-R (anti-sens)	AAACacagcaatagtccaggctatcC
4qCRISPR-18guide1-F (sens)	CACCGgtaccgacagcaatagtcc
4qCRISPR-18guide1-R (anti-sens)	AAACggactattgctgtcggtacC
4qCRISPR-18guide2-F (sens)	CACCGgcacctagaatctatagcc
4qCRISPR-18guide2-R (anti-sens)	AAACggctatagattctaggtgcC
4qCRISPR-18guide3-F (sens)	CACCGgagcctggactattgctgt
4qCRISPR-18guide3-R (anti-sens)	AAACacagcaatagtccaggctcC

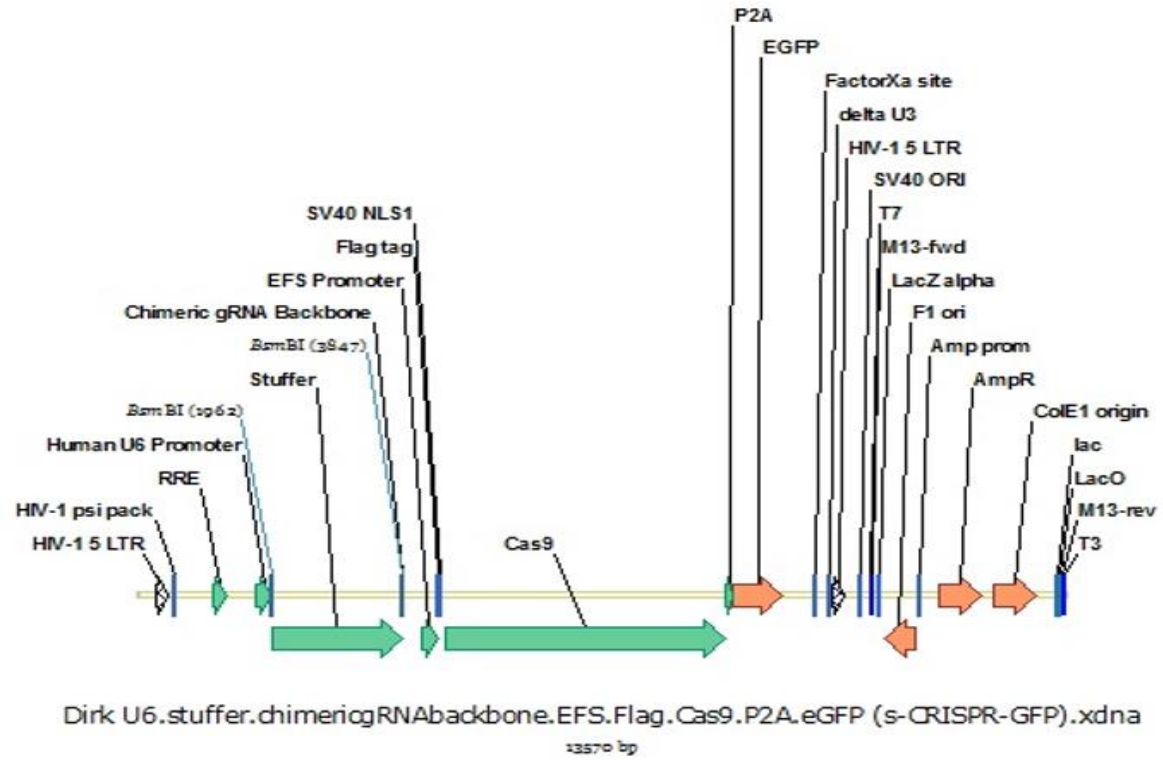


Figure 24. Représentation schématique et linéaire du plasmide circulaire comprenant la séquence de Cas9 et dans lequel la séquence de l'ARN guide est clonée. Suite à la digestion du plasmide par l'enzyme de restriction BsmBI et l'élimination du fragment « stuffer », le plasmide digéré linéaire peut acceuillir la séquence nucléotidique de l'ARN guide ayant les extrémités 5' et 3'compatibles avec les bouts cohésifs du plasmide digéré.

12.3 Conception des amorces pour le séquençage de la protéine de fusion CTCF-dCas9-GFP

Dans le but de séquencer la protéine de fusion CTCF-dCas9-GFP obtenue suite au clonage, des amorces sens et anti-sens ont été conçues (**tableau 10**) à l'aide de l'outil web « OligoPerfect Designer » (*ThermoFisher*), couvrant la totalité de la séquence d'intérêt (approximativement 6000 pb). Neuf amorces sens, espacées de 700 pb l'une de l'autre, ont été synthétisées. De même, 9 amorces anti-sens, reconnaissant des séquences différentes que celles des amorces sens, ont aussi été produites. Le vecteur cloné a été séquencé avec chaque amorce sens et anti-sens par la plateforme de séquençage Eurofins, les séquences obtenues ont été raccordées à l'aide du logiciel « SeqMan », puis alignées avec la séquence théorique du plasmide cloné.

Tableau 10. Liste des amorces sens (F) et anti-sens (R) conçues pour le séquençage de CTCF-dCas9-GFP.

Nom de l'amorce	Séquence 5'→3'
P-CTCF-dCas-GFP-1F	acctcctcgttcgacccc
P-CTCF-dCas-GFP-2F	aagcagcttctcgacatgc
P-CTCF-dCas-GFP-3F	ctaagaagttcaaggtgctcgg
P-CTCF-dCas-GFP-4F	caagctgcaactgtccaag
P-CTCF-dCas-GFP-5F	actaacttcgataagaacctcccc
P-CTCF-dCas-GFP-6F	gttcacccgctattaagaaggg
P-CTCF-dCas-GFP-7F	ggtcagcgatttcagaaagg
P-CTCF-dCas-GFP-8F	ctggagaatgggcggaag
P-CTCF-dCas-GFP-9F	gctgaccctgaagttcatctg
P-CTCF-dCas-GFP-1R	tgctaaagcgcatgctcc
P-CTCF-dCas-GFP-2R	ttgtggccgtttacgtcg
P-CTCF-dCas-GFP-3R	aggagctgcgctccataat
P-CTCF-dCas-GFP-4R	attcatgcgtgagtcaaggat
P-CTCF-dCas-GFP-5R	tcctccttaaaggtcagggaa
P-CTCF-dCas-GFP-6R	tgatagtttcttctgactttctggtc
P-CTCF-dCas-GFP-7R	gttcccgaacagtccattttt
P-CTCF-dCas-GFP-8R	ttttggggctagccatgg
P-CTCF-dCas-GFP-9R	gtaatcacactggtcacacttaaagc

12.4 Conception et production des TALENs

Les plasmides TALENS ciblant des loci spécifiques de la région 8q24 (*CMYC)*, 14q32 (*IGH)* et 4q35 (en amont du locus 4qA161 et des répétitions D4Z4) sont produits par *Life Technologies* à l'aide du système de clonage Gateway.

13 PCR génomique pour la détection des translocations

13.1 Amplification par PCR de la région de translocation et détermination de la taille des amplicons par électrophorèse sur gel d'agarose

Les échantillons d'ADN génomique provenant des cellules transfectées et non-transfectées (contrôle négatif) sont utilisés pour l'amplification par PCR génomique de la région de translocation. Les amorces sont conçues pour ces expériences à l'aide du logiciel Primer3 (**Tableau 11**). Toutes les combinaisons possibles des amorces sens et anti-sens permettant de détecter des translocations potentielles (t(8;14), t(4;8) et t(4;14)) sont testées.

La réaction de PCR génomique est effectuée pour chaque condition dans un volume final de 20 µL contenant : 10 µL FastStartSYBR Green Master mix, 7 µL d'eau stérile, 1 µL de l'amorce sens à 10 µM, 1µL de l'amorce anti-sens à 10 µM et 1 µL d'ADN génomique ayant une concentration entre 0.5-1 µg/µL.

Le programme de PCR adopté comprenait : une première étape à 95°C pendant 10 minutes et 40 cycles d'amplification dont chacun comprend une étape à 95°C pendant 30 secondes, une étape à 57°C pendant 1 minute et une étape à 72°C pendant 10 minutes.

Les produits de PCR sont ensuite mélangés avec le colorant de charge d'ADN « DNA gel loading dye 6X » (*ThermoFisher* #R0611) et déposés dans un gel d'agarose à 1% dans le tampon TAE 1X, l'électrophorèse à 100 V pendant 1 heure est alors lancée et leur taille est vérifiée à l'aide du marqueur de poids moléculaire 1Kb Plus DNA ladder. Les amplicons sont ensuite extraits du gel et purifiés à l'aide du kit « Nucleospin Gel and PCR clean-up » afin de pouvoir les analyser par séquençage (*Eurofins Genomics*, Plateforme de séquençage de Cochin, France).

Tableau 11. Liste des amorces sens et anti-sens employées dans les expériences d'amplification par PCR génomique des régions de translocation.

	Amorce sens 5'-3'	**Amorce anti-sens 5'-3'**	**Taille de l'amplicon (pb)**
***CMYC* (TAL-8)**	GGCCGTTTTAGGGTTTGTTGG	CTTTTCTCTCCCTCCACCACC	691
***IGH* (TAL-14)**	CCCAGCCCTTGTTAATGGACT	AGGTCCCCTTGCTCTAGAAGT	644
4qTal3 (TAL4)	AGTTTGCACTGGAGCAGAGATG	GGGATACCGACAGCAATAGTCC	567
18g1	GACAGCCAACTGGGGAAGA	TGGGGATCTATACAGCACTCATC	217

13.2 Dilutions en série de l'ADN génomique et quantification de l'intensité des bandes d'ADN sur le gel d'agarose

L'ADN génomique issu des cellules transfectées par 2 couples de TALENs est dilué en série au ratio 1/5 (de 1000 ng jusqu'à 0.8 ng d'ADN). La PCR génomique est effectuée sur chaque échantillon d'ADN dilué, en duplicatas, comme précédemment décrit. Les produits de PCR sont ensuite déposés

sur un gel d'agarose à 1% pour une électrophorèse d'ADN. La taille des amplicons est déterminée par rapport au marqueur de poids moléculaire 1Kb Plus DNA ladder. L'intensité du signal des bandes d'ADN obtenues est ensuite quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ (NIH) en mesurant le paramètre « integrated density » de chaque bande et en l'ajustant par l'élimination du bruit de fond.

Le nombre minimal de cellules nécessaire pour détecter une translocation est calculé par rapport à la quantité d'ADN utilisée pour la PCR, la quantité moyenne d'ADN présente dans une cellule HeLa et le pourcentage de cellules transfectées. En se basant sur le fait qu'une cellule de mammifère contient approximativement 6.7 pg d'ADN et que cette quantité est doublée en phase G2 (Serth et al. 2000), nous avons considéré qu'une cellule HeLa contient 10 pg d'ADN à peu près. Les analyses statistiques sont effectuées sur des mesures d'intensité des bandes issues de 3 expériences indépendantes et les graphes sont réalisés à l'aide du logiciel GraphPad prism version 5.00 (San Diego California USA).

Dans le but de vérifier l'exactitude des dilutions, une amplification par PCR génomique de *CMYC* (avec les amorces *CMYC*-sens et *CMYC*-anti sens) est réalisée sur toutes les dilutions de l'ADN génomique des cellules transfectées et non-transfectées, puis l'intensité du signal des bandes correspondant aux amplicons obtenues est mesurée suite à leur migration sur gel d'agarose 1%, et finalement une courbe de calibration est dessinée. La taille des amplicons de *CMYC* est vérifiée en comparant par rapport au marqueur de poids moléculaire.

Publications

1 Publications relatives au travail de thèse

Dmitriev P*, **Yara Bou Saada***, Dib C, Ansseau E, Barat A, Hamade A, Dessen P, Robert T, Lazar V, Zakharova V, Carnac G, Lipinski M, Vassetzky Y.S. DUX4-induced constitutive DNA damage and oxidative stress contribute to aberrant differentiation of myoblasts from FSHD patients. *Free Radical Biology and Medicine*. 2016, 99: 244-258

Bou Saada Y, Dib C, Dmitriev P, Hamade A, Carnac G, Laoudj-Chenivesse D, Lipinski M, Vassetzky Y.S. Facioscapulohumeral dystrophy myoblasts efficiently repair moderate levels of oxidative DNA damage. *Histochem. Cell. Biol*. 2016, 145: 475-483.

Bou Saada Y*, Dib C*, Lipinski M, Vassetzky Y.S. Genome- and cell-based strategies in therapy of muscular dystrophies. *Biochemistry (Moscow)*. 2016, Vol. 81, No. 7, pp 678-690.

Dib C, **Bou Saada Y**, Dmitriev P, Richon C, Dessen P, Laoudj-Chenivesse D, Carnac G, Lipinski M, Vassetzky Y.S. Correction of the FSHD myoblast differentiation defect by fusion with healthy myoblasts. *J. Cell. Physiol*. 231 : 62-71, 2016.

2 Publications non relatives au travail de thèse

Zakharova V.V, Dib C, **Bou Saada Y**, Vassetzky Y. S., Galkin I. I., Chernyak B. V., Popova E. N. Uncoupling of oxidative phosphorylation and antioxidants affect fusion of primary human myoblasts *in vitro*. *Biopolymers and Cell.* 2016. Vol. 32. N 2. P 111–117

Journal of Cellular Physiology

Correction of the FSHD Myoblast Differentiation Defect by Fusion With Healthy Myoblasts

CARLA DIB,[1] YARA BOU SAADA,[1] PETR DMITRIEV,[1] CATHERINE RICHON,[2] PHILIPPE DESSEN,[2] DALILA LAOUDJ-CHENIVESSE,[3] GILLES CARNAC,[3] MARC LIPINSKI,[1] AND YEGOR S. VASSETZKY[1]*

[1]*UMR 8126, University of Paris-Sud, CNRS, Institut de Cancérologie Gustave-Roussy, F-94805 Villejuif, France*

[2]*Functional Genomics Unit, Institut de Cancérologie Gustave-Roussy, F-94805 Villejuif, France*

[3]*INSERM U-1046, 371 Avenue du Doyen Gaston Giraud, F-34295 Montpellier, France*

Facioscapulohumeral dystrophy (FSHD) is a neuromuscular disease with a prevalence that could reach 1 in 8,000 characterized by progressive asymmetric muscle weakness. Myoblasts isolated from FSHD muscles exhibit morphological differentiation defects and show a distinct transcription profile. These abnormalities may be linked to the muscle weakness in FSHD patients. We have tested whether fusion of FSHD myoblasts with primary myoblasts isolated from healthy individuals could correct the differentiation defects. Our results show that the number of hybrid myotubes with normal phenotype increased with the percentage of normal myoblasts initially cultured. We demonstrated that a minimum of 50% of normal nuclei is required for a phenotypic correction of the FSHD phenotype. Moreover, transcriptomic profiles of phenotypically corrected hybrid myotubes showed that the expression of deregulated genes in FSHD myotubes became almost normal. The number of deregulated pathways also decreased from 39 in FSHD myotubes to one in hybrid myotubes formed with 40% FSHD and 60% normal myoblasts. We thus propose that while phenotypical and functional correction of FSHD is feasible, it requires more than 50% of normal myoblasts, it creates limitations for cell therapy in the FSHD context.

J. Cell. Physiol. 231: 62–71, 2016. © 2015 Wiley Periodicals, Inc.

Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) is an autosomal dominant neuromuscular disease with a prevalence that could reach 1 in 8,000 (Deenen et al., 2014). Clinically, FSHD is characterized by a progressive weakness and atrophy of the facial muscles and the shoulder girdle. There is a wide variability in the spectrum of the disease, however, with clinical features ranging from a very mild muscle weakness—with some patients even unaware of being affected—to severe symptoms that make patients wheelchair-dependent.

Myoblasts isolated from FSHD patients exhibit defects in their morphological differentiation. Whereas normal myoblasts fuse to form branched myotubes whose nuclei are aligned, the myotubes resulting from FSHD myoblast fusions are either thin and atrophic with nuclei aligned, or large with a random distribution of the nuclei (Barro et al., 2010a). These abnormalities may be a cause for the muscle weakness in FSHD patients.

The major genetic form of FSHD has been mapped to the subtelomeric region of the long arm of chromosome 4 (Wijmenga et al., 1991). In this region, three abnormalities have been specifically associated with FSHD: a partial deletion within D4Z4, a polymorphic macrosatellite repeat array; the presence of SSLP-161, a specific simple sequence length polymorphism; and that of the 4qA allele (reviewed in (Tawil et al., 2014)). This three feature-combination leads to large-scale epigenetic changes in the 4q35 chromosomal region in FSHD patients (Van et al., 2003; Petrov et al., 2006, 2008; Cabianca et al., 2012; Kisseljova et al., 2014) which releases the inhibition otherwise imposed on the expression of *DUX4,* a gene contained in the D4Z4 repeat and possibly also leads to the overexpression of *ANT1, FRG1, DUX4c,* and *FRG2,* five genes positioned centromerically to D4Z4 and which each has been implicated for a role in FSHD: (Gabellini et al., 2002; Rijkers and deidda, 2004; Masny and Chan, 2010; Dmitriev et al., 2011a).

Among the D4Z4-proximal genes, some affect gene transcription. Thus, *DUX4* and *DUX4c* encode homeobox transcription factors and *FRG1* a splicing factor. Their altered expression can result in a wide transcriptional deregulation in FSHD myoblasts. Indeed, transcriptomic studies have revealed hundreds of genes deregulated in FSHD myoblasts and myotubes as compared to controls. In these studies, affected pathways included myogenesis (Winokur et al., 2003; Tsumagari et al., 2011), muscle structure, mitochondrial function (Tsumagari et al., 2011), stress responses, signal transduction (Tsumagari et al., 2011), the immune system (Winokur et al., 2003; Arashiro et al., 2009; Tsumagari et al., 2011) and the cytoskeleton (Dmitriev et al., 2011b; Tassin et al., 2012). Interestingly, some of these pathways can be deregulated in cells overexpressing an ectopic version of the *DUX4* gene (Geng et al., 2012).

Abbreviations: FSHD, facioscapulohumeral dystrophy; MFI, myogenic fusion index; DMI, deformed myotube index.

Current address of Petr Dmitriev is IRIBHM, Université Libre de Bruxelles, 1070 Bruxelles, Belgium.

Contract grant sponsor: Association Française contre les Myopathies (AFM).

*Correspondence to: Yegor S. Vassetzky, UMR 8126, University of Paris-Sud, CNRS, Institut de Cancérologie Gustave-Roussy, F-94805 Villejuif, France. E-mail: vassetzky@igr.fr

Manuscript Received: 18 June 2015
Manuscript Accepted: 24 July 2015

Accepted manuscript online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com): 27 July 2015.
DOI: 10.1002/jcp.25110

© 2015 WILEY PERIODICALS, INC.

The fusion of myoblasts, a crucial event in muscle differentiation, is a regulated multistep process which in vertebrates is triggered in response to muscle tissue damages. For the tissue to regenerate, muscle satellite cells must proliferate and fuse. This is accompanied by a coordinated regulation of numerous pathways orchestrated by master gene regulators including MyoD and Myf5 with the accompanying expression of a few specific miRNAs (Dmitriev et al., 2013).

Here, we have considered satellite cells as possible targets for an innovative therapeutical approach in FSHD, as suggested in (Bareja and Billin, 2013). Our approach was based on the idea that fusing normal and FSHD myoblasts could result in a normalized phenotype in hybrid cells. To study the feasibility of such an approach, hybrid myofibers have been produced in vitro and examined for their phenotypic and transcriptional features. Our results show that the number of hybrid myotubes with normal phenotype increases with the percentage of normal myoblasts initially culture and for this FSHD phenotypic correction a minimum of 50% of normal nuclei is required. Moreover, transcriptomic profiles of phenotypically corrected hybrid myotubes show that the expression of deregulated genes in FSHD myotubes became almost normal.

Materials and Methods

Data of FSHD patients and healthy individuals

Primary human myoblasts were isolated from samples of skeletal muscle obtained with the patients' consent in accordance with the French and European legislation and cultured as described (Barro et al., 2010a). Ethics approval was obtained from Montpellier University Ethics Committee. The primary human myoblasts are described in Table 1.

Proliferation and differentiation of myotubes

Myoblasts were seeded at 10^6 cells/dish onto 35 mm collagen-coated dishes and cultured in growth medium (DMEM containing 20% FBS). Cells were counted using a cell counter (Vi-cell Beckman Coulter, Villepinte, France). Myogenic differentiation of confluent cells was induced after 2 hr by changing to DMEM containing 2% FBS (differentiation medium). Cells were kept in differentiation medium for 4 days. At day 4 after induction of differentiation, cells were immunostained with anti-troponin T antibody coupled with DAPI (see Immunostaining for details) to visualize myotubes and nuclei in the culture. All experiments were carried out at passages between 2, 3, and 4 to avoid cell senescence.

Immunostaining

Human myotubes were fixed in 0.5% PBS/BSA containing 2% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) and treated with 0.5% PBS/BSA containing 0.5% triton X-100. Myotubes were then labeled with monoclonal anti-troponin T (mAb, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) antibodies diluted at 1/50 and revealed using anti-mouse Alexa-488 conjugated antibodies (Molecular Probes—Life technologies, Saint-Aubin, France) diluted at 1/100 from an initial concentration of 2 mg/ml. Nuclei were visualized by DAPI staining. All the washes were done with 0.5% PBS/BSA. The stained myotubes were observed under a fluorescent microscope (Microvision instruments, Hagerstown, MD) (Excitation/Emission:488/519 nm), and images from adjacent fields of view were stitched together by using Cartograph (Microvision) to create one large image of the specimen.

TABLE 1. Normal and FSHD cell lines used in the present study

Name	Sex	Age (years)	D4Z4 copy number	Muscle
M048	M	39	6	Vastus lateralis
M054	M	25	4	Vastus lateralis
N045	F	35	NA	Quadriceps
N039	F	23	NA	Paravertebral
N042	F	24	NA	Quadriceps

Chromosome Y fluorescence in-situ hybridization

Myotubes grown in Petri dishes were incubated in 2XSSC for 15 min at room temperature and treated in 70% formamide at 60°C for DNA denaturation. 10 μl of chromosome Y probe (Cytocell, Cambridge, United Kingdom) for each test (28 ng/test) was heated at 37°C for 10 min then dropped on myotubes. DNA was denatured at 75°C for 10 min. Hybridization was done in a wet chamber overnight in the dark at 37°C. Post hybridization washings were done with 50% Formamide/2X SSC and 2X SSC. Nuclei were visualized by DAPI staining.

Analysis of myotubes' fusion

Fusion competence was determined after 4 days of differentiation using the Myotube Fusion Index (MFI). The myogenic fusion index (MFI) was determined by dividing the number of nuclei in multi-nucleated myotubes by the total number of nuclei in a given microscopic field. Three fields per culture were counted in three independent cultures (a total of 1,500 nuclei per cell line) using Image J, Java-based image processing program developed at the National Institutes of Health.

The Deformed Myotube Index (DMI) was calculated as the proportion of myotubes with a deformed morphology characterized by an abnormal repartition of nuclei. 100 myotubes were counted per condition in three independent experiments. Statistical treatment of the data was performed using Chi square test.

Quantitative analysis of FSHD nuclei in hybrid myotubes

FSHD nuclei were counted in phenotypically corrected and non-corrected hybrid myotubes and the percentage of FSHD and normal nuclei was established. An average of 24 myotubes per condition was scored in three independent experiments.

RNA isolation

The RNA isolation from phenotypically corrected myotubes was performed by TriPrep NucleoSpin ® kit (Macherey-Nagel) according to manufacturer's instructions.

Reverse transcription-PCR assays

100 ng of total RNA was reverse transcribed with random hexamers (Fermentas) using the following cycling protocol: 10 min 25°C, 60 min 42°C, 10 min 70°C, 4°C . Quantitative PCR amplifications were done with 5ng of cDNA using the following primers: FRG2-forward: GCCCAGGTGTGGGCACAGCAGA and FRG2-reverse: CGGGTCCACACCCGTGTCGTCT;

GAPDH-forward: TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG and GAPDH-reverse: TCCTTGGAGGCCATGTGGGCCAT applying the following cycling protocol: 10 min 95°C, 40 cycles 95°C then 60°C and melting curve. Amplification of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as an internal control. The number of copies of the target sequence in each sample was determined by relative quantification using the comparative C_T ($\Delta\Delta C_T$) method. Statistical treatment of the data was performed using a two-sided Student's *t*-test. The quantity and quality of RNA for RT-PCR were determined by the NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

Microarray gene expression profiling

The quantity and quality of RNA for transcriptome analysis were determined by Agilent 2100 bioanalyzer (Santa Clara, CA). The microarray gene expression profiling was performed using Agilent long oligonucleotide technology (Human genome 8 × 60K, design 028004) based on a single color analysis method (Cy3). Experiments were performed in biological duplicate. After normalization with the Limma procedure, the intensities were imported into the Biometric Research Branch (BrB) Arrays Tools software version 4.4.0 (November 2014) (http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html). Class Comparisons of each corrected samples were performed at a *P*-value of 0.001, and a fold-change of two by comparing corrected and normal samples (low intensities <50 and probes on chromosomes X and Y were filtered). The genes that were differentially expressed among the two classes were identified using a random-variance *t*-test (an improvement over the standard separate *t*-test as it permits sharing information among genes about within-class variation without assuming that all genes have the same variance). Genes were considered statistically significant if their *P*-value was <0.001. The data are submitted in the EMBL–EBI database with the access number E-MTAB-3658.

Pathway class comparison

We identified groups of genes of KEGG pathways whose expression was differentially regulated among the classes. By analyzing KEGG groups, rather than individual genes, we were able to reduce the number of tests conducted, and to enable findings among biologically related genes to reinforce each other. For each KEGG group we computed the number n of genes represented on the microarray in that group, and the statistical significance π value for each gene in the group (threshold of 0.005). For a group, two statistics are computed that summarize the *P*-values for genes in the group; the Fisher (LS) statistic and the Kolmogorov–Smirnov (KS) statistic. For each KEGG category, two significance levels are computed, corresponding to the two summary statistics. We considered a KEGG category significantly differentially regulated if the two significance levels were less than 0.01. We considered all KEGG categories with between 5 and 100 genes represented on the array. Some of the categories were overlapping.

Correlation with the dilution effect

To analyze the effect of a selection of 240 genes (a part of the signature of 100% disease versus 100% normal samples at a *P*-value of 0.001 and a fold change > 1.5), we have explored the Pearson correlation between experimental expressions of each gene at 0, 40, 60, 80, and 100% disease state) with a theoretical set of values defined by the proportion of disease (between 0 and 100%). Genes with correlation coefficients between 0.8 and 1 were considered to be correlated to dilution.

Results

Phenotypic analysis of hybrid myotubes

Myotubes are formed from muscle precursors which express the CD56 surface antigen. In FSHD, myotubes are formed from myoblasts but they are either atrophic or disorganized (Fig. 1B) (Barro et al., 2010a). Since fusion occurs in FSHD as well as in normal myoblasts, we tested whether a fusion between a mixture of normal and FSHD myoblasts would produce myotubes with normal or FSHD features. In order to control the proportion of normal and FSHD cells in each myotube, we used primary CD56+ FSHD myoblasts from men and normal myoblasts from women. The myoblasts were isolated and highly purified (90–95% of desmin-positive cells in both FSHD and control cell cultures) as previously described (Barro et al., 2010a). Their properties are summarized in Table 1. We have chosen to carry out experiments on cell lines that were described to form disorganized myotubes (Barro et al., 2010b). Once differentiated into myotubes, they are easily distinguished from hybrid myotubes with normal phenotype. In the first series of experiments, we fused the myoblast cell-line MO54 which has been derived from an FSHD patient with NO42 normal myoblasts. Different combinations were tested varying from 0 to 100% of either cell line. These primary cells were plated onto collagen-coated petri dishes at a density of 10^6 cells per petri dish and induced to differentiate two hours after seeding. Four days later, they were collected and stained for the differentiation marker troponin and the presence of the Y chromosome. Typical patterns of troponin-stained myotubes generated from either 100% normal cells or from FSHD subjects are shown in Figure 1A and B. As expected, normal myotubes were found branched and with aligned nuclei while FSHD myotubes were disorganized with either randomly localized nuclei or node-like structures with circular distribution of nuclei. 100% of these nuclei were stained for Y chromosome (data not shown).

Hybrid myotubes formed from a mixture containing only 20% normal myoblasts could not be distinguished from myotubes formed with 100% FSHD myoblasts. When the proportion of normal myoblasts increased in the starting mixture, the phenotype of the resulting myotubes improved. As seen in Figure 1C–F, the resulting hybrid myotubes exhibited a phenotype that was closer to normal as the proportion of normal myoblasts was more important in the initial combination. Indeed, when the initial mixture included 20% FSHD myoblasts, the myotube phenotype we observed was very similar to the control with 100% normal cells. Interestingly, the phenotypes were either normal or disorganized; no intermediary forms could be observed.

We then concentrated on two distinct combinations with 40 or 60% normal and FSHD cells, respectively (N40M60: 40% normal, 60% FSHD; N60M40: 60% normal, 40% FSHD). In these experiments, four different cell lines were used, two from FSHD men (M048 and M054), two (N039, N045) from healthy women. Resulting hybrid myotubes were stained for troponin to quantify disorganized phenotype using the deformed myotubes index (DMI) (Yip and Picketts, 2003) that determins the proportion of myotubes with abnormal phenotype in the culture. One hundred myotubes have been scored in each combination (each FSHD cell line was combined separately with the two normal myoblasts cell lines). The proportion in FSHD had an average of 63.5% whereas the DMI decreased to 25.5% in N40M60 combination and 14% in N60M40 to approach to the DMI in controls which is 1% in agreement with our first observations of a relationship between the phenotype of the hybrid myotubes and the starting proportion of defective and normal myoblasts in the cell mix (Fig. 1H).

To assess fusion competence, we calculated the myogenic fusion index (MFI) of all the cell lines we used in our experiments (MO54, MO48, NO42, NO39, and NO45). MFI is the ratio between the nuclei present in myotubes versus the total number of nuclei in a given field, where a myotube is defined as a muscle cell containing at least three or more nuclei. We obtained 72% and 77% for both FSHD (M) and Normal (N) cell cultures, respectively (Fig. 1G). This indicates that fusion occurs similarly in normal and FSHD myoblasts.

A proportion of 50% normal myoblasts is compatible with a normal phenotype in hybrid myotubes

To better characterize the parental origin of the cells which form myotubes after cell fusion, we used fluorescence in situ hybridization (FISH) to stain for the Y chromosome. Nuclei derived from male FSHD myoblasts were thus revealed in the

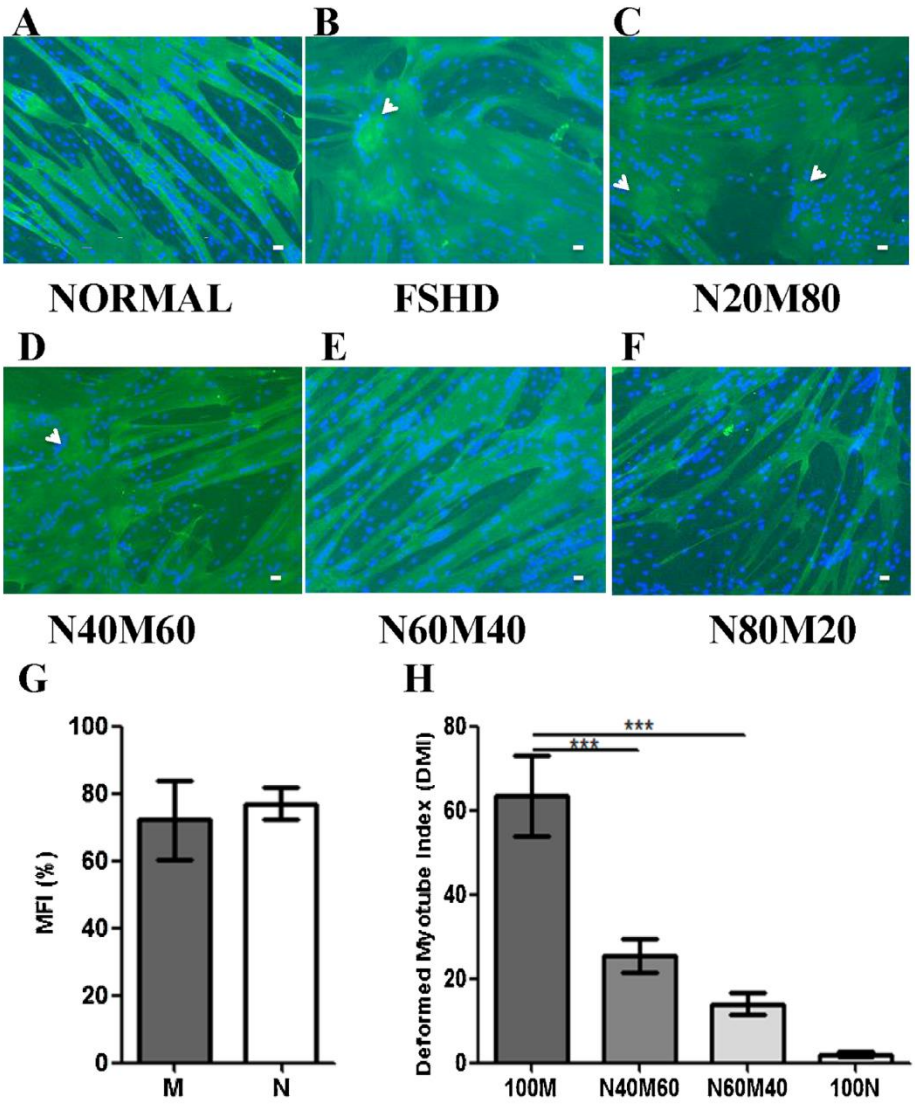


Fig. 1. Analysis of myotube phenotype in normal/FSHD hybrid myotubes. The normal and FSHD myoblasts were grown alone or mixed in different proportions and induced to differentiate. The phenotype of myotubes was analyzed under a fluorescent microscope after the troponin T staining. (A), Normal myotubes have branched myotubes with aligned nuclei. (B) FSHD cells produce large disorganized myotubes with abnormal nuclei repartition; (C), Hybrid myotubes formed with 20% of normal myoblasts are phenotypically identical to FSHD myotubes; (D–F) the phenotype becomes progressively normal with the increase in the proportion of normal myoblasts in the culture; nuclei become aligned, and the number of node-like structures decreases. Node-like structures are indicated with arrows. Immunofluorescence with an anti-troponin T antibody (green) and DAPI nuclear staining (blue); bar = 10 μm. (G) Myogenic Fusion Index (MFI) of FSHD and normal cultures. MFI averages for both FSHD (M) and Normal (N) cell cultures are 72% and 77%, respectively. Nuclei of three fields per culture were counted in three independent cultures for each cell line (1,500 nuclei). (H) Deformed Myotube Index (DMI) of FSHD, hybrid and control cultures. The proportion of deformed myotubes decreased withthe percentage of normal myoblasts initially seeded, while the proportion of myotubes with normal phenotype increased. An average of 100 myotubes per condition was scored in three independent experiments; ***, $P < 0.001$.

hybrid myotubes generated in vitro. Figure 2A shows such an example of Y chromosome-containing nuclei present (arrows) in a hybrid myotube. Next the proportion of FSHD-derived vs. normal nuclei was counted in 48 different myotubes, whether looking disorganized or normal. In phenotypically normal myotubes, the average number of FSHD (Y chromosome-stained) nuclei was similar in both combinations tested with 46 ± 13% present in the N40M60 combination and 41 ± 11% in the opposite N60M40 combination. In disorganized myotubes, the average proportion of Y chromosome-containing myoblasts was also quite high, in our conditions myotubes with up to 44% of nuclei lacking a Y chromosome did not exhibit a normal phenotype regardless of the combinations tested (Fig. 2B). Taken together, these data suggest that the presence of greater than 50% normal cells in a hybrid myotube is compatible with a morphologic phenotype looking normal.

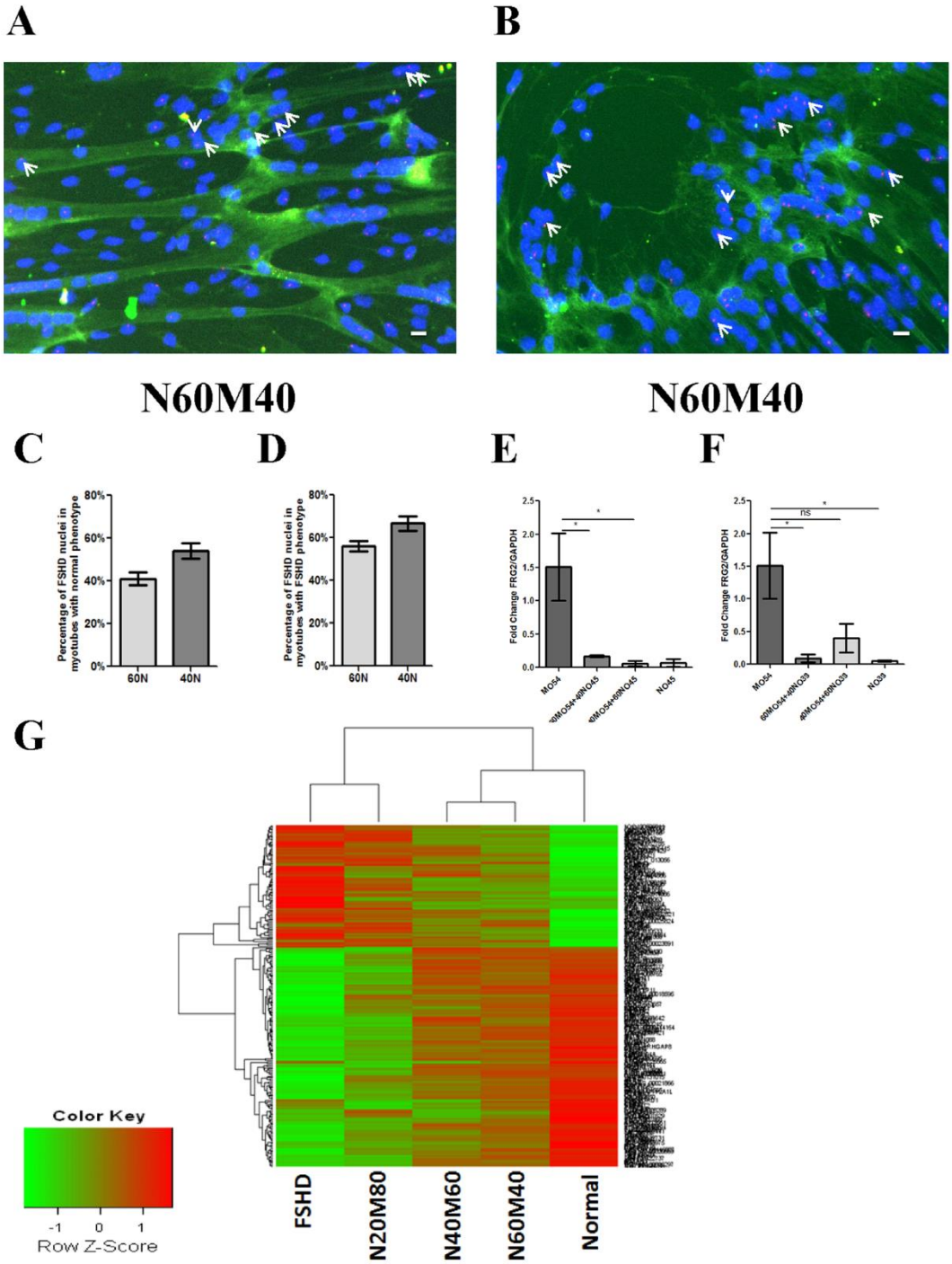


Fig. 2. Analysis of hybrid myotubes. The normal and FSHD myoblasts were mixed in a proportion of N60M40 and induced to differentiate. Both normal and disorganized myotubes could be observed in this condition. The myotubes were analyzed under a fluorescent microscope after the troponin T staining (green). The nuclei originating from the FSHD myoblasts were stained by the probe for Y chromosome (red); (A), hybrid myotubes with normal morphology have branched myotubes with aligned nuclei. (B) disorganized myotubes with abnormal nuclei repartition; bar = 10 μm; the nuclei originating from the FSHD myoblasts are indicated with arrows; (C and D), Quantification of the nuclei originating from the FSHD myoblasts in normal vs. disorganized myotubes. An average of 24 myotubes per condition was scored in three independent experiments. (E and F), Expression of a FSHD marker gene FRG2 in FSHD, hybrid, and normal myotubes. Error bars indicate standard deviation in three independent experiments. Statistical treatment of the data was performed using a two-sided Student's t-test. (G), This heat map of log ratios expression values (see color key) for genes upregulated or dowregulated >1.5-fold in FSHD myotubes shows that the majority of genes that were upregulated/downregulated in FSHD myotubes (red/green in first column) were downregulated/upregulated in control myotubes (green/red in the corresponding portion of the last column). A correction by dilution is observed in the hybrid myotubes for the majority of genes (in the second, third and fourth column).

This analysis confirms that the percentage of each type of nuclei per myotube is quite similar to theirproportion in the initial myoblast culture.

Transcription patterns in normal and FSHD myotubes

Beyond their simple morphological aspect, we then wished to analyze transcriptional profiles in myotubes derived from either normal or FSHD myoblasts. Agilent Human Genome 8 × 60Kv2 (design 039494) microarrays were used to identify differentially expressed genes as described in Materials and methods. Genes located on the X or Y chromosomes were not taken into consideration due to sex difference between normal and FSHD cells. Sixty-six genes were found to be significantly deregulated in FSHD as compared to control myotubes, of which14 were up-regulated and 52 down-regulated (abs(fold change) >2; adjusted *P*-value <0.001) in FSHD myotubes (Table 2). Interestingly, four genes had a role in muscle structure (*MYOZ2, LDB3, REEP1,* and *CACNA1H*), nine in muscle contraction (*AGT, CACNA1H, MYL10, SCAMP5, TUBB2B, SRL, STMN2, CKB,* and *HRC*), five in cell proliferation and differentiation (*AGT, ATP8A1, MGP, NDRG4,* and *CACNA1H*) and three genes were related to the cytoskeleton (*AQP1, EPB41L3,* and *MYL10*). The functional term most associated with genes upregulated in FSHD vs. normal myotubes was inflammation as already reported earlier by others (Winokur et al., 2003; Arashiro et al., 2009; Tsumagari et al., 2011; Geng et al., 2012). These genes included *TNFRSF11B, DDX58, SSC5D,* and *CXCL12*.

Having determined transcriptional profiles in myotubes produced with 100% normal or defective FSHD cells, we next carried out a similar analysis on hybrid myotubes formed from various combinations of normal (20, 40, and 60%) and FSHD-derived cells. As above with the morphological phenotypes, a clear tendency towards a normalized transcriptional profile was observed when the proportion of normal cells increased in the starting mixture of myoblasts (Table 2).

DUX4 is currently considered as the major FSHD gene, but detecting DUX4 is challenging due to its stochastic expression pattern and low transcription level. Only a small subset of nuclei produces the DUX4 mRNA in FSHD muscle cells (Snider et al., 2010; Tassin et al., 2013). Moreover, it was shown that DUX4 expression is dependent of culture conditions and detection strategies (Pandey et al., 2015) which make a reliable study of DUX4 expression even more challenging. Another FSHD candidate gene, FRG2, was shown to be transcriptionally upregulated in differentiating primary myoblast cultures of FSHD patients (Dmitriev et al., 2011a; Rijkers and Deidda, 2004), and it was demonstrated recently that DUX4 activates directly the FRG2 promoter which leads to its transcription in FSHD (Thijssen et al., 2014). Thus we chose to evaluate FRG2 expression as a direct sensor of DUX4 activity. This was made in hybrid myotubes (N40M60, N60M40) by reverse transcription-PCR using two different cell lines of normal myoblasts (NO39 and NO45). FRG2 expression decreased in hybrid myotubes with the increasing of normal myoblasts number initially cultured and approached to the FRG2 expression observed in normal myotubes (Fig. 2C). These results support the correction of hybrid myotubes on the functional level that we obtained in our transcriptome analysis.

Biological pathways affected in FSHD and hybrid myotubes

Using the KEGG pathways database (http://www.genome.jp/kegg/pathway.html), a total of 222 gene sets (pathways) has been investigated with a threshold value for significance set to 0.005 as described in Material and Methods. According to the LS/KS permutation tests, 39 pathways were found to be significantly deregulated in FSHD vs. normal myotubes (*P*-value <0.01) (Table 3). The deregulation of several of these pathways could affect the normal skeletal muscle development: the MAPK signaling pathway (here with 24 genes downregulated and 12 upregulated in FSHD myotubes); apoptosis (4 down-regulated, 9 upregulated), regulation of actin cytoskeleton (16 downregulated, 13 upregulated), RNA transport (5 down-regulated, 5 upregulated genes in FSHD vs. normal myotubes), RNA degradation (1 downregulated, 3 upregulated), the VEGF signaling pathway (4 downregulated, 2 upregulated) and the calcium signaling pathway (21 genes downregulated and 8 upregulated in FSHD vs. normal myotubes). In the table, the pathways represented in blue have more downregulated genes than upregulated, those in red have more upregulated genes and pathways in green have equal up and down regulated genes (abs(fold change) >1.5). Most of these pathways have already been described in FSHD: apoptosis (Kowaljow et al., 2007), oxidative phosphorylation (Turki et al., 2012), leukocyte transendothelial migration (Frisullo et al., 2011; Rahimov et al., 2012), regulation of actin cytoskeleton (Dmitriev et al., 2011b; Rahimov et al., 2012; Tassin et al., 2012), calcium signaling pathway (Rahimov et al., 2012), cardiac muscle contraction (Rahimov et al., 2012), and vascular smooth muscle creation (Osborne et al., 2007). Others have been reported to be associated to FSHD patients like hypertrophic cardiomyopathy (Tsuji et al., 2009) and cancer (Dmitriev et al., 2014). In hybrid myotubes, the number of affected pathways was reduced when the proportion of normal myoblasts increased in the initial cell culture, from 39 in 100% FSHD myotubes to five, two, and one in mixtures with 20%, 40%, and 60% normal myoblasts in the initial culture, respectively. Interestingly, the only FSHD-deregulated pathway that persisted in all combinations of hybrid myotubes was the "leukocyte transendothelial migration" pathway, a process active during inflammation. Together, the present results thus suggest that hybrid myotubes can be corrected at a functional level by increasing the number of normal vs. FSHD myoblasts at the initiation of the fusion and differentiation process.

To investigate if the dilution effect made by the normal mybolasts was applicable on all the genes expression, we have calculated the theoretical log ratios of 240 genes expression (abs(fold change) >1.5; adjusted *P*-value <0.001). The theoretical log ratios are the ones that should have been obtained if the correction was due just to a dilution in the hybrid myotubes of the three conditions (20%, 40%, and 60% of FSHD myoblasts). Comparing the experimental log ratios to the theoretical ones we found that the expression variation of the majority of the genes (206) correlates with the dilution effect while the expression of 34 genes does not (Fig. 2G).

Discussion

Numerous defects are observed in myotubes produced in vitro from 100% FSHD myoblasts. In this study, we have tested the feasibility of correcting these defects by incorporation of a proportion of normal myoblasts in the initial cell culture. We analyzed myotubes differentiated from these mixtures at both morphological and functional levels.

Morphological phenotypes were evaluated following troponin immunostaining based on previous reports describing clear-cut differences between myotubes whether produced from normal or FSHD myoblasts (Barro et al., 2010a). These differences are based upon whether nuclei are aligned or not in each myotube and on their strict morphological appearance. Distinguishing whether the nuclei in hybrid myotubes were derived from FSHD or normal myoblasts was easy using chromosome FISH staining for the Y chromosome as FSHD myoblasts were all isolated from men and normal myoblasts from women.

TABLE 2. Expression fold-changes of significantly deregulated genes in FSHD vs. normal and hybrid vs. normal myotubes.

Symbol	Chromosome	Fold-change (FSHD/Normal)	Fold-change (80FSHD/Normal)	Fold-change (60FSHD/Normal)	Fold-change (40FSHD/Normal)
MYOZ2	chr4	−2.00	−1.57	−1.30	−1.32
LDB3	chr10	−2.03	−1.46	−1.18	−1.20
NPVF	chr7	−2.05	−1.74	−1.25	−1.24
PIK3C2B	chr1	−2.05	−1.55	−1.37	−1.35
MLLT11	chr1	−2.08	−1.60	−1.33	−1.33
THBS4	chr5	−2.08	−1.39	−1.11	−1.18
PCDHB16	chr5	−2.08	−1.79	−1.38	−1.22
ATP8A1	chr4	−2.08	−1.28	−1.12	1.05
A_33_P3213561	chr15	−2.09	−1.75	−1.29	−1.30
RBM20	chr10	−2.09	−1.61	−1.15	−1.19
REEP1	chr2	−2.15	−1.77	−1.35	−1.35
AQP1	chr7	−2.17	−2.00	−1.69	−1.49
SH3BGR	chr21	−2.18	−1.50	−1.09	−1.14
ZG16B	chr16	−2.20	−1.45	−1.12	1.17
LOC339290	chr18	−2.23	−1.45	−1.47	−1.28
HRC	chr19	−2.24	−1.45	−1.27	−1.31
CTSH	chr15	−2.26	−1.62	−1.45	−1.46
XLOC_12_012925	chr6	−2.28	−1.48	−1.39	−1.20
FZD9	chr7	−2.33	−1.54	−1.50	−1.39
HTR3E	chr3	−2.36	−1.49	−1.15	−1.09
NUDT14	chr14	−2.37	−1.58	−1.45	−1.35
CKB	chr14	−2.39	−1.64	−1.50	−1.37
LPPR4	chr1	−2.41	−2.10	−1.66	−1.37
PIH1D1	chr19	−2.41	−1.73	−1.50	−1.16
LOC100505633	chr1	−2.47	−1.74	−1.41	−1.35
STMN2	chr8	−2.48	−2.64	−1.44	−1.43
RGS9	chr17	−2.50	−1.67	−1.47	−1.49
TMC6	chr17	−2.54	−1.84	−1.47	−1.31
SBSN	chr19	−2.61	−2.18	−1.44	−1.48
LOC100131138	chr12	−2.65	−2.09	−1.11	−1.16
SRL	chr16	−2.73	−2.17	−1.24	−1.09
LOC100287628	chr16	−2.75	−1.76	−1.23	1.04
HOXB13	chr17	−2.78	−1.83	−1.69	−1.40
TUBB2B	chr6	−2.88	−1.35	−1.29	−1.16
CELSR1	chr22	−2.90	−1.85	−1.68	−1.59
KIF1A	chr2	−2.92	−1.95	−1.77	−1.44
KISS1	chr1	−2.93	−1.95	−1.22	−1.05
WARS2	chr1	−3.02	−1.96	−1.57	−1.37
LOC100270746	chr6	−3.02	−1.82	−1.53	−1.41
STON1-GTF2A1L	chr2	−3.10	−2.43	−1.59	−1.48
QDPR	chr4	−3.15	−1.84	−1.33	−1.19
SCAMP5	chr15	−3.16	−2.18	−1.73	−1.48
EPB41L3	chr18	−3.25	−1.80	−1.46	−1.28
CACNA1H	chr16	−3.26	−2.19	−1.57	−1.31
TSPAN33	chr7	−3.27	−2.10	−1.43	−1.31
UCP2	chr11	−3.42	−2.44	−1.36	−1.23
NDRG4	chr16	−3.72	−1.81	−1.59	−1.37
MYL10	chr7	−4.01	−2.05	−1.28	−1.12
MYBPC2	chr19	−4.18	−2.01	−1.89	−1.55
MGP	chr12	−4.40	−1.69	−1.38	−1.09
AGT	chr1	−4.50	−2.24	−1.94	−1.61
LINC00162	chr21	−6.07	−3.12	−1.70	−1.35
UGT2B10	chr4	2.00	1.64	1.44	1.20
KIAA1462	chr10	2.02	1.35	1.22	1.12
CST6	chr11	2.02	1.37	1.36	1.32
AMIGO2	chr12	2.09	1.35	1.15	1.17
CBR3	chr21	2.13	1.51	1.52	1.35
ENOSF1	chr18	2.17	1.79	1.71	1.50
GRIA1	chr5	2.24	1.32	1.61	1.45
NTN1	chr17	2.28	1.57	1.50	1.25
CXCL12	chr10	2.28	1.39	1.63	1.30
LOC100507632	chr8	2.51	2.11	1.87	1.44
POU3F2	chr6	2.59	2.53	2.27	2.31
SSC5D	chr19	3.20	2.05	1.73	1.62
DDX58	chr9	3.53	2.96	2.22	1.91
TNFRSF11B	chr8	3.69	2.65	1.72	1.42

Underlined fold-changes represent those deemed significant.

A direct relationship was observed between the initial proportion of normal cells in the myoblast mix and the number of hybrid myotubes with a normal phenotype. We then investigated the feasibility of producing myotubes with a normal morphology from mixtures containing either 40 or 60% normal myoblasts. Higher percentages of normal myoblasts in the mixture were not further investigated based on the limited credibility of such an approach for therapeutical purposes. Symmetrically, we excluded mixtures with lower percentages of normal myoblasts from further investigation since the phenotype of the hyrid myotubes obtained from initial cultures with only 20% normal myoblasts exhibited a clear FSHD-like

TABLE 3. KEGG analysis of significantly deregulated pathways in 100% FSHD myotubes and increasing proportions of normal myoblasts in hybrid myotubes vs. myotubes derived from 100% normal myoblasts (blue, downregulated pathways, red, upregulated pathways and green, pathways containing both up and downregulated genes)

100% FSHD myoblasts	80% FSHD myoblasts	60% FSHD myoblasts	40% FSHD myoblasts
Leukocyte transendothelial migration	Leukocyte transendothelial migration	Leukocyte transendothelial migration	Leukocyte transendothelial migration
MAPK signaling pathway	MAPK signaling pathway		
Neurotrophin signaling pathway	Neurotrophin signaling pathway		
Calcium signaling pathway	Calcium signaling pathway		
Apoptosis	Apoptosis		
Endocytosis		Endocytosis	
Oxidative phosphorylation			
Ribosome			
Proteasome			
Phagosome			
Cardiac muscle contraction			
Focal adhesion			
Tight junction			
Regulation of actin cytoskeleton			
Alzheimer's disease			
Parkinson's disease			
Huntington's disease			
Pathways in cancer			
Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)			
Dilated cardiomyopathy			
Ubiquitin mediated proteolysis			
Protein processing in endoplasmic reticulum			
RNA transport			
Nicotinate and nicotinamide metabolism			
Gap junction			
Arginine and proline metabolism			
Pathogenic Escherichia coli infection			
RNA degradation			
Long-term potentiation			
Adherens junction			
Small cell lung cancer			
Lysosome			
GnRH signaling pathway			
Purine metabolism			
VEGF signaling pathway			
Citrate cycle (TCA cycle)			
Oocyte meiosis			
Viral myocarditis			
Cysteine and methionine metabolism			

phenotype. From the results here obtained, it appears that the presence of approximately 50% (or more) of normal myoblasts in the initial culture makes it possible to obtain differentiated hybrid myotubes most or all of which with a normal phenotype.

To analyze these hybrid myotubes at a functional level, we performed transcriptome analysis on normal, FSHD and hybrid myotubes. Comparing FSHD vs. normal myotubes revealed dozens of genes differentially expressed. Down-regulated genes such as *MYOZ2, LDB3, REEP1, AGT, SCAMP5, TUBB2B, SRL, STMN2, CKB, HRC, ATP8A1, MGP, NDRG4, CACNA1H, AQP1, EPB41L3,* and *MYL10* are implicated in muscle structure and contraction, in myoblast proliferation and differentiation and are related to cytoskeleton; *MYBPC2*, *THBS4,* and *RBM20* are implicated in cardiac development and contraction; upregulated genes are also implicated in inflammation (*TNFRSF11B, DDX58, SSC5D,* and *CXCL12);* the function of nine of these genes is not known yet (Table 2). The expression of these genes approaches to the normal expression with the increase in the number of normal myoblasts initially cultured.

Based on KEGG analysis, 39 pathways were found deregulated in FSHD vs. normal myotubes. Several of these pathways could result in impaired myogenesis and therefore be partly responsible for the muscular defects in FSHD patients. These included apoptosis, regulation of actin cytoskeleton, RNA transport, RNA degradation, the VEGF signaling and calcium signaling pathways. Among the genes that were deregulated in the MAPK signaling pathway we note p38 gene that have been described to affect the activities of transcription factors from the MyoD and MEF2 families and to contribute to the temporal expression of genes during differentiation (Keren et al., 2006).

It was striking to note that an increase in the proportion of normal myoblasts in the initial mixture with FSHD-derived myoblasts resulted in myotube transcriptomes revealing a progressively lower number of deregulated pathways. Indeed when 60% of the initial myoblasts were of normal origin, a single pathway remained deregulated, namely the Leukocyte transendothelial migration pathway. It has not escaped our attention that this pathway is closely associated with an active inflammatory process, a recognized hallmark in FSHD patients. Previous studies indicate that circulating activated immune cells, mainly CD8(+) T cells, may favor FSHD progression by promoting active phases of muscle inflammation (Frisullo et al., 2011).

To investigate the dilution effect made by the normal myoblasts we have studied the correlation between theoretical and experimental log ratios of genes expression. Although the majority of correlation coefficients are between 1 and 0.8, there are 34 genes with a value between 0.8 and 0.2. This result is a demonstration that the whole differential expression cannot be explained by a single linear dilution effect and is in part due to changes in genes expression that need to be investigated further.

Conclusions

In this report, we have demonstrated that it is possible to correct phenotypic and functional defects observed in myotubes derived from 100% FSHD myoblasts by incorporation of an equivalent proportion of normal myoblasts in the cell mixtures to undergo differentiation in vitro. This was true for functional as well as morphological characteristics. The questions remain, however, whether what can be obtained in vitro can also occur in vivo, and furthermore, whether reaching a proportion of 50% normal myoblasts in cellular therapy attempts in FSHD patients is possible with available techniques. Since there is no current therapy for FSHD, further studies and investigations are clearly warranted in order to obtain answers to these difficult questions.

Acknowledgements

This research was supported by the MEGAFSHD grant from the Association Française contre les Myopathies (AFM) to YSV.

Author's contributions

CD, YBS, GC, CR carried out the experiments; CD, PD, ML and PhD analyzed data; GC, DL contributed cell lines; CD, YBS, GC, CR, PD, PhD, DL, ML contributed to writing the paper; YV conceived, directed the study and participated in writing the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Literature Cited

Arashiro P, Eisenberg I, Kho AT, Cerqueira AM, Canovas M, Silva HC, Pavanello RC, Verjovski-Almeida S, Kunkel LM, Zatz M. 2009. Transcriptional regulation differs in affected facioscapulohumeral muscular dystrophy patients compared to asymptomatic related carriers. Proc Natl Acad Sci U S A 106:6220–6225.

Bareja A, Billin AN. 2013. Satellite cell therapy - from mice to men. Skelet Muscle 3:2.

Barro M, Carnac G, Flavier S, Mercier J, Vassetzky YS, Laoudj-Chenivesse D. 2010a. Primary myoblasts derived from the facioscapulohumeral dystrophy patients are hypersensitive to oxidative stress and show defects upon terminal differentiation. J Cell Mol Med 14:275–289.

Barro M, Carnac G, Flavier S, Mercier J, Vassetzky Y, Laoudj-Chenivesse D. 2010b. Myoblasts from affected and non-affected FSHD muscles exhibit morphological differentiation defects. J Cell Mol Med 14:275–289.

Cabianca DS, Casa V, Bodega B, Xynos A, Ginelli E, Tanaka Y, Gabellini D. 2012. A long ncRNA links copy number variation to a polycomb/trithorax epigenetic switch in FSHD muscular dystrophy. Cell 149:819–831.

Deenen JC, Arnts H, van der Maarel SM, Padberg GW, Verschuuren JJ, Bakker E, Weinreich SS, Verbeek AL, van Engelen BG. 2014. Population-based incidence and prevalence of facioscapulohumeral dystrophy. Neurology 83:1056–1059.

Dmitriev P, Petrov A, Ansseau E, Stankevicins L, Charron S, Kim E, Bos TJ, Robert T, Turki A, Coppée F, Belayew A, Lazar V, Carnac G, Laoudj D, Lipinski M, Vassetzky YS. 2011a. The Kruppel-like factor 15 as a molecular link between myogenic factors and a chromosome 4q transcriptional enhancer implicated in facioscapulohumeral dystrophy. J Biol Chem 286:44620–44631.

Dmitriev P, Barat A, Cochet E, Ogryzko V, Laoudj-Chenivesse D, Lipinski M, Vassetzky YS. 2011b. FSHD myoblasts fail to downregulate intermediate filament protein vimentin during myogenic differentiation. Biopolym Cell 27:359–363.

Dmitriev P, Barat A, Polesskaya A, O'Connell MJ, Robert T, Dessen P, Walsh TA, Lazar V, Turki A, Carnac G, et al. 2013. Simultaneous miRNA and mRNA transcriptome profiling of human myoblasts reveals a novel set of myogenic differentiation-associated miRNAs and their target genes. BMC Genomics 14:265.

Dmitriev P, Kairov U, Robert T, Barat A, Lazar V, Carnac G, Laoudj-Chenivesse D, Vassetzky YS. 2014. Cancer-related genes in the transcription signature of facioscapulohumeral dystrophy myoblasts and myotubes. J Cell Mol Med 18:208–217.

Frisullo G, Frusciante R, Nociti V, Tasca G, Renna R, Iorio R, Patanella AK, Iannaccone E, Marti A, Rossi M, et al. 2011. CD8(+) T cells in facioscapulohumeral muscular dystrophy patients with inflammatory features at muscle MRI. J Clin Immunol 31:155–166.

Gabellini D, Green MR, Tupler R. 2002. Inappropriate gene activation in FSHD: A repressor complex binds a chromosomal repeat deleted in dystrophic muscle. Cell 110:339–348.

Geng LN, Yao Z, Snider L, Fong AP, Cech JN, Young JM, van der Maarel SM, Ruzzo WL, Gentleman RC, Tawil R, et al. 2012. DUX4 activates germline genes, retroelements, and immune mediators: Implications for facioscapulohumeral dystrophy. Dev Cell 22:38–51.

Keren A, Tamir Y, Bengal E. 2006. The p38 MAPK signaling pathway: A major regulator of skeletal muscle development. Mol Cell Endocrinol 252:224–230.

Kisseljova NP, Dmitriev P, Katargin A, Kim E, Ezerina D, Markozashvili D, Malysheva D, Planche E, Lemmers RJ, van der Maarel SM, et al. 2014. DNA polymorphism and epigenetic marks modulate the affinity of a scaffold/matrix attachment region to the nuclear matrix. Eur J Hum Genet 22:1117–1123.

Kowaljow V, Marcowycz A, Ansseau E, Conde CB, Sauvage S, Matteotti C, Arias C, Corona ED, Nunez NG, Leo O, et al. 2007. The DUX4 gene at the FSHD1A locus encodes a pro-apoptotic protein. Neuromuscul Disord 17:611–623.

Masny PS, Chan OY, de Greef JC, Bengtsson U, Ehrlich M, Tawil R, Lock LF, Hewitt JE, Stocksdale J, Martin JH, et al. 2010. Analysis of allele-specific RNA transcription in FSHD by RNA-DNA FISH in single myonuclei. Eur J Hum Genet 18:448–456.

Osborne RJ, Welle S, Venance SL, Thornton CA, Tawil R. 2007. Expression profile of FSHD supports a link between retinal vasculopathy and muscular dystrophy. Neurology 68:569–577.

Petrov A, Pirozhkova I, Carnac G, Laoudj D, Lipinski M, Vassetzky YS. 2006. Chromatin loop domain organization within the 4q35 locus in facioscapulohumeral dystrophy patients versus normal human myoblasts. Procof Natl Acad Sci USA 103:6982–6987.

Petrov A, Allinne J, Pirozhkova I, Laoudj D, Lipinski M, Vassetzky YS. 2008. A nuclear matrix attachment site in the 4q35 locus has an enhancer-blocking activity in vivo: implications for the facio-scapulo-humeral dystrophy. Genome Res 18:39–45.

Rahimov F, King OD, Leung DG, Bibat GM, Emerson CP, Jr., Kunkel LM, Wagner KR. 2012. Transcriptional profiling in facioscapulohumeral muscular dystrophy to identify candidate biomarkers. Proc Natl Acad Sci USA 109:16234–16239.

Rijkers T, Deidda G, van Koningsbruggen S, van Geel M, Lemmers RJ, van Deutekom JC, Figlewicz D, Hewitt JE, Padberg GW, Frants RR, et al. 2004. FRG2, an FSHD candidate gene, is transcriptionally upregulated in differentiating primary myoblast cultures of FSHD patients. J Med Genet 41:826–836.

Snider L, Geng LN, Lemmers RJ, Kyba M, Ware CB, Nelson AM, Tawil R, Filippova GN, van der Maarel SM, Tapscott SJ, et al. 2010. Facioscapulohumeral dystrophy: Incomplete suppression of a retrotransposed gene. PLoS Genet 6:e1001181.

Tassin A, Leroy B, Laoudj-Chenivesse D, Wauters A, Vanderplanck C, Le Bihan MC, Coppee F, Wattiez R, Belayew A. 2012. FSHD myotubes with different phenotypes exhibit distinct proteomes. PLoS ONE 7:e51865.

Tassin A, Laoudj-Chenivesse D, Vanderplanck C, Barro M, Charron S, Ansseau E, Chen YW, Mercier J, Coppée F, Belayew A. 2013. DUX4 expression in FSHD muscle cells: How could such a rare protein cause a myopathy? J Cell Mol Med 17:76–89.
Tawil R, van der Maarel SM, Tapscott SJ. 2014. Facioscapulohumeral dystrophy: The path to consensus on pathophysiology. Skelet Muscle 4:12.
Thijssen PE, Balog J, Yao Z, Pham TP, Tawil R, Tapscott SJ, Van der Maarel SM. 2014. DUX4 promotes transcription of FRG2 by directly activating its promoter in facioscapulohumeral muscular dystrophy. Skelet Muscle 4:19.
Tsuji M, Kinoshita M, Imai Y, Kawamoto M, Kohara N. 2009. Facioscapulohumeral muscular dystrophy presenting with hypertrophic cardiomyopathy: A case study. Neuromuscul Disord 19:140–142.
Tsumagari K, Chang SC, Lacey M, Baribault C, Chittur SV, Sowden J, Tawil R, Crawford GE, Ehrlich M. 2011. Gene expression during normal and FSHD myogenesis. BMC Med Genomics 4:67.
Turki A, Hayot M, Carnac G, Pillard F, Passerieux E, Bommart S, De Mauverger ER, Hugon G, Pincemail J, Pietri S, et al. 2012. Functional muscle impairment in facioscapulohumeral muscular dystrophy is correlated with oxidative stress and mitochondrial dysfunction. Free Radic Biol Med 53:1068–1079.
Van Overveld PG, Lemmers RJ, Sandkuijl LA, Enthoven L, Winokur ST, Bakels F, Padberg GW, van Ommen GJ, Frants RR, van der Maarel SM. 2003. Hypomethylation of D4Z4 in 4q-linked and non-4q-linked facioscapulohumeral muscular dystrophy. Nat Genet 35:315–317.
Wijmenga C, Padberg GW, Moerer P, Wiegant J, Liem L, Brouwer OF, Milner EC, Weber JL, van Ommen GB, Sandkuyl LA, et al. 1991. Mapping of facioscapulohumeral muscular dystrophy gene to chromosome 4q35-qter by multipoint linkage analysis and in situ hybridization. Genomics 9:570–575.
Winokur ST, Chen YW, Masny PS, Martin JH, Ehmsen JT, Tapscott SJ, van der Maarel SM, Hayashi Y, Flanigan KM. 2003. Expression profiling of FSHD muscle supports a defect in specific stages of myogenic differentiation. Hum Mol Genet 12:2895–2907.
Yip DJ, Picketts DJ. 2003. Increasing D4Z4 repeat copy number compromises C2C12 myoblast differentiation. FEBS Lett 537:133–138.

ISSN 0233-7657
Biopolymers and Cell. 2016. Vol. 32. N 2. P 111–117
doi: http://dx.doi.org/10.7124/bc.000913

UDC 577

Uncoupling of oxidative phosphorylation and antioxidants affect fusion of primary human myoblasts *in vitro*

V. V. Zakharova[1,2,3], C. Dib[3], Y. Bou Saada[3], Y. S. Vassetzky[1,3], I. I. Galkin[1], B. V. Chernyak[1], E. N. Popova[1]

[1] A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, M. V. Lomonosov Moscow State University Vorobyevy gory, house 1, building 40, Moscow, Russian Federation, 119992

[2] Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, M. V. Lomonosov Moscow State University Vorobyevy gory, house 1, building 40, Moscow, Russian Federation, 119992

[3] CNRS UMR 8126, Universit Paris-Sud 11, Institut Gustave Roussy 114, rue Edouard Vaillant, Villejuif, France, 94805
k_popova_ch@mail.ru

Reactive oxygen species are at the origin of muscular fatigue and atrophy. They are also linked to muscular dystrophies, a group of human genetic diseases. Several studies point to the benefits of application of antioxidants and uncouplers of oxidative phosphorylation to improve the functional activity of normal and pathological muscles. Other studies point to potential dangers of these compounds. **Aim.** To study the effect of mitochondria-targeted antioxidants and uncouplers of oxidative phosphorylation on muscle differentiation. **Methods.** Muscle differentiation was induced by serum starvation and montored by troponin T stainig. **Results.** the mitochondria-targeted uncoupler of oxidative phosphorylation C_{12}TPP, but not the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1, inhibit fusion of primary myoblasts upon their differentiation, but do not affect the synthesis of troponin T, a protein marker of muscle differentiation. **Conclusion.** The effect of C_{12}TPP could be at least partially mediated by inhibition of reactive oxygen species (ROS) production since antioxidant N-acetylcysteine at high doses also inhibited differentiation of myoblasts.

K e y w o r d s: skeletal muscle, muscle differentiation, mitochondria-targeted antioxidants, uncouplers of oxidative phosphorylation

Introduction

Oxidative stress generated in human muscles increases fatigue and may even contribute to muscular atrophy (reviewed in [1]). In skeletal muscles, oxidative stress is produced in mitochondria and cytosol and expresses itself in a high level of reactive oxygen species (ROS), mostly originating from mitochondria (mtROS; reviewed in [2,3]). Oxidative stress, ROS and mtROS are linked to the pathological conditions such as muscular dystrophies, a group of heterogeneous human genetic diseases mostly affecting skeletal muscles. Indeed, oxidative stress was shown to play a role in the pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy (DMD) [4], facioscapulo-humeral dystrophy (FSHD) [5–7] and some other muscular dystrophies (reviewed in [8]).

During muscle repair and regeneration, satellite-derived $CD56^+$ myoblasts differentiate into myotubes. This process may be inhibited by high ROS levels, e.g. due to glutathione depletion [9]. The level of ROS may be reduced by both specific enzymes and low-molecular weight compounds, called antioxidants. ROS play an important role in

© 2016 V. V. Zakharova *et al.*; Published by the Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine on behalf of Biopolymers and Cell. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited

various cell processes such as proliferation and differentiation, in defense against infections. ROS may activate redox-sensitive transcription factors and cascades, in a number of cellular signaling systems (reviewed in [2]). At the same time, high ROS levels are detrimental for cells. Antioxidants are widely used as dietary supplements in treating muscular fatigue and atrophy [1], and they are currently studied as potential treatment of muscular dystrophies (Passerieux *et al.*, 2015; Turki *et al.*, 2012; Whitehead *et al.*, 2010) (reviewed in [8]). For example, N-acetylcysteine (NAC), a classical antioxidant was tested in the DMD murine model where it decreased inflammation and myonecrosis (de Senzi Moraes Pinto *et al.*, 2013). At the same time, it appears that ROS are required for muscle differentiation [11, 12]; therefore a complete ROS inhibition may be deleterious for successful muscle regeneration.

In the skeletal muscle, most of the ROS production occurs in mitochondria [13], e.g. during contraction [14], or in response to the external signals such as cytokines [15]. Thus, it would be tempting to use a class of antioxidants specifically targeted to mitochondria to improve the specificity and the impact of antioxidant action. The mitochondria-targeted antioxidants are a class of molecules combining lipophilic cations capable of penetrating through the mitochondrial membranes using the energy of the transmembrane potential (reviewed in [16]) with an antioxidant part. These molecules were successfully tested for their capacity to protect muscles from senescence [17] and immobilization-induced activation of muscle proteolysis [18]. Mitochondria-targeted peptide SS-31which protected mitochondria against an oxidative damage was shown to improve the skeletal muscle performance in aged mice [19]. At the same time, like general antioxidants, a negative effect of mitochondria-targeted compounds was observed: high doses of mitochondria-targeted antioxidants MitoQ and MitoTEMPOL (100 nM and 100 mM, respectively) were shown to repress the myotubes fusion in H9c2 transformed rat cardiac myoblasts [12].

Another class of mitochondria-targeted molecules includes uncouplers of oxidative phosphorylation. At low doses these molecules reduce the mtROS production by mildly decreasing the mitochondrial transmembrane potential without repressing ATP synthesis [20]. For example, 2,4-dinitrophenol (DNP) has multiple tissue-protective effects in different animal and *in vitro* models due to the suppression of oxidative stress [21]. Unfortunately, DNP has some toxic effects and a narrow window of therapeutic activity. The other possible therapeutic strategy exploiting the effect of mild uncoupling is based on the expression of the uncoupling protein specific for brown fat (UCP1); however, the overexpression of UCP1 in muscles led to a significant delay in the re-establishment of neuro-muscular junctions after injury exacerbated the pathology in amyotrophic lateral sclerosis animal model [22].

Recently, a new class of uncouplers, lipophilic cations, has been described. One of the representatives of this new generation of uncouplers, a lipophilic membrane-penetrating cation dodecyltriphenylphosphonium (C_{12}TPP), was found to uncouple oxidative phosphorylation *via* the stimulation of transmembrane cycling of endogenous free fatty acids [23]. Later the uncoupling effect of other lipophilic cations was described and some of them (derivatives of Rhodamine19) catalyzed the transmembrane transport of protons in the absence of free fatty acids due to the protonation/deprotonation reactions of the cation [24]. These compounds have a wider effective concentration range because of their self-limiting mechanism of uncoupling and their therapeutic effects were demonstrated in the animal models of ischemic brain [25,26] and kidney [25] injury. The effect of lipophilic cations has not been tested on muscles yet.

Here we analyzed the effect of different concentrations of the C_{12}TPP lipophilic cation on the differentiation of human $CD56^+$ primary myoblasts *in vitro* and compared it to the antioxidants: mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 and NAC (a general antioxidant).

Materials and Methods

Cell culture conditions and transfection. Primary myoblasts (a kind gift of Prof. Dalila Laoudj-Chenivesse) were isolated from skeletal muscle biopsies, purified using CD56/NCAM magnetic beads (Miltenyui Biotec) and cultured as described elsewhere [27].

Myogenic differentiation and myotubes quantification were carried out essentially as described in [28] Primary myoblasts were seeded at a low density and cultured in a proliferation medium, 10 ml of which supplemented or not with the indicated concentrations of antioxidants or uncouplers. 48 h later the cells were collected, washed and seeded in the 35 mm collagen-coated petri dishes at 80–100 % confluence. Myogenic differentiation was induced in the differentiation medium, supplemented or not with the indicated concentrations of antioxidants or uncouplers. The cells were kept 6 days under differentiation conditions and were then fixed and immuno-stained with anti-Troponin T primary antibody, as described below.

Analysis of myotube fusion. Fusion was analyzed after 6 days of differentiation using the Myotube Fusion Index (MFI) determined by dividing the number of nuclei in multi-nucleated myotubes by the total number of nuclei in a given microscopic field. Three fields per culture were counted using the ImageJ software.

Immunofluorescence staining and quantification. Differentiated myotubes were stained with mouse monoclonal anti-Troponin T (Sigma # T6277, 1:50) and observed under a fluorescent microscope as described elsewhere [28]. To create a full image of the specimen, the images of adjacent fields were stitched together using Cartograph software (Microvision).

Results and Discussion

Satellite-derived myoblasts from skeletal muscles differentiate into myotubes. This process is essential for the muscle repair and regeneration. The conflicting data exist about a role of oxidative stress in this process. ROS produced by NADPH oxidase are considered to be an essential signaling components for the embryonic cardiomyogenesis [29]. Scavenging of mtROS using mitochondria-targeted antioxidants (MitoQ and MitoTEMPOL) and mitochondria-targeted catalase prevents the murine the cardiac myoblasts differentiation (Lee *et al.*, 2011). On the other hand, a severe oxidative stress induced by glutathione depletion inhibits the differentiation of murine skeletal muscle cells [9]. Most of these studies were carried on the immortalized animal cells. We decided to test the effect of cationic mitochondria-targeted uncoupler of oxidative phosphorylation C_{12}TPP on the differentiation of primary human $CD56^+$ myoblasts and compare it to the effects of mitochondria-targeted and general antioxidants. The cells were isolated from the skeletal muscle biopsies of two different individuals and induced to differentiate *in vitro* using serum starvation as described elsewhere [30]. Different concentrations of C_{12}TPP, mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 or NAC, were added to myoblasts 48h prior to the onset of differentiation, then the same amount of the tested compound was added to the differentiation medium. The results of the differentiation were assayed 6 days after its onset.

The control non-treated cells produced the branched myotubes with bright troponin T staining (Figure 1A). Similar results were obtained with the cells, treated with 2–200 nM SkQ1, 2–20 nM C_{12}TPP and 1 mM NAC (Figure 1). In contrast, the myoblasts pre-treated with 200 nM C_{12}TPP and 5 mM NAC did not form prolonged myotubes, although the individual cells had a prolonged shape and demonstrated troponin T staining (Figure 1C, G).

Next we have determined the myotube fusion index (MFI) for all experimental conditions. This parameter was obtained by dividing the number of nuclei in multi-nucleated myotubes, containing more than 3 nuclei by the total number of nuclei. The MFI was 72 % for the control cells. In cells treated with 1 mM NAC and 200 nM SkQ1, the MFI slightly increased, although this was not statistically significant, in the cells treated with 5 mM NAC, the MFI was significantly lower than in the control cells,

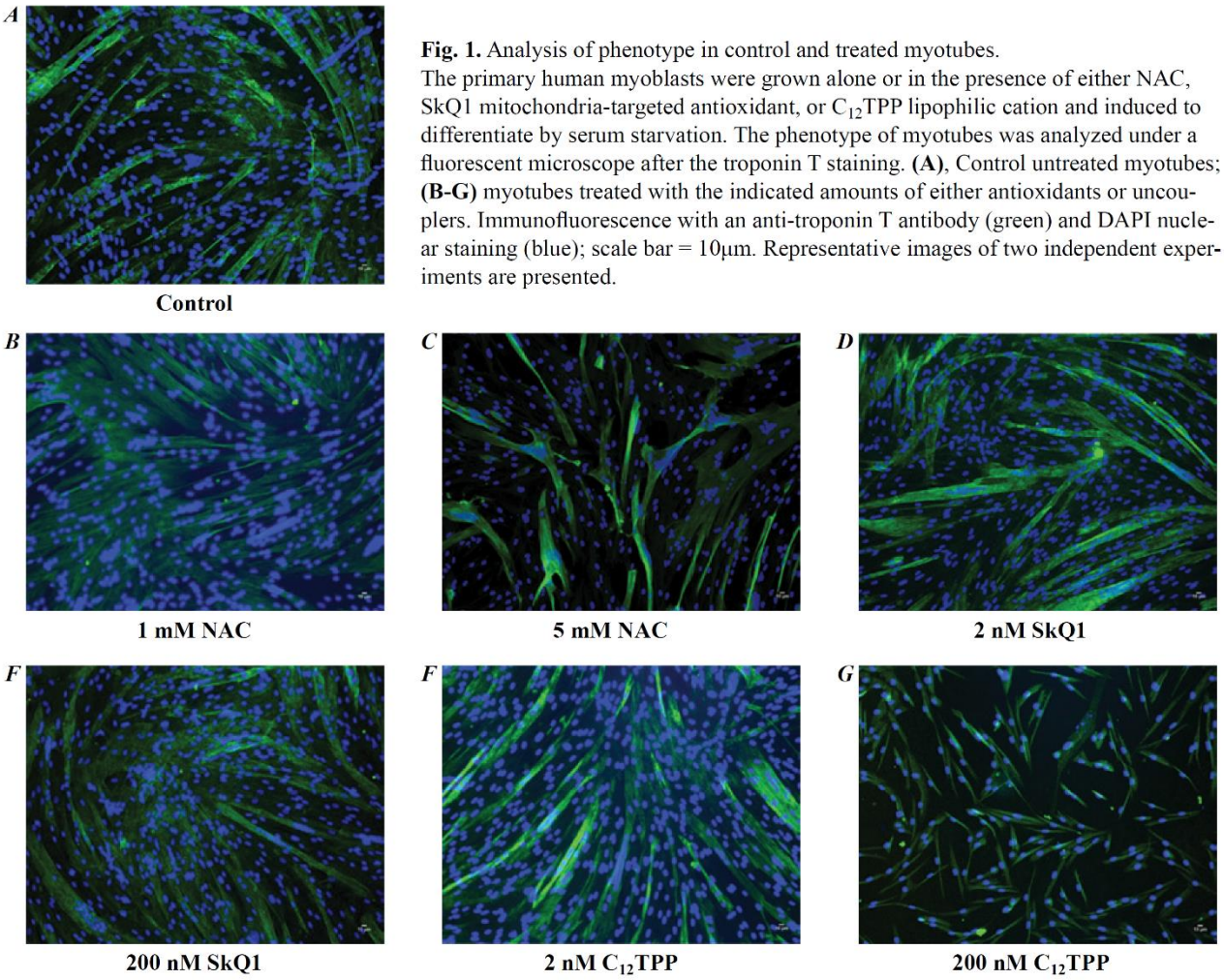


Fig. 1. Analysis of phenotype in control and treated myotubes.
The primary human myoblasts were grown alone or in the presence of either NAC, SkQ1 mitochondria-targeted antioxidant, or C_{12}TPP lipophilic cation and induced to differentiate by serum starvation. The phenotype of myotubes was analyzed under a fluorescent microscope after the troponin T staining. **(A)**, Control untreated myotubes; **(B-G)** myotubes treated with the indicated amounts of either antioxidants or uncouplers. Immunofluorescence with an anti-troponin T antibody (green) and DAPI nuclear staining (blue); scale bar = 10μm. Representative images of two independent experiments are presented.

21±10 %, and 200 nM and C_{12}TPP completely abolished cell fusion (Figure 2).

Thus, we have shown that C_{12}TPP lipophilic cation interferes with the human muscle differentiation by inhibiting the fusion of myoblasts into polynucleated myotubes at a concentration of 200 nM. The differentiation process is not completely inhibited, as the cells acquire an elongated shape (Figure 1G) and express troponin T, a marker of the muscular differentiation. Previously, the high doses of mitochondria-targeted antioxidants MitoQ and MitoTEMPOL (100 nM and 100 mM, respectively) were shown to repress the myotubes fusion in the H9c2 transformed rat cardiac myoblasts cell line [12]. We have next compared the effect of C_{12}TPP with that of NAC, the classical antioxidant and SkQ1, the mitochondria-targeted antioxidant whose lipophilic part is identical to that of C_{12}TPP [31].

The treatment of myoblasts with 5 mM NAC significantly inhibited the myoblast fusion while a lower dose of NAC (1 mM) did not affect the MFI. This raises the question of the safety of this compound, as the opposite effects can be obtained in a very small range of concentrations. Comparing the effects of C_{12}TPP and SkQ1, one can notice that their effects are similar at the concentration of 2–20 nM, but opposite at 200 nM. This may be due to the fact that the uncoupling effect of SkQ1 is significantly less pro-

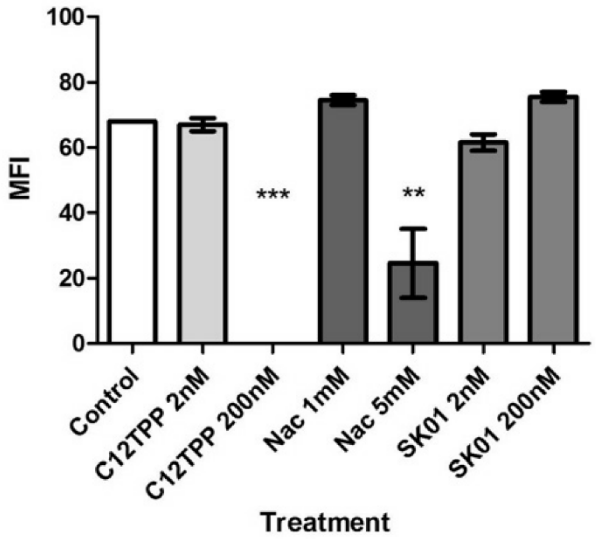


Fig. 2. Effect of antioxidants and uncouplers on the myoblast fusion index. MFI calculated by dividing the number of nuclei in multi-nucleated myotubes by the total number of nuclei in a given microscopic field. A minimum of 1000 nuclei per condition was scored in two independent experiments; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$.

nounced than that of C_{12}TPP, and its mitochondria-targeted antioxidant effect is not detrimental to the cell differentiation. Moreover, the mild uncoupling effect of C_{12}TPP may be also linked to the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) [32], an enzyme known to inhibit the differentiation of C2C12 myoblasts [33].

Another conclusion from this study concerns SkQ1. Its analog MitoQ was shown to repress differentiation of murine cardiac myoblasts cell lines at a concentration of 100 nM [12]. In our hands, a similar dose of SkQ1 did not affect the myoblast fusion, suggesting that SkQ1 has a better range of effective and safe concentrations as compared to MitoQ, although we cannot completely exclude that the differentiation of human myoblasts does not depend on mtROS as dramatically as in case of the murine cardiac myoblasts.

Acknowledgements

The primary human myoblasts were a kind gift of Prof. Dalila Laoudj-Chenivesse (Montpellier). This work was supported by Russian Scientific Foundation grant #14-24-00107 (SkQ1 studies) and Russian Foundation for Basic Research (16-04-0174A).

Funding

This work was supported by Russian Scientific Foundation (14-24-00107) and Russian Foundation for Basic Research (16-04-0174A).

REFERENCES

1. *Powers SK, Smuder AJ, Judge AR.* Oxidative stress and disuse muscle atrophy: cause or consequence? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2012;**15**(3):240–5.
2. *Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;**39**(1):44–84.
3. *Murphy MP.* How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 2009;**417**(1):1–13.
4. *Messina S, Altavilla D, Aguennouz M, Seminara P, Minutoli L, Monici MC, Bitto A, Mazzeo A, Marini H, Squadrito F, Vita G.* Lipid peroxidation inhibition blunts nuclear factor-kappaB activation, reduces skeletal muscle degeneration, and enhances muscle function in mdx mice. *Am J Pathol.* 2006;**168**(3):918–26.
5. *Bosnakovski D, Xu Z, Gang EJ, Galindo CL, Liu M, Simsek T, Garner HR, Agha-Mohammadi S, Tassin A, Coppée F, Belayew A, Perlingeiro RR, Kyba M.* An isogenetic myoblast expression screen identifies DUX4-mediated FSHD-associated molecular pathologies. *EMBO J.* 2008;**27**(20):2766–79.
6. *Turki A, Hayot M, Carnac G, Pillard F, Passerieux E, Bommart S, Raynaud de Mauverger E, Hugon G, Pincemail J, Pietri S, Lambert K, Belayew A, Vassetzky Y, Juntas Morales R, Mercier J, Laoudj-Chenivesse D.* Functional muscle impairment in facioscapulohumeral muscular dystrophy is correlated with oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Free Radic Biol Med.* 2012;**53**(5):1068–79.
7. *Passerieux E, Hayot M, Jaussent A, Carnac G, Gouzi F, Pillard F, Picot MC, Böcker K, Hugon G, Pincemail J, Defraigne JO, Verrips T, Mercier J, Laoudj-Chenivesse D.* Effects of vitamin C, vitamin E, zinc gluconate, and selenomethionine supplementation on muscle function and oxidative stress biomarkers in patients with facioscapulohumeral dystrophy: a double-blind randomized controlled clinical trial. *Free Radic Biol Med.* 2015;**81**:158–69.
8. *Canton M, Menazza S, Di Lisa F.* Oxidative stress in muscular dystrophy: from generic evidence to specific sources and targets. *J Muscle Res Cell Motil.* 2014;**35**(1):23–36.
9. *Ardite E, Barbera JA, Roca J, Fernández-Checa JC.* Glutathione depletion impairs myogenic differentiation of murine

skeletal muscle C2C12 cells through sustained NF-kappaB activation. *Am J Pathol.* 2004;**165**(3):719–28.
10. *Whitehead NP, Yeung EW, Froehner SC, Allen DG.* Skeletal muscle NADPH oxidase is increased and triggers stretch-induced damage in the mdx mouse. *PLoS One.* 2010;**5**(12): e15354.
11. *Lee KH, Kim DG, Shin NY, Song WK, Kwon H, Chung CH, Kang MS.* NF-kappaB-dependent expression of nitric oxide synthase is required for membrane fusion of chick embryonic myoblasts. *Biochem J.* 1997;**324** (Pt 1):237–42.
12. *Lee S, Tak E, Lee J, Rashid MA, Murphy MP, Ha J, Kim SS.* Mitochondrial H2O2 generated from electron transport chain complex I stimulates muscle differentiation. *Cell Res.* 2011;**21**(5):817–34.
13. *Koren A, Sauber C, Sentjurc M, Schara M.* Free radicals in tetanic activity of isolated skeletal muscle. *Comp Biochem Physiol B.* 1983;**74**(3):633–5.
14. *Jackson MJ, Pye D, Palomero J.* The production of reactive oxygen and nitrogen species by skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985).* 2007;**102**(4):1664–70.
15. *Langen RC, Van Der Velden JL, Schols AM, Kelders MC, Wouters EF, Janssen-Heininger YM.* Tumor necrosis factor-alpha inhibits myogenic differentiation through MyoD protein destabilization. *FASEB J.* 2004;**18**(2):227–37.
16. *Sheu SS, Nauduri D, Anders MW.* Targeting antioxidants to mitochondria: a new therapeutic direction. *Biochim Biophys Acta.* 2006;**1762**(2):256–65.
17. *Mistry Y, Poolman T, Williams B, Herbert KE.* A role for mitochondrial oxidants in stress-induced premature senescence of human vascular smooth muscle cells. *Redox Biol.* 2013;**1**:411–7.
18. *Talbert EE, Smuder AJ, Min K, Kwon OS, Szeto HH, Powers SK.* Immobilization-induced activation of key proteolytic systems in skeletal muscles is prevented by a mitochondria-targeted antioxidant. *J Appl Physiol (1985).* 2013; **115**(4):529–38.
19. *Siegel MP, Kruse SE, Percival JM, Goh J, White CC, Hopkins HC, Kavanagh TJ, Szeto HH, Rabinovitch PS, Marcinek DJ.* Mitochondrial-targeted peptide rapidly improves mitochondrial energetics and skeletal muscle performance in aged mice. *Aging Cell.* 2013;**12**(5):763–71.
20. *Cunha FM, Caldeira da Silva CC, Cerqueira FM, Kowaltowski AJ.* Mild mitochondrial uncoupling as a therapeutic strategy. *Curr Drug Targets.* 2011;**12**(6):783–9.
21. *Caldeira da Silva CC, Cerqueira FM, Barbosa LF, Medeiros MH, Kowaltowski AJ.* Mild mitochondrial uncoupling in mice affects energy metabolism, redox balance and longevity. *Aging Cell.* 2008;**7**(4):552–60.
22. *Dupuis L, Gonzalez de Aguilar JL, Echaniz-Laguna A, Eschbach J, Rene F, Oudart H, Halter B, Huze C, Schaeffer L, Bouillaud F, Loeffler JP.* Muscle mitochondrial uncoupling dismantles neuromuscular junction and triggers distal degeneration of motor neurons. *PLoS One.* 2009;**4**(4):e5390.
23. *Severin FF, Severina II, Antonenko YN, Rokitskaya TI, Cherepanov DA, Mokhova EN, Vyssokikh MY, Pustovidko AV, Markova OV, Yaguzhinsky LS, Korshunova GA, Sumbatyan NV, Skulachev MV, Skulachev VP.* Penetrating cation/fatty acid anion pair as a mitochondria-targeted protonophore. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;**107**(2):663–8.
24. *Antonenko YN, Avetisyan AV, Cherepanov DA, Knorre DA, Korshunova GA, Markova OV, Ojovan SM, Perevoshchikova IV, Pustovidko AV, Rokitskaya TI, Severina II, Simonyan RA, Smirnova EA, Sobko AA, Sumbatyan NV, Severin FF, Skulachev VP.* Derivatives of rhodamine 19 as mild mitochondria-targeted cationic uncouplers. *J Biol Chem.* 2011;**286**(20):17831–40.
25. *Plotnikov EY, Silachev DN, Jankauskas SS, Rokitskaya TI, Chupyrkina AA, Pevzner IB, Zorova LD, Isaev NK, Antonenko YN, Skulachev VP, Zorov DB.* Mild uncoupling of respiration and phosphorylation as a mechanism providing nephro- and neuroprotective effects of penetrating cations of the SkQ family. *Biochemistry (Mosc).* 2012;**77**(9):1029–37.
26. *Khailova LS, Silachev DN, Rokitskaya TI, Avetisyan AV, Lyamsaev KG, Severina II, Il'yasova TM, Gulyaev MV, Dedukhova VI, Trendeleva TA, Plotnikov EY, Zvyagilskaya RA, Chernyak BV, Zorov DB, Antonenko YN, Skulachev VP.* A short-chain alkyl derivative of Rhodamine 19 acts as a mild uncoupler of mitochondria and a neuroprotector. *Biochim Biophys Acta.* 2014;**1837**(10):1739–47.
27. *Barro M, Carnac G, Flavier S, Mercier J, Vassetzky Y, Laoudj-Chenivesse D.* Myoblasts from affected and non-affected FSHD muscles exhibit morphological differentiation defects. *J Cell Mol Med.* 2010;**14**(1–2):275–89.
28. *Dib C, Bou Saada Y, Dmitriev P, Richon C, Dessen P, Laoudj-Chenivesse D, Carnac G, Lipinski M, Vassetzky YS.* Correction of the FSHD myoblast differentiation defect by fusion with healthy myoblasts. *J Cell Physiol.* 2016;**231**(1): 62–71.
29. *Buggisch M, Ateghang B, Ruhe C, Strobel C, Lange S, Wartenberg M, Sauer H.* Stimulation of ES-cell-derived cardiomyogenesis and neonatal cardiac cell proliferation by reactive oxygen species and NADPH oxidase. *J Cell Sci.* 2007;**120**(Pt 5):885–94.
30. *Dmitriev P, Barat A, Polesskaya A, O'Connell MJ, Robert T, Dessen P, Walsh TA, Lazar V, Turki A, Carnac G, Laoudj-Chenivesse D, Lipinski M, Vassetzky YS.* Simultaneous miRNA and mRNA transcriptome profiling of human myoblasts reveals a novel set of myogenic differentiation-associated miRNAs and their target genes. *BMC Genomics.* 2013;**14**:265.
31. *Antonenko YN, Avetisyan AV, Bakeeva LE, Chernyak BV, Chertkov VA, Domnina LV, Ivanova OY, Izyumov DS, Khailova LS, Klishin SS, Korshunova GA, Lyamzaev KG, Muntyan MS, Nepryakhina OK, Pashkovskaya AA, Pletjushkina OY, Pustovidko AV, Roginsky VA, Rokitskaya TI, Ruuge EK, Saprunova VB, Severina II, Simonyan RA, Sku-*

lachev IV, Skulachev MV, Sumbatyan NV, Sviryaeva IV, Tashlitsky VN, Vassiliev JM, Vyssokikh MY, Yaguzhinsky LS, Zamyatnin AA Jr, Skulachev VP. Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 1. Cationic plastoquinone derivatives: synthesis and in vitro studies. *Biochemistry (Mosc)*. 2008 Dec;**73**(12):1273–87.

32. *Apostolova N, Victor VM.* Molecular strategies for targeting antioxidants to mitochondria: therapeutic implications. *Antioxid Redox Signal.* 2015;**22**(8):686–729.
33. *Williamson DL, Butler DC, Alway SE.* AMPK inhibits myoblast differentiation through a PGC-1alpha-dependent mechanism. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;**297**(2): E304–14.

Роз'єднання окисного фосфорилювання і антиоксидантів впливають на злиття первинних людських міобластів in vitro

В. В. Захарова, К. Діб, Я. Б Саада, Е. С. Васецкий, І. І. Галкін, Б. В. Черняк, Є. М. Попова

Активні форми кисню (АФК) можуть викликати м'язову втому і атрофію м'язів. АФК також пов'язані з м'язовими дистрофії. Безліч досліджень вказує на позитивний вплив антиоксидантів і разобщітелей окисного фосфорилювання на функціональну активність м'язів в нормі та патології. **Мета.** Вивчити вплив мітохондріальної-спрямованих антиоксидантів і разобщітелей окисного фосфорилювання на диференціювання первинних міобластів людини. **Методи.** М'язове діфеернціювання викликали інкубацією міобластів в середовищі з низькою концентрацію сироватки. Міотрубочкі детектували антитілами до тропоніну Т. **Результати.** мітохондріальної-спрямований разобщитель окисного фосфорилювання C_{12}TPP, але не мітохондріальної-спрямований антиоксидант SkQ1, пригнічує злиття міобластів при диференціюванні, при цьому не впливаючи на експресію тропонина Т, білкового маркера м'язової диференціювання. **Висновки.** Вплив C_{12}TPP може бути частково викликано пригніченням АФК, так як високі концентрації класичного антиоксиданту N-ацетилцистеїну також інгібували диференціювання міобластів людини.

Ключові слова: скелетні м'язи, м'язове диференціювання, мітохондріально-спрямовані антиоксиданти, роз'єднувачі окисного фосфорилювання.

Разобщение окислительного фосфорилирования и антиоксидантов влияют на слияние первичных человеческих миобластов в пробирке

В. В. Захарова, К. Диб, Я. Б Саада, Е. С. Васецкий, И. И. Галкин, Б. В. Черняк, Е. Н. Попова

Активные формы кислорода (АФК) могут вызывать мышечную усталость и атрофию мышц. АФК также связаны с мышечными дистрофиями. Множество исследований указывает на положительное влияние антиоксидантов и разобщителей окислительного фосфорилирования на функциональную активность мышц в норме и патологии. **Цель.** Изучить влияние митохондриально-направленных антиоксидантов и разобщителей окислительного фосфорилирования на дифференцировку первичных миобластов человека. **Методы:** Мышечную дифеернцировку вызывали инкубацией миобластов в среде, содержащей низкую концентрацию сыворотки. Миотрубочки окрашивакли антителми к Тропонину Т. **Результаты.** митохондриально-направленный разобщитель окислительного фосфорилирования C_{12}TPP, но не митохондриально-направленный антиоксидант SkQ1, ингибирует слияние миобластов при дифференцировке, при этом не влияя на экспрессию тропонина Т, белкового маркера мышечной дифференцировки. **Выводы:** Влияние C_{12}TPP может быть частично вызвано ингибированием АФК, так как высокие концентрации классического антиоксиданта N-ацетилцистеина также ингибировали дифференцировку миобластов человека.

Ключевые слова: Скелетные мышцы, мышечная дифференцировка, митохондриально-направленные антиоксиданты, разобщители окислительного фосфорилирования.

Received 14.02.2016

Références

Almeida, K.H. & Sobol, R.W., 2007. A unified view of base excision repair: Lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. *DNA Repair*, 6(6), pp.695–711.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K. & Hagen, T.M., 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(17), pp.7915–7922.

Ansseau, E. et al., 2009. DUX4c Is Up-Regulated in FSHD. It Induces the MYF5 Protein and Human Myoblast Proliferation. *PLoS ONE*, 4(10).

Ansseau, E. et al., 2016. Homologous transcription factors DUX4 and DUX4c associate with cytoplasmic proteins during muscle differentiation. *PLoS ONE*, 11(1).

Arashiro, P. et al., 2009. Transcriptional regulation differs in affected facioscapulohumeral muscular dystrophy patients compared to asymptomatic related carriers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(15), pp.6220–6225. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19339494.

Ariyoshi, K. et al., 2007. Increased chromosome instability and accumulation of DNA double-strand breaks in Werner syndrome cells. *Journal of radiation research*, 48(3), pp.219–231.

Azqueta, A. et al., 2014. Comet assay to measure DNA repair: approach and applications. *Frontiers in genetics*, 5(August), p.288. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4142706&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Bakay, M. et al., 2006. Nuclear envelope dystrophies show a transcriptional fingerprint suggesting disruption of Rb-MyoD pathways in muscle regeneration. *Brain*, 129(4), pp.996–1013.

Bakker, E. et al., 1996. Diagnostic, predictive, and prenatal testing for facioscapulohumeral muscular dystrophy: diagnostic approach for sporadic and familial cases. *Journal of medical genetics*, 33(1), pp.29–35.

Bakker, E. et al., 1995. The FSHD-linked locus D4F104S1 (p13E-11) on 4q35 has a homologue on 10qter. *Muscle & nerve*, 2, pp.S39–S44.

Barro, M. et al., 2010. Myoblasts from affected and non-affected FSHD muscles exhibit morphological differentiation defects. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(1–2), pp.275–289.

Barton-Davis, E.R. et al., 1998. Viral mediated expression of insulin-like growth factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(26), pp.15603–15607.

Beckman, K.B. & Ames, B.N., 1997. Oxidative decay of DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 272(32), pp.19633–19636.

Bedard, K. & Krause, K.-H., 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*, 87(1), pp.245–313. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17237347.

Berger, F. et al., 2013. The impact of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in OGG1 and XPC on the age at onset of Huntington disease. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 755(2), pp.115–119.

Bergstrom, D.A. et al., 2002. Promoter-specific regulation of MyoD binding and signal transduction cooperate to pattern gene expression. *Molecular Cell*, 9(3), pp.587–600.

Bernstein, C. et al., 2002. DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: Fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 511(2), pp.145–178.

Best, B.P., 2009. Nuclear DNA damage as a direct cause of aging. *Rejuvenation research*, 12(3), pp.199–208. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19594328.

Blewitt, M.E. et al., 2008. SmcHD1, containing a structural-maintenance-of-chromosomes hinge domain, has a critical role in X inactivation. *Nature genetics*, 40(5), pp.663–669.

Block, G.J. et al., 2013. Wnt/??-catenin signaling suppresses DUX4 expression and prevents apoptosis of FSHD muscle cells. *Human Molecular Genetics*, 22(23), pp.4661–4672.

Bodega, B. et al., 2009. Remodeling of the chromatin structure of the facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) locus and upregulation of FSHD-related gene 1 (FRG1) expression during human myogenic differentiation. *BMC Biol*, 7, p.41. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19607661.

De Bont, R. & van Larebeke, N., 2004. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis*, 19(3), pp.169–185. Available at:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15123782.

Bosnakovski, D., Xu, Z., et al., 2008. An isogenetic myoblast expression screen identifies DUX4-mediated FSHD-associated molecular pathologies. *The EMBO journal*, 27(20), pp.2766–79. Available at: http://emboj.embopress.org/content/27/20/2766.abstract.

Bosnakovski, D., Lamb, S., et al., 2008. DUX4c, an FSHD candidate gene, interferes with myogenic regulators and abolishes myoblast differentiation. *Experimental Neurology*, 214(1), pp.87–96.

Bou Saada, Y. et al., 2016. Facioscapulohumeral dystrophy myoblasts efficiently repair moderate levels of oxidative DNA damage. *Histochemistry and Cell Biology*, 145(4), pp.475–483.

Boxer, L.M. & Dang, C. V, 2001. Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene*, 20(40), pp.5595–5610.

Breen, A.P. & Murphy, J.A., 1995. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(6), pp.1033–1077.

Bruce, H. a et al., 2009. Long tandem repeats as a form of genomic copy number variation: structure and length polymorphism of a chromosome 5p repeat in control and schizophrenia populations. *Psychiatric genetics*, 19(2), pp.64–71. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19672138.

Buckingham, M. & Relaix, F., 2007. The role of Pax genes in the development of tissues and organs: Pax3 and Pax7 regulate muscle progenitor cell functions. *Annual review of cell and developmental biology*, 23, pp.645–73. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17506689.

Burdi, R. et al., 2009. Multiple pathological events in exercised dystrophic mdx mice are targeted by pentoxifylline: outcome of a large array of in vivo and ex vivo tests. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 106, pp.1311–1324.

Cacurri, S. et al., 1998. Sequence homology between 4qter and 10qter loci facilitates the instability of subtelomeric KpnI repeat units implicated in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Am J Hum Genet*, 63(1), pp.181–190. Available at: http://ac.els-cdn.com/S0002929707607460/1-s2.0-S0002929707607460-main.pdf?_tid=f4afdcea-b5a3-11e3-9e0a-00000aacb35e&acdnat=1395920334_06b5115dcb00c29f0f3102d412919775.

Callegari, A.J.J., Kelly, T.J.T.J. & others, 2007. Shedding light on the DNA damage checkpoint. *CELL CYCLE-LANDES BIOSCIENCE-*, 6(6), p.660. Available at: http://www.kelly-landes.org/journals/cc/callegariCC6-6.pdf\nhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17387276.

Camozzi, D. et al., 2014. Diverse lamin-dependent mechanisms interact to control chromatin dynamics: Focus on laminopathies. *Nucleus (Austin, Tex.)*, 5(5), pp.1–14.

Capell, B.C. & Collins, F.S., 2006. Human laminopathies: nuclei gone genetically awry. *Nat Rev Genet*, 7(12), pp.940–952. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17139325.

Carr, a & Frei, B., 1999. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13(9), pp.1007–24. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10336883.

Caruso, N. et al., 2013. Deregulation of the Protocadherin Gene FAT1 Alters Muscle Shapes: Implications for the Pathogenesis of Facioscapulohumeral Dystrophy. *PLoS Genetics*, 9(6).

Catani, M.V. et al., 2004. Nuclear factor ??B and activating protein 1 are involved in differentiation-related resistance to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(7), pp.1024–1036.

Celegato, B. et al., 2006. Parallel protein and transcript profiles of FSHD patient muscles correlate to the D4Z4 arrangement and reveal a common impairment of slow to fast fibre differentiation and a general deregulation of MyoD-dependent genes. *Proteomics*, 6(19), pp.5303–5321. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17013991.

Cheli, S. et al., 2011. Expression profiling of FSHD-1 and FSHD-2 cells during myogenic differentiation evidences common and distinctive gene dysregulation patterns. *PLoS One*, 6(6), p.e20966. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21695143.

Choi, C.S. et al., 2008. Paradoxical effects of increased expression of PGC-1alpha on muscle mitochondrial function and insulin-stimulated muscle glucose metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(50), pp.19926–19931. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19066218.

Circu, M.L. & Aw, T.Y., 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free*

Radical Biology and Medicine, 48(6), pp.749–762.

Clapp, J. et al., 2007. Evolutionary conservation of a coding function for D4Z4, the tandem DNA repeat mutated in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Am J Hum Genet*, 81(2), pp.264–279. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17668377.

Colangelo, V. et al., 2014. Next-generation sequencing analysis of miRNA expression in control and FSHD myogenesis. *PloS one*, 9(10), p.e108411. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4186784&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Collins, A.R., 2004. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol*, 26(3), pp.249–261. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15004294.

Collins, C.A. & Partridge, T.A., 2005. Self-renewal of the adult skeletal muscle satellite cell. *Cell Cycle*, 4(10), pp.1338–1341. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16177569.

Cong, L. et al., 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), pp.819–823. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23287718.

Corona, E.D. et al., 2013. Multiple Protein Domains Contribute to Nuclear Import and Cell Toxicity of DUX4, a Candidate Pathogenic Protein for Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy. *PLoS ONE*, 8(10).

Cossu, G. & Bianco, P., 2003. Mesoangioblasts - Vascular progenitors for extravascular mesodermal tissues. *Current Opinion in Genetics and Development*, 13(5), pp.537–542.

Cossu, G. & Borello, U., 1999. Wnt signaling and the activation of myogenesis in mammals. *The EMBO journal*, 18(24), pp.6867–6872.

Coulton, G.R. et al., 1992. In situ localisation of single-stranded DNA breaks in nuclei of a subpopulation of cells within regenerating skeletal muscle of the dystrophic mdx mouse. *Journal of Cell Science*, 102 (Pt 3, pp.653–662. Available at: http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=1324249&retmode=ref&cmd=prlinks\npapers2://publication/uuid/ECB2AE44-AD21-4210-AFE7-C1AA054B47F8.

Crompton, M., 1999. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *The*

Biochemical journal, 341 (Pt 2, pp.233–249. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21081127.

Culotta, V.C., Yang, M. & O'Halloran, T. V., 2006. Activation of superoxide dismutases: Putting the metal to the pedal. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1763(7), pp.747–758.

D'Angelo, M.G. et al., 2011. Respiratory pattern in an adult population of dystrophic patients. In *Journal of the Neurological Sciences*. pp. 54–61.

Dandapat, A. et al., 2014. Dominant Lethal Pathologies in Male Mice Engineered to Contain an X-Linked DUX4 Transgene. *Cell Reports*, 8(5), pp.1484–1496.

Dawson, B.A. & Lough, J., 1988. Immunocytochemical localization of transient DNA strand breaks in differentiating myotubes using in situ nick-translation. *Developmental Biology*, 127(2), pp.362–367.

Deak, K.L. et al., 2007. Genotype-phenotype study in an FSHD family with a proximal deletion encompassing p13E-11 and D4Z4. *Neurology*, 68(8), pp.578–582.

Deenen, J.C. et al., 2014. Population-based incidence and prevalence of facioscapulohumeral dystrophy. *Neurology*, 83(12), pp.1056–1059. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25122204.

Degan, P. et al., 1995. In vivo accumulation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA correlates with release of reactive oxygen species in Fanconi's anaemia families. *Carcinogenesis*, 16(4), pp.735–741. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7728950.

Deidda, G. et al., 1996. Direct detection of 4q35 rearrangements implicated in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). *Journal of medical genetics*, 33(5), pp.361–365.

Deidda, G. et al., 1995. Physical mapping evidence for a duplicated region on chromosome 10qter showing high homology with the facioscapulohumeral muscular dystrophy locus on chromosome 4qter. *European Journal of Human Genetics*, 3(3), pp.155–167.

Demple, B. & Harrison, L., 1994. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annual review of biochemistry*, 63, pp.915–948.

van Deutekom, J.C. et al., 1996. Evidence for subtelomeric exchange of 3.3 kb tandemly repeated

units between chromosomes 4q35 and 10q26: implications for genetic counselling and etiology of FSHD1. *Hum Mol Genet*, 5(12), pp.1997–2003. Available at: http://hmg.oxfordjournals.org/content/5/12/1997.full.pdf.

van Deutekom, J.C. et al., 1993. FSHD associated DNA rearrangements are due to deletions of integral copies of a 3.2 kb tandemly repeated unit. *Human molecular genetics*, 2(12), pp.2037–2042.

Van Deutekom, J.C.T. et al., 1996. Identification of the first gene (FRG1) from the FSHD region on human chromosome 4q35. *Human Molecular Genetics*, 5(5), pp.581–590.

Dib, C. et al., 2015. Correction of the FSHD Myoblast Differentiation Defect by Fusion With Healthy Myoblasts. *J Cell Physiol*. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26218298.

Dib, C. et al., 2016. Correction of the FSHD myoblast differentiation defect by fusion with healthy myoblasts. *Journal of Cellular Physiology*, 231(1), pp.62–71.

Ding, H. et al., 1998. Characterization of a double homeodomain protein (DUX1) encoded by a cDNA homologous to 3.3 kb dispersed repeated elements. *Human Molecular Genetics*, 7(11), pp.1681–1694.

Dixit, M. et al., 2007. DUX4, a candidate gene of facioscapulohumeral muscular dystrophy, encodes a transcriptional activator of PITX1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(46), pp.18157–18162. Available at: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0708659104.

Dixit, M. et al., 2007. DUX4, a candidate gene of facioscapulohumeral muscular dystrophy, encodes a transcriptional activator of PITX1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(46), pp.18157–18162. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17984056.

Dmitriev, P. et al., 2013. Defective regulation of microRNA target genes in myoblasts from facioscapulohumeral dystrophy patients. *J Biol Chem*, 288(49), pp.34989–35002. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24145033.

Dmitriev, P., Petrov, A., Ansseau, E., Stankevicins, L., et al., 2011. The Kruppel-like factor 15 as a molecular link between myogenic factors and a chromosome 4q transcriptional enhancer implicated in facioscapulohumeral dystrophy. *J Biol Chem*, 286(52), pp.44620–44631. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21937448.

Dmitriev, P., Petrov, A., Ansseau, E., Charron, S., et al., 2011. The Krüppel-like factor KLF15 is a key actor in upregulation of the 4q35 genes DUX4c and FRG2 in FSHD muscles, . *J. Biol. Chem.*, in press, p.DOI:10.1074/jbc.M111.254052.

Dmitriev, P., Lipinski, M. & Vassetzky, Y.S., 2009. Pearls in the junk: Dissecting the molecular pathogenesis of facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders*, 19(1), pp.17–20.

Doerner, A. et al., 1997. Tissue-specific transcription pattern of the adenine nucleotide translocase isoforms in humans. *FEBS Letters*, 414(2), pp.258–262.

Dorchies, O.M. et al., 2006. Green tea extract and its major polyphenol (-)-epigallocatechin gallate improve muscle function in a mouse model for Duchenne muscular dystrophy. *American journal of physiology. Cell physiology*, 290(2), pp.C616-25. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16403950.

Duchenne, G.B., 1868. Recherches sur la paralysie musculaire pseudohypertrophique ou paralysie myo-sclerosique. *Arch Gen Med*, 11, pp.179–209.

El-Agamey, A. et al., 2004. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 430(1), pp.37–48.

Emery, A.E.H., 2002. The muscular dystrophies. *Lancet*, 359(9307), pp.687–95. Available at: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673602078157.

Epe, B., 2002. Role of endogenous oxidative DNA damage in carcinogenesis: What can we learn from repair-deficient mice? *Biological Chemistry*, 383(3–4), pp.467–475.

Erb, W.H., 1884. Uber die “juvenile Form” der progressiven Muskelatrophie und ihre Beziehungen zur sogennanten Pseudohypertrophie der Muskeln. *Dt Arch Klin Med*, 34, pp.467–519.

Fanzani, A. et al., 2013. Muscular dystrophies share pathogenetic mechanisms with muscle sarcomas. *Trends Mol Med*, 19(9), pp.546–554. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23890422.

Faulkner, G.J. et al., 2009. The regulated retrotransposon transcriptome of mammalian cells. *Nature genetics*, 41(5), pp.563–71. Available at: http://dx.doi.org/10.1038/ng.368.

Feng, Z. et al., 2006. Cutting edge: human beta defensin 3--a novel antagonist of the HIV-1 coreceptor

CXCR4. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 177(2), pp.782–786.

Ferguson, D.O. & Alt, F.W., 2001. DNA double strand break repair and chromosomal translocation: lessons from animal models. *Oncogene*, 20(40), pp.5572–5579. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11607810.

Ferreboeuf, M., Mariot, V., Bessières, B., et al., 2014. DUX4 and DUX4 downstream target genes are expressed in fetal FSHD muscles. *Human Molecular Genetics*, 23(1), pp.171–181.

Ferreboeuf, M., Mariot, V., Furling, D., et al., 2014. Nuclear protein spreading: Implication for pathophysiology of neuromuscular diseases. *Human Molecular Genetics*, 23(15), pp.4125–4133.

Ferri, G. et al., 2015. Direct interplay between two candidate genes in FSHD muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics*, 24(5), pp.1256–1266.

Finkelstein, R. et al., 1990. The orthodenticle gene encodes a novel homeo domain protein involved in the development of the Drosophila nervous system and ocellar visual structures. *Genes and Development*, 4(9), pp.1516–1527.

Fischle, W., Wang, Y. & Allis, C.D., 2003. Histone and chromatin cross-talk. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(2), pp.172–183.

Flierl, a et al., 2005. Adeno-associated virus-mediated gene transfer of the heart/muscle adenine nucleotide translocator (ANT) in mouse. *Gene therapy*, 12(7), pp.570–8. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1456758&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Freitas, A.A. & De Magalhães, J.P., 2011. A review and appraisal of the DNA damage theory of ageing. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 728(1–2), pp.12–22.

Friedenson, B., 2007. The BRCA1/2 pathway prevents hematologic cancers in addition to breast and ovarian cancers. *BMC cancer*, 7, p.152.

Friedman, J.R. et al., 1996. KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain. *Genes and Development*, 10(16), pp.2067–2078.

Fu, Y. et al., 2014. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol*, 32(3), pp.279–284. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24463574\nhttp://www.nature.com/nbt/journal/v32/n3/pdf/

nbt.2808.pdf.

Fulle, S. & Fanò, G., 2007. The Contribution of reactive oxygen species in Sarcopenia and muscle aging. In *Role of Physical Exercise in Preventing Disease and Improving the Quality of Life*. pp. 103–111.

Gabellini, D. et al., 2006. Facioscapulohumeral muscular dystrophy in mice overexpressing FRG1. *Nature*, 439(7079), pp.973–977.

Gabellini, D., Green, M.R. & Tupler, R., 2002. Inappropriate gene activation in FSHD: A repressor complex binds a chromosomal repeat deleted in dystrophic muscle. *Cell*, 110(3), pp.339–348.

Gabriels, J. et al., 1999. Nucleotide sequence of the partially deleted D4Z4 locus in a patient with FSHD identifies a putative gene within each 3.3 kb element. *Gene*, 236(1), pp.25–32. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10433963.

van Geel, M. et al., 2002. Genomic analysis of human chromosome 10q and 4q telomeres suggests a common origin. *Genomics*, 79(2), pp.210–217. Available at: http://ac.els-cdn.com/S0888754302966905/1-s2.0-S0888754302966905-main.pdf?_tid=8e48c0c6-7dd3-11e5-819c-00000aab0f01&acdnat=1446078508_1eee1b4c7cf15975c2f5ce1d11bfd7db.

van Geel, M. et al., 2000. Identification of a novel beta-tubulin subfamily with one member (TUBB4Q) located near the telomere of chromosome region 4q35. *Cytogenetics and cell genetics*, 88(3–4), pp.316–21. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10828619.

Gehring, W.J., Affolter, M. & Bürglin, T., 1994. Homeodomain proteins. *Annual review of biochemistry*, 63(4), pp.487–526.

Gendrel, A.-V. et al., 2013. Epigenetic Functions of Smchd1 Repress Gene Clusters on the Inactive X Chromosome and on Autosomes. *Molecular and Cellular Biology*, 33(16), pp.3150–3165. Available at: http://mcb.asm.org/lookup/doi/10.1128/MCB.00145-13.

Geng, L.N. et al., 2012. DUX4 activates germline genes, retroelements, and immune mediators: implications for facioscapulohumeral dystrophy. *Dev Cell*, 22(1), pp.38–51. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22209328.

van Gent, D.C. & van der Burg, M., 2007. Non-homologous end-joining, a sticky affair. *Oncogene*, 26(56), pp.7731–7740.

van Gent, D.C., Hoeijmakers, J.H. & Kanaar, R., 2001. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nature reviews. Genetics*, 2(3), pp.196–206. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11256071.

Gilbert, J.R. et al., 1993. Evidence for heterogeneity in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). *American journal of human genetics*, 53(2), pp.401–408.

Gilbert, L.A. et al., 2013. XCRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 154(2).

Goichberg, P. et al., 2001. Recruitment of beta-catenin to cadherin-mediated intercellular adhesions is involved in myogenic induction. *Journal of cell science*, 114(Pt 7), pp.1309–1319.

Gomez-Cabrera, M.C., Domenech, E. & Viña, J., 2008. Moderate exercise is an antioxidant: Upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(2), pp.126–131.

Goto, K. et al., 1995. DNA rearrangements in Japanese facioscapulohumeral muscular dystrophy patients: clinical correlations. *Neuromuscular disorders : NMD*, 5(3), pp.201–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7633185.

de Greef, J.C. et al., 2009. Common epigenetic changes of D4Z4 in contraction-dependent and contraction-independent FSHD. *Human Mutation*, 30(10), pp.1449–1459.

Griffin, M. a et al., 2004. Patterning, prestress, and peeling dynamics of myocytes. *Biophysical journal*, 86(2), pp.1209–22. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1303913&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Guo, X. et al., 2014. In vitro Differentiation of Functional Human Skeletal Myotubes in a Defined System. *Biomaterials science*, 2(1), pp.131–138. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3917571&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Guo, Z. et al., 2000. Requirement for Atr in phosphorylation of Chk1 and cell cycle regulation in response to DNA replication blocks and UV-damaged DNA in Xenopus egg extracts. *Genes and Development*, 14(21), pp.2745–2756.

Hagen, T.M. et al., 1999. (R)-alpha-lipoic acid-supplemented old rats have improved mitochondrial function, decreased oxidative damage, and increased metabolic rate. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13(2), pp.411–418.

Hamilton, M.L. et al., 2001. Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(18), pp.10469–10474. Available at: http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=11517304&retmode=ref&cmd=prlinks&otool=upennlib.

Hampton, M.B., Kettle, A.J. & Winterbourn, C.C., 1998. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, 92(9), pp.3007–17. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9787133.

Hanel, M.L., Wuebbles, R.D. & Jones, P.L., 2009. Muscular dystrophy candidate gene FRG1 is critical for muscle development. *Developmental Dynamics*, 238(6), pp.1502–1512.

Hardbower, D.M. et al., 2013. Chronic inflammation and oxidative stress: The smoking gun for helicobacter pylori-induced gastric cancer? *Gut Microbes*, 4(6).

Harrison, M.M. et al., 2014. A CRISPR view of development. *Genes and Development*, 28(17), pp.1859–1872.

Haslbeck, K.M. et al., 2005. The RAGE pathway in inflammatory myopathies and limb girdle muscular dystrophy. *Acta Neuropathologica*, 110(3), pp.247–254.

Hayashi, K. & Yandell, D.W., 1993. How sensitive is PCR-SSCP? *Human Mutation*, 2(5), pp.338–346. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8257985.

Hecht, J.L. & Aster, J.C., 2000. Molecular biology of Burkitt's lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 18(21), pp.3707–21. Available at: http://jco.ascopubs.org/content/18/21/3707.short\nhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11054444.

Helleday, T., 2003. Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells. *Mutat Res*,

532(1–2), pp.103–115. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14643432.

Hewitt, J.E. et al., 1994. Analysis of the tandem repeat locus D4Z4 associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *©1994 Oxford University Press Human Molecular Genetics*, 3(8), pp.1287–1295.

Himeda, C.L. et al., 2014. Myogenic Enhancers Regulate Expression of the Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy-Associated DUX4 Gene. *Molecular and cellular biology*, 34(11), pp.1942–55. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24636994.

Himeda, C.L., Jones, T.I. & Jones, P.L., 2015. CRISPR/dCas9-mediated Transcriptional Inhibition Ameliorates the Epigenetic Dysregulation at D4Z4 and Represses DUX4-fl in FSH Muscular Dystrophy. *Mol Ther*. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26527377.

Ho, L. & Hanawalt, P.C., 1991. Gene-specific DNA repair in terminally differentiating rat myoblasts. *Mutation Research-DNA Repair*, 255(2), pp.123–141.

Hoeijmakers, J.H.J., 2009. DNA damage, aging, and cancer. *The New England journal of medicine*, 361(15), pp.1475–85. Available at: http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra0804615.

Hoeijmakers, J.H.J., 2001. DNA repair mechanisms. *Maturitas*, 38(1), pp.17–22. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378512200001882.

Hou, C. et al., 2008. CTCF-dependent enhancer-blocking by alternative chromatin loop formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(51), pp.20398–403. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2629272&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Huschtscha, L.I. & Holliday, R., 1983. Limited and unlimited growth of SV40-transformed cells from human diploid MRC-5 fibroblasts. *Journal of cell science*, 63, pp.77–99.

Inazuka, M. et al., 1997. A Streamlined Mutation Detection System: Multicolor Post-PCR Fluorescence Labeling and Single-Strand Conformational Polymorphism Analysis by Capillary Electrophoresis. *Genome Research*, 7(11), pp.1094–1103.

Irrcher, I., Ljubicic, V. & Hood, D.A., 2009. Interactions between ROS and AMP kinase activity in the regulation of PGC-1alpha transcription in skeletal muscle cells. *American Journal of Physiology*

- *Cell Physiology*, 296(1), pp.C116-23. Available at: http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=19005163&retmode=ref&cmd=prlinks\npapers2://publication/doi/10.1152/ajpcell.00267.2007.

Ishchenko, A. et al., 2003. Age-dependent increase of 8-oxoguanine-, hypoxanthine-, and uracil- DNA glycosylase activities in liver extracts from OXYS rats with inherited overgeneration of free radicals and Wistar rats. *Med Sci Monit*, 9(1), p.BR16-24. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12552232.

Jackson, A.L. & Loeb, L.A., 2001. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 477(1–2), pp.7–21.

Janero, D.R., 1991. Therapeutic potential of vitamin E in the pathogenesis of spontaneous atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 11(1), pp.129–144.

Ji, L.L., 2001. Exercise at old age: does it increase or alleviate oxidative stress? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 928, pp.236–247.

Jiang, G. et al., 2003. Testing the position-effect variegation hypothesis for facioscapulohumeral muscular dystrophy by analysis of histone modification and gene expression in subtelomeric 4q. *Human Molecular Genetics*, 12(22), pp.2909–2921.

Jiricny, J., 2006. The multifaceted mismatch-repair system. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(5), pp.335–46. Available at: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrm1907\nhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16612326.

Jones, T.I., Parilla, M. & Jones, P.L., 2016. Transgenic drosophila for investigating dux4 and frg1, two genes associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy (fshd). *PLoS ONE*, 11(3).

Kang, C. et al., 2009. Exercise activation of muscle peroxisome proliferator-activated receptor-?? coactivator-1?? signaling is redox sensitive. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(10), pp.1394–1400.

Kaukonen, J. et al., 2000. Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance. *Science*

(New York, NY), 289(5480), pp.782–785. Available at: http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=10926541&retmode=ref&cmd=prlinks&otool=upennlib.

Kawamura-Saito, M. et al., 2006. Fusion between CIC and DUX4 up-regulates PEA3 family genes in Ewing-like sarcomas with t(4;19)(q35;q13) translocation. *Human Molecular Genetics*, 15(13), pp.2125–2137.

Kelly, D.P. & Scarpulla, R.C., 2004. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes and Development*, 18(4), pp.357–368.

Kirkman, H.N. & Gaetani, G.F., 2007. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(1), pp.44–50.

Kisseljova, N.P. et al., 2014. DNA polymorphism and epigenetic marks modulate the affinity of a scaffold/matrix attachment region to the nuclear matrix. *Eur J Hum Genet*, 22(9), pp.1117–23.

Kitzmann, M. et al., 1998. The muscle regulatory factors MyoD and Myf-5 undergo distinct cell cycle-specific expression in muscle cells. *Journal of Cell Biology*, 142(6), pp.1447–1459.

Klaunig, J.E. et al., 1998. The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environmental health perspectives*, 106 Suppl(February), pp.289–95. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1533298&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Klinge, L. et al., 2006. Severe phenotype in infantile facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders*, 16(9–10), pp.553–558.

Klooster, R. et al., 2009. Comprehensive expression analysis of FSHD candidate genes at the mRNA and protein level. *Eur J Hum Genet*, 17(12), pp.1615–1624. Available at: http://www.nature.com/ejhg/journal/v17/n12/pdf/ejhg200962a.pdf.

Knoch, J. et al., 2012. Rare hereditary diseases with defects in DNA-repair. *Eur J Dermatol*, 22(4), pp.443–455. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22436139.

Ko, C.Y. et al., 2008. Epigenetic silencing of CCAAT/enhancer-binding protein ?? activity by YY1/polycomb group/DNA methyltransferase complex. *Journal of Biological Chemistry*, 283(45), pp.30919–30932.

Koch, H., Wittern, K.P. & Bergemann, J., 2001. In human keratinocytes the Common Deletion reflects donor variabilities rather than chronologic aging and can be induced by ultraviolet A irradiation. *Journal of Investigative Dermatology*, 117(4), pp.892–897.

van Koningsbruggen, S., 2004. FRG1P is localised in the nucleolus, Cajal bodies, and speckles. *Journal of Medical Genetics*, 41(4).

Kowaljow, V. et al., 2007. The DUX4 gene at the FSHD1A locus encodes a pro-apoptotic protein. *Neuromuscul Disord*, 17(8), pp.611–623. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17588759.

Krom, Y.D. et al., 2013. Intrinsic Epigenetic Regulation of the D4Z4 Macrosatellite Repeat in a Transgenic Mouse Model for FSHD. *PLoS Genetics*, 9(4).

Kuang, S. et al., 2007. Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell*, 129(5), pp.999–1010. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17540178.

Laforêt, P. et al., 1998. Cardiac involvement in genetically confirmed facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neurology*, 51(5), pp.1454–1456.

Lagirand-Cantaloube, J. et al., 2009. Inhibition of atrogin-1/MAFbx mediated MyoD proteolysis prevents skeletal muscle atrophy in vivo. *PLoS ONE*, 4(3).

Landouzy, L and Dejerine, J., 1885. De la myopathie atrophique progressive. *Rev Med Franc*, 5, pp.81–99.

Landouzy, L and Dejerine, J., 1886. Nouvelles recherches cliniques et anatomopathologies sur la myopatie atrophique progressive. A propos de six observations nouvelles, dont une avec autopsie. *Rev Med Franc*, 6, pp.977–1027.

Langen, R.C.J. et al., 2002. Tumor necrosis factor-alpha inhibits myogenesis through redox-dependent and -independent pathways. *American journal of physiology. Cell physiology*, 283(3), pp.C714-21. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12176728.

Laoudj-Chenivesse, D. et al., 2005. Increased levels of adenine nucleotide translocator 1 protein and response to oxidative stress are early events in facioscapulohumeral muscular dystrophy muscle. *J Mol Med (Berl)*, 83(3), pp.216–224. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15551024.

Larsen, B.D. et al., 2010. Caspase 3/caspase-activated DNase promote cell differentiation by inducing DNA strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(9), pp.4230–5. Available at: http://www.pnas.org/content/107/9/4230.full.

Larsen, M. et al., 2015. Diagnostic approach for FSHD revisited: SMCHD1 mutations cause FSHD2 and act as modifiers of disease severity in FSHD1. *Eur J Hum Genet*, 23(6), pp.808–816. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25370034.

Lattanzi, G. et al., 2012. Nuclear damages and oxidative stress: New Perspectives for laminopathies. *European Journal of Histochemistry*, 56(4).

Leandro, G.S., Sykora, P. & Bohr, V.A., 2015. The impact of base excision DNA repair in age-related neurodegenerative diseases. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 776, pp.31–39.

Lehming, N. et al., 1998. Chromatin components as part of a putative transcriptional repressing complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(June), pp.7322–7326.

Lemasters, J.J., 2005. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation research*, 8(1), pp.3–5. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=15798367&query_hl=1.

Lemmers, R.J. et al., 2010. A unifying genetic model for facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Science*, 329(5999), pp.1650–1653. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20724583.

Lemmers, R.J. et al., 2004. Contractions of D4Z4 on 4qB subtelomeres do not cause facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Am J Hum Genet*, 75(6), pp.1124–1130. Available at: http://ac.els-cdn.com/S0002929707600809/1-s2.0-S0002929707600809-main.pdf?_tid=2d719c76-689f-11e5-8b4c-00000aab0f01&acdnat=1443747037_a91b702bf7440bd88528ad2e50bc3de5.

Lemmers, R.J. et al., 2003. D4F104S1 deletion in facioscapulohumeral muscular dystrophy:

phenotype, size, and detection. *Neurology*, 61(2), pp.178–183.

Lemmers, R.J. et al., 2002. Facioscapulohumeral muscular dystrophy is uniquely associated with one of the two variants of the 4q subtelomere. *Nat Genet*, 32(2), pp.235–236. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12355084.

Lemmers, R.J. et al., 1998. Inter- and intrachromosomal sub-telomeric rearrangements on 4q35: implications for facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) aetiology and diagnosis. *Hum Mol Genet*, 7(8), pp.1207–1214. Available at: http://hmg.oxfordjournals.org/content/7/8/1207.full.pdf.

Lemmers, R.J. et al., 2007. Specific sequence variations within the 4q35 region are associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Am J Hum Genet*, 81(5), pp.884–894. Available at: http://ac.els-cdn.com/S000292970763866X/1-s2.0-S000292970763866X-main.pdf?_tid=9d4dd68c-5a6e-11e2-b17b-00000aacb35d&acdnat=1357744370_aa38c01f424a21dc849eef6d4b06fe07\nhttp://ac.els-cdn.com/S000292970763866X/1-s2.0-S000292970763866X-main.pdf?_tid=eeab2524.

Lemmers, R.J.L.F. et al., 2001. Complete allele information in the diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy by triple DNA analysis. *Annals of Neurology*, 50(6), pp.816–819.

Lemmers, R.J.L.F. et al., 2012. Digenic inheritance of an SMCHD1 mutation and an FSHD-permissive D4Z4 allele causes facioscapulohumeral muscular dystrophy type 2. *Nature genetics*, 44(12), pp.1370–4. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3671095&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Lemmers, R.J.L.F. et al., 2010. Worldwide Population Analysis of the 4q and 10q Subtelomeres Identifies Only Four Discrete Interchromosomal Sequence Transfers in Human Evolution. *American Journal of Human Genetics*, 86(3), pp.364–377.

Liang, P. et al., 2015. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell*, 6(5), pp.363–372. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25894090.

Lieber, M.R., 2010. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annual review of biochemistry*, 79(D), pp.181–211. Available at:

http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3079308&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Lim, J.W. et al., 2015. DICER/AGO-dependent epigenetic silencing of D4Z4 repeats enhanced by exogenous siRNA suggests mechanisms and therapies for FSHD. *Human Molecular Genetics*, 24(17), pp.4817–4828.

Liu, B. et al., 2005. Genomic instability in laminopathy-based premature aging. *Nat Med*, 11(7), pp.780–785. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15980864.

Liu, B., Chen, Y. & St. Clair, D.K., 2008. ROS and p53: A versatile partnership. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(8), pp.1529–1535.

Liu, J. et al., 2015. XPD localizes in mitochondria and protects the mitochondrial genome from oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Research*, 43(11), pp.5476–5488.

Liu, Q. et al., 2010. Facioscapulohumeral muscular dystrophy region gene-1 (FRG-1) is an actin-bundling protein associated with muscle-attachment sites. *Journal of cell science*, 123(Pt 7), pp.1116–23. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2844320&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Lunt, P.W. et al., 1995. Phenotypic-genotypic correlation will assist genetic counseling in 4q35-facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Muscle & nerve*, 2, pp.S103–S109.

Lunt, P.W., Compston, D. a & Harper, P.S., 1989. Estimation of age dependent penetrance in facioscapulohumeral muscular dystrophy by minimising ascertainment bias. *Journal of medical genetics*, 26(12), pp.755–60. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1015755&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Lunt, P.W. & Harper, P.S., 1991. Genetic counselling in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Journal of medical genetics*, 28(10), pp.655–664.

Lyle, R. et al., 1995. The FSHD-associated repeat, D4Z4, is a member of a dispersed family of homeobox-containing repeats, subsets of which are clustered on the short arms of the acrocentric chromosomes. *Genomics*, 28(3), pp.389–97. Available at:

http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0888754385711664.

van der Maarel, S.M. et al., 2000. De novo facioscapulohumeral muscular dystrophy: frequent somatic mosaicism, sex-dependent phenotype, and the role of mitotic transchromosomal repeat interaction between chromosomes 4 and 10. *American journal of human genetics*, 66(1), pp.26–35. Available at: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002929707622307.

Macaione, V. et al., 2007. RAGE-NF-kappaB pathway activation in response to oxidative stress in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Acta neurologica Scandinavica*, 115(2), pp.115–121.

Mammucari, C. & Rizzuto, R., 2010. Signaling pathways in mitochondrial dysfunction and aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, 131(7–8), pp.536–543.

Mani, R.-S. & Chinnaiyan, A.M., 2010. Triggers for genomic rearrangements: insights into genomic, cellular and environmental influences. *Nature reviews. Genetics*, 11(12), pp.819–829. Available at: http://dx.doi.org/10.1038/nrg2883.

Marcil, A., 2003. Pitx1 and Pitx2 are required for development of hindlimb buds. *Development*, 130(1), pp.45–55. Available at: http://dev.biologists.org/content/130/1/45\nhttp://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.00192.

Margolin, J.F. et al., 1994. Krüppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(10), pp.4509–13. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=43815&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Mariot, V. et al., 2015. Correlation between low FAT1 expression and early affected muscle in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Annals of Neurology*, 78(3), pp.387–400.

Markovic, J. et al., 2007. Glutathione is recruited into the nucleus in early phases of cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(28), pp.20416–20424.

Marsollier, A.C. et al., 2016. Antisense targeting of 3' end elements involved in DUX4 mRNA processing is an efficient therapeutic strategy for facioscapulohumeral dystrophy: A new gene-silencing approach. *Human Molecular Genetics*, 25(8), pp.1468–1478.

Marzetti, E. et al., 2010. Mitochondrial death effectors: relevance to sarcopenia and disuse muscle

atrophy. *Biochim Biophys Acta*, 1800(3), pp.235–244. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19450666.

Masny, P.S. et al., 2010. Analysis of allele-specific RNA transcription in FSHD by RNA-DNA FISH in single myonuclei. *Eur J Hum Genet*, 18(4), pp.448–456. Available at: http://www.nature.com/ejhg/journal/v18/n4/pdf/ejhg2009183a.pdf.

Masny, P.S. et al., 2004. Localization of 4q35.2 to the nuclear periphery: Is FSHD a nuclear envelope disease? *Human Molecular Genetics*, 13(17), pp.1857–1871.

Mauro, A., 1961. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*, 9, pp.493–495.

Mecocci, P. et al., 1999. Age-dependent increases in oxidative damage to DNA, lipids, and proteins in human skeletal muscle. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(3–4), pp.303–308. Available at: http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=9895220&retmode=ref&cmd=prlinks&otool=upennlib.

Meister, A. & Anderson, M.E., 1983. Glutathione. *Annual Review of biochemistry*, 52, pp.711–760.

Melis, J.P.M., van Steeg, H. & Luijten, M., 2013. Oxidative DNA damage and nucleotide excision repair. *Antioxidants & redox signaling*, 18(18), pp.2409–19. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23216312\nhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3671630&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Messina, S. et al., 2006. Lipid peroxidation inhibition blunts nuclear factor-kappaB activation, reduces skeletal muscle degeneration, and enhances muscle function in mdx mice. *The American journal of pathology*, 168(3), pp.918–926.

Mitsuhashi, H. et al., 2013. Expression of DUX4 in zebrafish development recapitulates facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics*, 22(3), pp.568–577.

Mlchlels, C. & Kfmacli, J., 1988. Use of the inhibition of enzymatic antioxidant systems in order to evaluate their physiological importance. *Eur. J. Biochem*, 177, pp.435–441.

Monici, M.C. et al., 2003. Activation of nuclear factor-kappaB in inflammatory myopathies and Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*, 60(6), pp.993–997.

Moosmann, P. et al., 1996. Transcriptional repression by RING finger protein TIF1?? that interacts

with the KRAB repressor domain of KOX1. *Nucleic Acids Research*, 24(24), pp.4859–4867.

Morel, Y. & Barouki, R., 1999. Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J*, 342 Pt 3, pp.481–496. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10477257.

Morosetti, R. et al., 2007. Isolation and characterization of mesoangioblasts from facioscapulohumeral muscular dystrophy muscle biopsies. *Stem Cells*, 25(12), pp.3173–3182. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17761758.

Morosetti, R. et al., 2011. Mesoangioblasts from facioscapulohumeral muscular dystrophy display in vivo a variable myogenic ability predictable by their in vitro behavior. *Cell Transplant*, 20(8), pp.1299–1313. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21176400.

Moynahan, M.E. & Jasin, M., 2010. Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(3), pp.196–207. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3261768&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Murphy, M.E. & Kehrer, J.P., 1986. Activities of antioxidant enzymes in muscle, liver and lung of chickens with inherited muscular dystrophy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 134(2), pp.550–556.

Murphy, M.P., 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical journal*, 417(1), pp.1–13. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19061483\nhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2605959.

Musaro, A., Fulle, S. & Fano, G., 2010. Oxidative stress and muscle homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 13(3), pp.236–242. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20098320.

Nakamura, J., La, D.K. & Swenberg, J.A., 2000. 5'-nicked apurinic/apyrimidinic sites are resistant to beta-elimination by beta-polymerase and are persistent in human cultured cells after oxidative stress. *J Biol Chem*, 275(8), pp.5323–5328. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10681505.

Nakamura, J. & Swenberg, J.A., 1999. Endogenous apurinic/apyrimidinic sites in genomic DNA of

mammalian tissues. *Cancer Research*, 59(11), pp.2522–2526.

Neguembor, M. V & Gabellini, D., 2010. In junk we trust: repetitive DNA, epigenetics and facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Epigenomics*, 2(2), pp.271–287.

Niedernhofer, L.J., 2008. Tissue-specific accelerated aging in nucleotide excision repair deficiency. *Mechanisms of Ageing and Development*, 129(7–8), pp.408–415.

Nikitaki, Z. et al., 2015. Stress-induced DNA damage biomarkers: applications and limitations. *Frontiers in chemistry*, 3(June), p.35. Available at: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fchem.2015.00035/abstract.

Nouspikel, T. & Hanawalt, P.C., 2002. DNA repair in terminally differentiated cells. *DNA Repair*, 1(1), pp.59–75.

Obeid, S. et al., 2010. Replication through an abasic DNA lesion: structural basis for adenine selectivity. *The EMBO journal*, 29(10), pp.1738–47. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2876968&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Olguin, H.C. & Olwin, B.B., 2004. Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: A potential mechanism for self-renewal. *Developmental Biology*, 275(2), pp.375–388.

Ong, C.-T. & Corces, V.G., 2014. CTCF: an architectural protein bridging genome topology and function. *Nature reviews. Genetics*, 15(4), pp.234–46. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24614316.

Osborne, R.J. et al., 2007. Expression profile of FSHD supports a link between retinal vasculopathy and muscular dystrophy. *Neurology*, 68(8), pp.569–577. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17151338.

Ottaviani, A. et al., 2009. The D4Z4 macrosatellite repeat acts as a CTCF and A-type lamins-dependent insulator in Facio-Scapulo-Humeral dystrophy. *PLoS Genetics*, 5(2).

Ousterout, D.G. et al., 2015. Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun*, 6, p.6244. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25692716.

van Overveld, P.G. et al., 2003. Hypomethylation of D4Z4 in 4q-linked and non-4q-linked facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Nat Genet*, 35(4), pp.315–317. Available at: http://www.nature.com/ng/journal/v35/n4/pdf/ng1262.pdf.

Padberg, G., 1982. *Facioscapulohumeral disease*.

Padberg, G.W. et al., 1995. On the significance of retinal vascular disease and hearing loss in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Muscle Nerve Suppl*, (2), pp.S73-80. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23573590.

Pakula, A. et al., 2013. Altered expression of cyclin A 1 in muscle of patients with facioscapulohumeral muscle dystrophy (FSHD-1). *PLoS One*, 8(9), p.e73573. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24019929.

de Palma, L. et al., 2008. Ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx in human skeletal muscle atrophy. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme*, 75(1), pp.53–57.

Pandey, S.N. et al., 2012. Conditional over-expression of PITX1 causes skeletal muscle dystrophy in mice. *Biol Open*, 1(7), pp.629–639. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23125914.

Pandey, S.N. et al., 2014. Morpholino treatment improves muscle function and pathology of Pitx1 transgenic mice. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 22(2), pp.390–6. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3916049&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Passerieux, E., 2015. Effects of vitamin C, vitamin E, zinc gluconate, and selenomethionine supplementation on muscle function and oxidative stress biomarkers in patients with facioscapulohumeral dystrophy: a double-blind randomized controlled clinical trial. *Free Radic Biol Med*, 81, pp.158–169.

Perry, R.L. & Rudnick, M.A., 2000. Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 5, pp.D750-67. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10966875.

Petrov, A. et al., 2008. A nuclear matrix attachment site in the 4q35 locus has an enhancer-blocking

activity in vivo: Implications for the facio-scapulo-humeral dystrophy. *Genome Research*, 18(1), pp.39–45.

Petrov, A. et al., 2006. Chromatin loop domain organization within the 4q35 locus in facioscapulohumeral dystrophy patients versus normal human myoblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(18), pp.6982–6987. Available at: http://www.pnas.org/content/103/18/6982.full.pdf.

Phillips, J.E. & Corces, V.G., 2009. CTCF: Master Weaver of the Genome. *Cell*, 137(7), pp.1194–1211.

Piec, I. et al., 2005. Differential proteome analysis of aging in rat skeletal muscle. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(9), pp.1143–1145. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15831715.

Polesskaya, A., Seale, P. & Rudnicki, M.A., 2003. Wnt signaling induces the myogenic specification of resident CD45+ adult stem cells during muscle regeneration. *Cell*, 113(7), pp.841–852.

Pomi??s, P. et al., 2015. Reduced myotube diameter, atrophic signalling and elevated oxidative stress in cultured satellite cells from COPD patients. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 19(1), pp.175–186.

Portilho, D.M. et al., 2015. Mirna expression in control and FSHD fetal human muscle biopsies. *PLoS ONE*, 10(2).

Pourquié, O., 2001. Vertebrate somitogenesis. *Annual review of cell and developmental biology*, 17, pp.311–350.

Powers, S. & Jackson, M., 2008. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological reviews*, 88(4), pp.1243–1276. Available at: http://physrev.physiology.org/content/88/4/1243.short\nhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2909187&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Powers, S.K. et al., 2011. Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle. *Compr Physiol*, 1(2), pp.941–969. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23737208.

Powers, S.K., Kavazis, A.N. & DeRuisseau, K.C., 2005. Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 288(2), pp.R337–R344.

Powers, S.K., Kavazis, A.N. & McClung, J.M., 2007. Oxidative stress and disuse muscle atrophy. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 102(February 2007), pp.2389–2397.

Puppo, F. et al., 2015. Identification of variants in the 4q35 gene FAT1 in patients with a facioscapulohumeral dystrophy-like phenotype. *Human Mutation*, 36(4), pp.443–453.

Puri, P.L. et al., 2002. A myogenic differentiation checkpoint activated by genotoxic stress. *Nat Genet*, 32(4), pp.585–593. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12415271.

Qi, L.S. et al., 2013. Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *Cell*, 152(5), pp.1173–1183. Available at: <Go to ISI>://WOS:000315710300022\nhttp://ac.els-cdn.com/S0092867413002110/1-s2.0-S0092867413002110-main.pdf?_tid=e20bf916-bae7-11e5-bb63-00000aab0f26&acdnat=1452794259_23f49b92d4b51d25a39043511a791942.

Qiu, P. et al., 2004. Mutation detection using Surveyor™ nuclease. *BioTechniques*, 36(4), pp.702–707.

Rahimov, F. et al., 2012. Transcriptional profiling in facioscapulohumeral muscular dystrophy to identify candidate biomarkers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(40), pp.16234–16239. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22988124.

Rahimov, F. et al., 2012. Transcriptional profiling in facioscapulohumeral muscular dystrophy to identify candidate biomarkers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(40), pp.16234–9. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3479603&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Rajabi, H.N., Takahashi, C. & Ewen, M.E., 2014. Retinoblastoma protein and MyoD function together to effect the repression of Fra-1 and in turn cyclin D1 during terminal cell cycle arrest associated with myogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 289(34), pp.23417–23427.

Ralston, E. & Hall, Z.W., 1989. Transfer of a protein encoded by a single nucleus to nearby nuclei in multinucleated myotubes. *Science*, 244(0036–8075 (Print)), pp.1066–1069.

Rappsilber, J. et al., 2003. Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Research*, 13(1), pp.1231–1245.

Reardon, T.F. & Allen, D.G., 2009. Iron injections in mice increase skeletal muscle iron content,

induce oxidative stress and reduce exercise performance. *Experimental physiology*, 94(6), pp.720–730.

Reid, M.B., 2008. Free radicals and muscle fatigue: Of ROS, canaries, and the IOC. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(2), pp.169–179.

Reid, M.B., 2001. Invited Review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *Journal of Applied Physiology*, 90(2), pp.724–731. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11160074\nhttp://www.jappl.org/content/90/2/724.short.

Relaix, F. et al., 2006. Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *Journal of Cell Biology*, 172(1), pp.91–102.

Renault, V. et al., 2002. Human skeletal muscle satellite cells: aging, oxidative stress and the mitotic clock. *Experimental gerontology*, 37(10–11), pp.1229–1236. Available at: http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=12470836&retmode=ref&cmd=prlinks\npapers3://publication/uuid/96490869-3FBD-4AC3-A535-2ECEF6ABC30D.

Richards, M. et al., 2012. Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD): An enigma unravelled? *Human Genetics*, 131(3), pp.325–340.

Richardson, C. & Jasin, M., 2000. Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks. *Nature*, 405(6787), pp.697–700.

Rijkers, T. et al., 2004. FRG2, an FSHD candidate gene, is transcriptionally upregulated in differentiating primary myoblast cultures of FSHD patients. *Journal of medical genetics*, 41(11), pp.826–36. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1735617&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Rochard, P. et al., 2000. Mitochondrial activity is involved in the regulation of myoblast differentiation through myogenin expression and activity of myogenic factors. *Journal of Biological Chemistry*, 275(4), pp.2733–2744.

Rodriguez, M.C. & Tarnopolsky, M.A., 2003. Patients with dystrophinopathy show evidence of increased oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(9), pp.1217–1220. Available at:

http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L36423371\nhttp://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(03)00141-2\nhttp://nihlibrarysfx.nih.gov:9003/sfx_local?sid=EMBASE&issn=08915849&id=doi:10.1016/S0891-5849(03)00141-2&atitle=Patie.

Sacconi, S. et al., 2013. The FSHD2 gene SMCHD1 Is a modifier of disease severity in families affected by FSHD1. *American Journal of Human Genetics*, 93(4), pp.744–751.

Saito, Y. et al., 2007. Facioscapulohumeral muscular dystrophy with severe mental retardation and epilepsy. *Brain Dev*, 29(4), pp.231–233.

Sandri, M. et al., 2001. Caspase 3 expression correlates with skeletal muscle apoptosis in Duchenne and facioscapulo human muscular dystrophy. A potential target for pharmacological treatment? *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 60(3), pp.302–12. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11245214.

Scherz-Shouval, R. et al., 2007. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *The EMBO journal*, 26(7), pp.1749–60. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1847657&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Schmidt, W.M. et al., 2011. DNA damage, somatic aneuploidy, and malignant sarcoma susceptibility in muscular dystrophies. *PLoS Genet*, 7(4), p.e1002042. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21533183.

Seale, P. et al., 2000. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*, 102(6), pp.777–786. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11030621\nhttp://ac.els-cdn.com/S0092867400000660/1-s2.0-S0092867400000660-main.pdf?_tid=9a479a4e-60b8-11e3-97b3-00000aab0f6c&acdnat=1386583353_9be22c4c13e4b065652a8b88d8b69f1e.

Semple, F. et al., 2011. Human ??-defensin 3 affects the activity of pro-inflammatory pathways associated with MyD88 and TRIF. *European Journal of Immunology*, 41(11), pp.3291–3300.

Semple, F. et al., 2010. Human b-defensin 3 has immunosuppressive activity in vitro and in vivo. *European Journal of Immunology*, 40, pp.1073–1078.

Sequeira, V. et al., 2014. The physiological role of cardiac cytoskeleton and its alterations in heart

failure. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1838(2), pp.700–722.

Serth, J. et al., 2000. Quantitation of DNA extracted after micropreparation of cells from frozen and formalin-fixed tissue sections. *The American journal of pathology*, 156(4), pp.1189–1196.

Sharma, V. et al., 2013. DUX4 differentially regulates transcriptomes of human rhabdomyosarcoma and mouse C2C12 cells. *PLoS One*, 8(5), p.e64691. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23717650.

Shen, S. et al., 2011. Widespread establishment and regulatory impact of Alu exons in human genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(7), pp.2837–42. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3041063&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Shoffner, J.M. et al., 1989. Spontaneous Kearns-Sayre/chronic external ophthalmoplegia plus syndrome associated with a mitochondrial DNA deletion: a slip-replication model and metabolic therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(20), pp.7952–7956. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2554297.

Short, K.R. et al., 2005. Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(15), pp.5618–5623.

Sinha, J.K. et al., 2014. Increased macromolecular damage due to oxidative stress in the neocortex and hippocampus of WNIN/Ob, a novel rat model of premature aging. *Neuroscience*, 269, pp.269–264.

Smith, T.G. et al., 2007. The expression of Fat-1 cadherin during chick limb development. *International Journal of Developmental Biology*, 51(2), pp.173–176.

Snider, L. et al., 2010. Facioscapulohumeral dystrophy: incomplete suppression of a retrotransposed gene. *PLoS Genet*, 6(10), p.e1001181. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21060811.

Snider, L. et al., 2009. RNA transcripts, miRNA-sized fragments and proteins produced from D4Z4 units: New candidates for the pathophysiology of facioscapulohumeral dystrophy. *Human*

Molecular Genetics, 18(13), pp.2414–2430.

Sopko, R. & McNeill, H., 2009. The skinny on Fat: an enormous cadherin that regulates cell adhesion, tissue growth, and planar cell polarity. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(5), pp.717–723.

Stadler, G. et al., 2013. Telomere position effect regulates DUX4 in human facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Nat Struct Mol Biol*, 20(6), pp.671–678. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3711615/pdf/nihms-457969.pdf.

Statland, J. & Tawil, R., 2014. Facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neurol Clin*, 32(3), p.721–8, ix. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25037087.

Storz, P., 2006. Reactive oxygen species-mediated mitochondria-to-nucleus signaling: a key to aging and radical-caused diseases. *Sci STKE*, 2006(332), p.re3. Available at: http://stke.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/stke.3322006re3\nhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16639035.

Summerton, J., 1999. Morpholino antisense oligomers: The case for an RNase H-independent structural type. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1489(1), pp.141–158.

Szeto, D.P. et al., 1999. Role of the Bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development. *Genes and Development*, 13(4), pp.484–494.

Tajbakhsh, S and Buckingham, M., 2000. The birth of muscle progenitor cells in the mouse: spatiotemporal considerations. *Current Topics in Developmental Biology*, 48.

Tajbakhsh, S., 2003. Stem cells to tissue: Molecular, cellular and anatomical heterogeneity in skeletal muscle. *Current Opinion in Genetics and Development*, 13(4), pp.413–422.

Tanoue, T. & Takeichi, M., 2005. New insights into Fat cadherins. *Journal of cell science*, 118(Pt 11), pp.2347–2353. Available at: http://jcs.biologists.org/cgi/content/full/118/11/2347\npapers2://publication/doi/10.1242/jcs.02398.

Tasca, G. et al., 2012. Different molecular signatures in magnetic resonance imaging-staged facioscapulohumeral muscular dystrophy muscles. *PLoS One*, 7(6), p.e38779. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22719944.

Tassin, A. et al., 2013. DUX4 expression in FSHD muscle cells: How could such a rare protein cause a myopathy? *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 17(1), pp.76–89.

Tassin, A. et al., 2012. FSHD Myotubes with Different Phenotypes Exhibit Distinct Proteomes. *PLoS ONE*, 7(12).

Tawil, R. et al., 1996. Evidence for anticipation and association of deletion size with severity in facioscapulohumeral muscular dystrophy. The FSH-DY Group. *Annals of neurology*, 39(6), pp.744–748.

Tawil, R., 2008. Facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 5(4), pp.601–6. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2628543&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Tawil, R., van der Maarel, S.M. & Tapscott, S.J., 2014. Facioscapulohumeral dystrophy: the path to consensus on pathophysiology. *Skelet Muscle*, 4, p.12. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24940479.

Tawil, R., van der Maarel, S.M. & Tapscott, S.J., 2014. Facioscapulohumeral dystrophy: the path to consensus on pathophysiology. *Skeletal muscle*, 4, p.12. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4060068&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Thijssen, P.E. et al., 2014. DUX4 promotes transcription of FRG2 by directly activating its promoter in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Skeletal muscle*, 4, p.19. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4364343&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Thomas, M.J. & Seto, E., 1999. Unlocking the mechanisms of transcription factor YY1: Are chromatin modifying enzymes the key? *Gene*, 236(2), pp.197–208.

Tidball, J.G., 2005. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 288(2), pp.R345-53. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15637171.

Toscano, A. et al., 2005. Oxidative stress in myotonic dystrophy type 1. *Free radical research*, 39(7),

pp.771–776.

Tremblay, D.C. et al., 2010. Expression, tandem repeat copy number variation and stability of four macrosatellite arrays in the human genome. *BMC genomics*, 11(1), p.632. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3018141&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Tsuji, M. et al., 2009. Facioscapulohumeral muscular dystrophy presenting with hypertrophic cardiomyopathy: a case study. *Neuromuscular disorders : NMD*, 19(2), pp.140–2. Available at: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960896608007086.

Tsumagari, K. et al., 2011. Gene expression during normal and FSHD myogenesis. *BMC Medical Genomics*, 4(1), p.67. Available at: http://bmcmedgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1755-8794-4-67.

Tupler, R. et al., 1996. Monosomy of distal 4q does not cause facioscapulohumeral muscular dystrophy. *J Med Genet*, 33(5), pp.366–370. Available at: http://jmg.bmj.com/content/33/5/366.full.pdf.

Turki, A. et al., 2012. Functional muscle impairment in facioscapulohumeral muscular dystrophy is correlated with oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Free Radic Biol Med*, 53(5), pp.1068–1079. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22796148.

Underhill, P.A. et al., 1997. Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography. *Genome Research*, 7(10), pp.996–1005.

Upadhyaya, M. & Cooper, D.N., 2002. Molecular diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Expert review of molecular diagnostics*, 2(2), pp.160–171.

Vanderplanck, C. et al., 2011. The FSHD atrophic myotube phenotype is caused by DUX4 expression. *PLoS ONE*, 6(10).

Vassetzky, Y. et al., 2000. Specification of chromatin domains and regulation of replication and transcription during development. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 10(1), pp.31–38. Available at: Fichiers Perso: Yegor-9500:EndnoteDB:Refs.pdf:Matrix:Reviews:Vassetzky CREGE 2000.pdf.

Velden, J.L.J. Van Der et al., 2006. Inhibition of glycogen synthase kinase-3beta activity is sufficient to stimulate myogenic differentiation. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 290(2),

pp.C453–C462. Available at: http://ajpcell.physiology.org/content/290/2/C453.short\nhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16162663.

Vermeij, W.P., Hoeijmakers, J.H.J. & Pothof, J., 2016. Genome Integrity in Aging: Human Syndromes, Mouse Models, and Therapeutic Options. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 56(1), pp.427–445. Available at: http://dx.doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010814-124316.

Vettor, R. et al., 2009. The origin of intermuscular adipose tissue and its pathophysiological implications. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, pp.987–998. Available at: http://discovery.ucl.ac.uk/168729/.

Vilquin, J.T. et al., 2005. Normal growth and regenerating ability of myoblasts from unaffected muscles of facioscapulohumeral muscular dystrophy patients. *Gene Ther*, 12(22), pp.1651–1662. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15973444.

Wallace, L.M. et al., 2011. DUX4, a candidate gene for facioscapulohumeral muscular dystrophy, causes p53-dependent myopathy in vivo. *Annals of Neurology*, 69(3), pp.540–552.

Wallace, L.M. et al., 2012. RNA interference inhibits DUX4-induced muscle toxicity in vivo: implications for a targeted FSHD therapy. *Mol Ther*, 20(7), pp.1417–1423. Available at: http://www.nature.com/mt/journal/v20/n7/pdf/mt201268a.pdf.

Weber, J.L. & May, P.E., 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, 44, pp.388–396.

Wei, G.H., Liu, D.P. & Liang, C.C., 2005. Chromatin domain boundaries: insulators and beyond. *Cell research*, 15(4), pp.292–300.

Wijmenga, C. et al., 1992. Chromosome 4q DNA rearrangements associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Nat Genet*, 2(1), pp.26–30. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1363881.

Wijmenga, C. et al., 1990. Location of facioscapulohumeral muscular dystrophy gene on chromosome 4. *Lancet*, 336, pp.651–653.

Wijmenga, C. et al., 1991. Mapping of facioscapulohumeral muscular dystrophy gene to chromosome

4q35-qter by multipoint linkage analysis and in situ hybridization. *Genomics*, 9(4), pp.570–575. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2037288.

Willis, J. et al., 2013. APE2 is required for ATR-Chk1 checkpoint activation in response to oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(26), pp.10592–7. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3696815&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Winokur, S.T., Chen, Y.W., et al., 2003. Expression profiling of FSHD muscle supports a defect in specific stages of myogenic differentiation. *Human Molecular Genetics*, 12(22), pp.2895–2907.

Winokur, S.T., Barrett, K., et al., 2003. Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) myoblasts demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. *Neuromuscular Disorders*, 13(4), pp.322–333.

Winokur, S.T. et al., 1994. The DNA rearrangement associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy involves a heterochromatin-associated repetitive element: Implications for a role of chromatin structure in the pathogenesis of the disease. *Chromosome Research*, 2(3), pp.225–234.

Wohlgemuth, M. et al., 2004. Ventilatory support in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neurology*, 63(1), pp.176–178.

Wright, T.J. et al., 1993. Fine mapping of the FSHD gene region orientates the rearranged fragment detected by the probe p13E-11. *Hum Mol Genet*, 2(10), pp.1673–1678. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7903581.

Wuebbles, R.D. et al., 2010. Testing the effects of FSHD candidate gene expression in vertebrate muscle development. *Int J Clin Exp Pathol*, 3(4), pp.386–400. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20490329.

Xie, J., Briggs, J.A. & Briggs, R.C., 1998. Human hematopoietic cell specific nuclear protein MNDA interacts with the multifunctional transcription factor YY1 and stimulates YY1 DNA binding.

Journal of Cellular Biochemistry, 70(4), pp.489–506.

Xie, X. et al., 2007. Systematic discovery of regulatory motifs in conserved regions of the human genome, including thousands of CTCF insulator sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(17), pp.7145–50. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1852749&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Yan, S., Sorrell, M. & Berman, Z., 2014. Functional interplay between ATM/ATR-mediated DNA damage response and DNA repair pathways in oxidative stress. *Cell Mol Life Sci*, 71(20), pp.3951–3967. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24947324.

Yasui, M. et al., 2014. Tracing the fates of site-specifically introduced DNA adducts in the human genome. *DNA Repair*, 15(1), pp.11–20.

Yip, D.J. & Picketts, D.J., 2003. Increasing D4Z4 repeat copy number compromises C2C12 myoblast differentiation. *FEBS Letters*, 537(1–3), pp.133–138.

Yu, B. et al., 2006. DNA mutation detection using denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). *Current protocols in human genetics / editorial board, Jonathan L. Haines ... [et al.]*, Chapter 7, p.Unit7.10. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18428395.

Yu, B.P. & Chung, H.Y., 2006. Adaptive mechanisms to oxidative stress during aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, 127(5), pp.436–443.

Yusufzai, T.M. et al., 2004. CTCF Tethers an Insulator to Subnuclear Sites, Suggesting Shared Insulator Mechanisms across Species. *Molecular Cell*, 13(2), pp.291–298.

Zammit, P.S. et al., 2002. Kinetics of Myoblast Proliferation Show That Resident Satellite Cells Are Competent to Fully Regenerate Skeletal Muscle Fibers. *Experimental Cell Research*, 281(1), pp.39–49. Available at: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014482702956533.

Zammit, P.S. et al., 2004. Muscle satellite cells adopt divergent fates: A mechanism for self-renewal? *Journal of Cell Biology*, 166(3), pp.347–357.

Zatz, M. et al., 1995. High proportion of new mutations and possible anticipation in Brazilian facioscapulohumeral muscular dystrophy families. *American journal of human genetics*, 56(1),

pp.99–105.

Zeng, W. et al., 2009. Specific loss of histone H3 lysine 9 trimethylation and HP1??/cohesin binding at D4Z4 repeats is associated with facioscapulohumeral dystrophy (FSHD). *PLoS Genetics*, 5(7).

Zhang, Y. et al., 2015. DNA-binding sequence specificity of DUX4. *Skeletal Muscle*, 6(1), p.8. Available at: http://www.skeletalmusclejournal.com/content/6/1/8.

Zhang, Y. et al., 2014. Human skeletal muscle xenograft as a new preclinical model for muscle disorders. *Human molecular genetics*, 23(12), pp.3180–8. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4030773&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Zhao, H. & Piwnica-Worms, H., 2001. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Molecular and cellular biology*, 21(13), pp.4129–39. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=87074&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Zhou, B.B. & Elledge, S.J., 2000. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, 408(6811), pp.433–9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11100718.

Zhu, C.H. et al., 2007. Cellular senescence in human myoblasts is overcome by human telomerase reverse transcriptase and cyclin-dependent kinase 4: Consequences in aging muscle and therapeutic strategies for muscular dystrophies. *Aging Cell*, 6(4), pp.515–523.

université PARIS-SACLAY | ÉCOLE DOCTORALE Cancérologie, biologie, médecine, santé (CBMS)

Titre : Des mécanismes moléculaires pathologiques aux stratégies de correction génomique *in vitro* de la Dystrophie Facio-Scapulo-Humérale

Mots-clés : FSHD, DUX4, dommages de l'ADN, stress oxydant, différenciation myogénique, CRISPR/Cas9.

Résumé : La dystrophie Facio-Scapulo-Humérale (FSHD) fait partie des maladies musculaires génétiques les plus fréquentes. Elle se caractérise par une dégénérescence progressive et asymétrique d'un groupe spécifique de muscles striés squelettiques, dont principalement les muscles faciaux, scapulaires et huméraux. D'un point de vue génétique, la FSHD est une maladie multifactorielle qui résulte d'évènements génétiques situés sur la région sub-télomérique du chromosome 4, ainsi que d'évènements épigénétiques altérant l'organisation chromatinienne du locus 4q35. Ces anomalies provoquent une relaxation chromatinienne et une surexpression de la majorité des gènes du locus 4q35, dont *DUX4*, gène majeur impliqué dans la FSHD. Les répercussions de l'ensemble de ces altérations se traduisent notamment par une dérégulation de la signature transcriptionnelle des myoblastes primaires issus des patients FSHD, et par des anomalies de leur différenciation myogénique *in vitro* et leur hypersensibilité au stress oxydant. Plusieurs aspects de la maladie demeurent incompris, et la complexité de cette myopathie rend difficile le choix d'une stratégie thérapeutique optimale. Cependant, la découverte des outils de l'édition du génome et la multiplication de leurs applications à visée thérapeutique dans le cadre de maladies humaines, notamment les myopathies, ouvre de nouvelles perspectives pour la FSHD qui reste, jusque-là, incurable.

Le travail de thèse a concerné, dans un premier temps, l'implication des dommages de l'ADN et du stress oxydant dans la pathophysiologie de la FSHD. Nous avons mis en évidence l'omniprésence de ces caractéristiques cellulaires dans les myoblastes FSHD, leur lien à l'expression aberrante de *DUX4* et leur participation à la morphologie défectueuse des myotubes FSHD in *vitro*. Dans un second temps, le travail de thèse a consisté à concevoir et à développer des outils de l'édition génomique et épigénomique, capables de cibler spécifiquement un des évènements génétiques causal de la FSHD, le variant pathogénique 4qA161 touchant un site d'attachement à la matrice nucléaire, FR-MAR. A partir de ces outils développés, deux stratégies de corrections génomique et épigénomique à visée thérapeutique peuvent être alors envisagées *in vitro*, ayant pour but ultime de rétablir la fonction d'insulation de FR-MAR et la conformation chromatinienne de la région 4q35.

Title : Molecular mechanisms and *in vitro* genome correction strategies of Facioscapulohumeral Dystrophy

Keywords: FSHD, DUX4, DNA damage, oxidative stress, myogenic differentiation, CRISPR/Cas9.

Abstract: Facioscapulohumeral dystrophy (FSHD) is one of the most common genetic myopathies characterized by a progressive and asymmetric weakening of a specific group of skeletal muscles, typically facial, shoulder girdle and upper arms muscles. FSHD is a multifactorial disease that results from the combination of genetic and epigenetic events mapped at the 4q35 locus. These genetic and epigenetic alterations lead to chromatin relaxation and the subsequent overexpression of the majority of 4q35 genes, notably *DUX4*, the major actor in FSHD pathology. These genomic alterations lead to molecular and cellular defects observed *in vitro*. Cultured-FSHD myoblasts show a distinct transcription profile, they exhibit morphological differentiation defects and are sensitive to oxidative stress. Several aspects of the disease remain poorly understood, and the elaboration of an appropriate therapeutic strategy is limited by the complexity of this myopathy. However, the discovery of genome editing tools and their successful therapeutic applications *in vitro* and in animal models of several human diseases, including myopathies, open doors to potential therapeutic strategies for FSHD.

This work highlighted the involvement of DNA damage and oxidative stress in the pathophysiology of FSHD, by revealing their constitutive presence in FSHD myoblasts, their link to *DUX4* expression and their participation in morphological defects of FSHD myotubes observed *in vitro*. The second part of this work was aimed at developing genome- and epigenome-editing tools capable of specifically targeting one of the genetic events causing FSHD, a pathogenic variant 4qA161 that contains an insulator and a nuclear matrix attachment site (FR-MAR). These engineered tools will be then used to develop *in vitro* therapeutic strategies, with the intention of restoring the insulator activity of FR-MAR and the chromatin organization of 4q35 locus.