HAL open science

Correction de l'ADN in vitro et in vivo comme thérapie personnalisée pour les myopathies congénitales

Aymen Rabai

To cite this version:

Aymen Rabai. Correction de l'ADN in vitro et in vivo comme thérapie personnalisée pour les myopathies congénitales. Rhumatologie et système ostéo-articulaire. Université de Strasbourg, 2018. Français. NNT : 2018STRAJ117 . tel-04416462

HAL Id: tel-04416462

https://theses.hal.science/tel-04416462

Submitted on 25 Jan 2024

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

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

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

École doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

[Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire

CNRS UMR 7104 – INSERM U 964]

THÈSE présentée par :

Aymen RABAI

soutenue le : **16 octobre 2018**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie et de la santé

Correction de l'ADN *in vitro* et *in vivo* comme thérapie personnalisée pour les myopathies congénitales

THÈSE dirigée par :

M. LAPORTE Jocelyn	Docteur, université de Strasbourg
Mme. COWLING Belinda	Docteur, université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

M TIRET Laurent	Professeur, école nationale vétérinaire d'Alfort
M GACHE Vincent	Docteur, université de Lyon

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme. FRIANT Sylvie	Docteur, université de Strasbourg
M. CONCORDET Jean-Paul	Docteur, musée national d'histoire naturelle (Paris)

Université de Strasbourg

Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire

CNRS UMR 7104 – INSERM U 964

THESE

Présentée en vue d'obtention du grade de

Docteur de l'université de Strasbourg

Discipline: Sciences de la vie et de la santé

par

Aymen RABAI

Correction de l'ADN *in vitro* et *in vivo* comme thérapie personnalisée pour les myopathies congénitales

Soutenue le 16 octobre 2018, devant la commission d'examen composée de:

Rapporteurs:
M. le docteur Laurent TIRET
M. le docteur Vincent GACHE

Examinateurs:
Mme. le docteur Sylvie FRIANT
M. le docteur Jean-Paul CONCORDET

Directeur de thèse
M. le docteur Jocelyn LAPORTE

Co-Directeur de thèse
Mme. le docteur Belinda COWLING

Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier les membres du jury pour tout l'honneur que vous m'accordez en acceptant d'évaluer mon projet de thèse, le Dr. **Sylvie Friant**, le Dr. **Jean-Paul Concordet**, le Dr. **Laurent Tiret** et le Dr. **Vincent Gache** pour avoir accepté mon invitation et m'avoir accordé du temps pour l'évaluation mon travail. Je souhaite aussi remercier le Dr. **Bernardo Reina San Martin** qui a participé avec le Dr. **Jean-Paul Concordet** au suivi de mon projet lors de la commission de mi-thèse. Vos conseils et critiques pertinents m'ont aidé à bien orienter mon projet.

A **Jocelyn**, mon chef d'équipe,
Pour m'avoir accueilli dans ton laboratoire de recherche, pour la confiance que tu as toujours accordée à mon travail, pour ton soutien et tes encouragements tout au long de ma thèse.

A **Belinda**
Merci d'avoir codirigé ma thèse, ton aide et tes précieux conseils

A **Anne-Sophie**
Mon mentor en sciences, merci d'avoir encadré mon projet au cours de la 1ère année et d'avoir continué de le superviser même après avoir quitté l'équipe. Grâce à toi j'ai bien appris à avoir tous les contrôles positifs et négatifs pour valider un résultat. Je ne te remercierai jamais assez pour toute ton aide (protocoles qui marchent toujours), ton soutien et d'avoir corrigé ma thèse en un temps record.
Cette thèse est pour moi l'occasion de t'exprimer ma plus grande admiration.

A **Johann**,
C'est grâce ton intervention lors d'une UE de mon master que je me suis intéressé à la génétique humaine et que j'ai postulé un stage de master au labo. Merci d'avoir encadré mon projet de master (STIM1).

A **Cricri**,
Le soleil rayonnant de l'équipe, toujours prête à nous aider malgré les 3678 souris à génotyper. Merci pour ta bonne humeur inépuisable. Grâce à toi j'ai appris qu'il faut (ou pas) mettre la charrue avant les bœufs.

A **Pascalou**,
Par où commencer ? Picons, mix-grill, Café Grognon ? Les apéros chez toi ? Les soirées ? Heureusement que tu as rejoint l'équipe !!! Merci pour tous les moments exceptionnels, les blagues, fou-rires (SFM Colmar) etc... Merci pour ta gentillesse sans limite et ta joie de vivre.

A **Vale**,
Labellissima#lameravigliosa#lamigliore#lafashionestamilanesa#lafeminista
Grazie mille pour ta joie et ta bonne humeur et toute ton aide pour mes manipes souris.

A **Amandine**,
Merci d'avoir partagé ma souffrance CRISPR/Cas9, ton soutien et tes encouragements pendant la rédaction de ma thèse. Maintenant que tu as obtenu de l'HDR, tu vas avoir toutes les mutations possibles, disons 15000 sans exagérer. Certes.

A **Xavière**,
Notre généticienne à qui aucune mutation n'échappe. J'ai bien appris de ta persévérance. Merci pour ta joie et pour toutes les soirées qu'on a passées.

A **Alexia**,
Merci de m'avoir initié au monde du volontariat et pour ton aide pour l'extraction des ARN.

A **Maxime**,
C'est l'histoire d'une euuuuh... Merci pour tes blagues et tes précieux conseils en statistiques.

A **Roberto**,
Merci pour les discussions interminables et tous les produits ibériques super bons.

A **Xenia**,
Merci pour tes conseils concernant la DNM2, tu vas devenir l'experte de cette protéine, si tu ne choisis pas une carrière de footballeuse professionnelle.

A **Raquel**,
Ma voisine de paillasse, merci d'être toujours souriante et tes chansons espagnoles

A tous les membres de la **« MAD » team**,
Vasu, Sarah (X2), Inès, Evelina, merci pour ces moments qu'on a partagés.

A **Suzie**,
Merci de m'avoir appris les bonnes expressions françaises surtout les moins habituelles.

A **Catherine**,
Merci pour ton aide quand je venais de démarrer dans l'équipe.

Je remercie aussi tous les membres des plateformes de l'igbmc qui nous facilitent la vie. **Claudine** et **Muriel** de la plateforme FACS pour votre patience et votre aide quand j'arrivais avec mes 0,5% de cellules GFP. Le **service de culture cellulaire** pour son efficacité. Le service de biologie moléculaire notamment **Paola** pour les clonages et **Pascale** pour la production d'AAV. La **plateforme d'imagerie** pour toutes les formations sur les différents microscopes.

A mon âme-sœur, ma deuxième moitié, **Nedra**,
Tu as toujours été ma source d'inspiration et de motivation. Malgré les 500 Km qui nous séparaient, tu as toujours été patiente et bienveillante pendant ces trois années de thèse.

A mon petit frère **Khalil**,
Merci de m'avoir appris à déstresser et décompresser (de temps en temps hein) pour pouvoir mieux avancer.

A ma chère maman **Samia** et mon cher papa **Mongi**,
Pour votre soutien inconditionnel, sans limites. Je vous dois tout ce que j'ai pu accomplir. Vous m'avez accordé tout votre amour qui a été la véritable locomotive de tout ce que j'entreprenais.

Liste des abbréviations

AAV : Adeno associated virus

Aβ : protéine β-amyloîde

AP : Adaptator protein

Actine G, Actine F : Actine globulaire, filamenteuse

AD : Autosomique dominante

ALR : Autolysosome reformation

Apo : Apolipoprotéine

ARNi : ARN interférence

BafA1 : Bafilomycine A1

BIN1 : Brindging integrator 1

BSE : Bundle signalling element

CALM : Calmoduline

CDK4 : Cyclin-dependant kinase 4

CFP : Cyan fluorescent protein

CNM : Centronuclear myopathies

CNM-DNM2 : myopathie centronucléaire liée à DNM2

crARN : CRISPR ARN

CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

dCas9 : Dead Cas9

DLP : Dynamin-like proteins

DNA-PK : DNA protein kinase

DNM2 : Dynamine 2

Drp : Dynamin-related protein

GFP : Green fluorescent protein

GAP : GTPase-activating proteins

GEF : Guanine nucleotide exchange factor

GLUT4 : Glucose transporter 4

HBB : Hémoglobine β

HDR : Homology-directed repair

HE : Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine

HMZ : Homozygote

HTT : Huntington

Indel : Insertion-délétion

KI : Knock-in

KO : Knock-out

LDL : Low-density lipoprotein

MMEJ : Microhomology-mediated end-joining

MTM1 : Myotubularine 1

NADH-TR : Coloration nicotinamide-adénine-dinucléotide-tétrazolium réductase

NHEJ : Non-homologous end-joining

PAM : Protospacer Adjacent Motif

PD-1 : Programmed cell death protein 1

PH : Plekstrin homology

pRb : Protéine du rétinoblastome

PRD : Proline rich domain

RH : Recombinaison homologue

sgARN : Single-guide ARN

shARN : Short hairpin ARN

siARN : Small interference ARN

SNP : Single-point polymorphism

SNX-9 : Sorting Nexin 9

SpCas9 : Cas9 de *Streptococcus pyogenes*

TA : Tibialis antérieur

T-Ag : Antigène T du virus SV40

TERT : Télomérase transcriptase réverse

TIRF : Microscopie de fluorescence par réflexion totale interne

tracrARN : Trans-activating CRISPR ARN

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

WT : Wild-type

Résumé

Les myopathies centronucléaires (CNM pour centronuclear myopathies) constituent des affections musculaires très rares appartenant au large groupe des myopathies congénitales. Des mutations hétérozygotes au niveau du gène codant pour la dynamine 2 (*DNM2)* causent une forme à transmission autosomique dominante de cette myopathie, due à un gain de fonction. A ce jour il n'existe aucun traitement spécifique pour les CNM. Théoriquement, le moyen le plus efficace serait de corriger directement les mutations en cause et ce le plus tôt possible au cours du développement de la maladie. Aujourd'hui les technologies innovantes de correction du génome utilisant des nucléases guidées constituent une alternative prometteuse qui permettrait de corriger directement la mutation, donc la cause de la pathologie, notamment pour des maladies dominantes où la complémentation génique n'est pas adaptée. L'outil le plus prometteur de cette famille de nucléases est la classe d'endonucléases CRISPR/Cas9 qui ciblent une séquence bien définie du génome grâce à un guide ARN. Cette enzyme coupe l'ADN double brin ce qui sollicite la machinerie cellulaire de réparation de l'ADN. La voix majoritaire de réparation de l'ADN consiste à liguer de manière aléatoire les 2 bouts. C'est la voix du **NHEJ** (Non homologous end-joining). En outre, l'addition d'une matrice d'ADN homologue favorise la réparation homologue dirigée, **HDR** (Homology directed repair), et l'insertion de la séquence souhaitée. Cet outil de correction du génome, qui provient à la base du système immun adaptatif de certaines bactéries telles que *Staphilococcus aureus* et *Streptococcus pyogenes*, a été très récemment utilisé notamment dans un modèle murin de la Dystrophie de Duchenne mais a été peu validé sur des maladies musculaires impliquant des mutations gain de fonction. De plus, les mutations DNM2 étant des mutations hétérozygotes, le défi de mon projet consiste à cibler de manière spécifique l'allèle muté.

Nous proposons deux stratégies. La première consiste à corriger la mutation de manière à restaurer un allèle sauvage. La seconde approche consiste à inactiver de manière spécifique l'allèle muté. En effet pour ce deuxième point, les travaux de Belinda Cowling, Hichem Tasfaout et Ivana Prokic dans l'équipe ont démontré que la réduction de la DMN2 représente une stratégie thérapeutique potentielle pour les CNM et que la réduction de la DNM2 de 50% n'a pas d'impact phénotypique au moins chez la souris.

Le but de mon projet est de valider la preuve de principe de la correction du génome allèle-spécifique *in vitro* et *in vivo* comme stratégie thérapeutique potentielle pour ces myopathies congénitales.

Modifications du génome allèle-spécifique *in vitro*

Afin de pouvoir tester les différentes stratégies *in vitro*, nous disposons de cellules HeLa sauvages, de fibroblastes de patients immortalisés portant la mutation *DNM2* R465W (mutation la plus fréquente, présente chez 27% des patients mutés dans la DNM2). Nous disposons aussi d'un modèle murin de la pathologie, la souris KI (knock-in) hétérozygote *Dnm2*$^{R465W/+}$, obtenue en collaboration avec l'équipe de Marc Bitoun (Institut de Myologie, Paris). J'ai pu immortaliser des lignées de myoblastes issus de muscles de souris sauvage et KI *Dnm2*$^{R465W/+}$ en insérant le gène CDK4 (Cyclin-Dependant Kinase 4) après infection et

intégration d'un lentivirus (fourni par l'équipe de Vincent Mouly, Institut de Myologie Paris). Étant donné que les cellules de souris expriment constitutivement la Télomérase transcriptase réverse, l'intégration du gène CDK4 contribue à l'immortalisation de ces myoblastes. J'ai ensuite validé le potentiel myogénique de ces lignées immortalisées. Toutes les lignées se différencient en myotubes après 7 jours de différentiation. Nous avons mis en place les plasmides exprimant la Cas9-GFP et les guides ARN ciblant la mutation *Dnm2* R465W (2 guides allèle-spécifiques et 1 guide pan-allélique (en collaboration avec l'équipe de Bernardo Reina San Martin à l'IGBMC). Le guide ARN allèle-spécifique reconnaît la séquence mutée en 3' du PAM (Protospacer Adjacent Motif), une séquence indispensable à l'activité de la Cas9. Nous avons conçu et acheté la matrice de réparation sous forme d'oligonucléotides simple brin (chez IDT ®). Cette matrice contient des mutations silencieuses permettant d'introduire des sites de restriction afin de repérer les cellules corrigées par la voix de recombinaison homologue. Ainsi le profil de la PCR ciblant la région d'intérêt, digérée par les enzymes de restriction, sera un indicateur de la correction homologue dirigée.
J'ai testé l'allèle-spécificité des différents guides ARN dans les fibroblastes de patient portant la mutation hétérozygote DNM2 R465W et les myoblastes immortalisés de la souris KI *Dnm2*$^{R465W/+}$. L'analyse des clones de fibroblastes de patient montre qu'en utilisant un des guides ARN dirigé contre la séquence mutée, on obtient une modification de l'ADN dans 60% des clones. Dans tous les clones « modifiés », seul l'allèle muté a été ciblé et inactivé de manière spécifique. Par ailleurs, pour cette lignée, je n'ai pas obtenu de clones avec une modification précise (HDR) de la région d'intérêt *DNM2*.
L'analyse des clones de myoblastes de souris montre une modification de l'ADN de 94 et 96% avec les 2 guides ARN allèle-spécifiques et que seul l'allèle muté a été modifié ce qui confirme l'efficacité et la spécificité des guides utilisés. Dans les clones présentant des indels avec décalage de phase, le niveau de DNM2 a été diminué autour de 50% ce qui suggère l'introduction d'un codon stop et la production d'une protéine tronquée qui n'est pas stable. Dans les clones corrigés ou présentant une délétion sans décalage de phase, le niveau de DNM2 était inchangé.
J'ai pu ainsi tester et valider des guides ARN qui ne ciblent que l'allèle muté et cette spécificité se traduit par une inactivation et une correction allèle-spécifique.

L'inactivation spécifique de l'allèle muté corrige des phénotypes cellulaires liés à DNM2

La DNM2 est une GTPase ubiquitaire impliquée dans plusieurs processus biologiques dont la plus décrite est la fission des vésicules lors de l'endocytose. Afin d'évaluer l'impact de la mutation R465W sur l'endocytose, j'ai mesuré l'intensité du signal de la transferrine couplée à la CY3 dans les lignées de myoblastes immortalisés de souris WT et KI *Dnm2*$^{R465W/+}$ après 10 et 20 minutes d'internalisation. Les lignées KI *Dnm2*$^{R465W/+}$ montrent une augmentation de la transferrine internalisée. Ce phénotype est décrit pour la 1ère fois dans les myoblastes de souris KI *Dnm2*$^{R465W/+}$ et il est en cohérence avec notre hypothèse de mutations gain de fonction qui causent la forme autosomique dominante de la myopathie centronucléaire. D'autres études ont décrit l'impact des mutations CNM-DNM2 sur l'endocytose. Ces mutations diminueraient l'internalisation de la transferrine ou n'auraient pas d'effets statistiquement significatifs. Leurs conclusions étaient basées sur des observations réalisées

dans des fibroblastes de patients ou en sur-exprimant la protéine mutante. Nos résultats ont été obtenus dans des myoblastes, des cellules dérivant du tissu malade, exprimant des niveaux endogènes de la DNM2 mutée et sauvage. Cette augmentation de l'internalisation de la transferrine a été normalisée dans différents clones où l'allèle muté a été inactivé (NHEJ) ou corrigé (HDR).

Schulze *et al.* ont relevé le rôle de la DNM2 dans l'autophagie, un processus biologique de dégradation des protéines notamment lors de l'adaptation cellulaire à un milieu pauvre en nutriment. Dans les conditions basales, les myoblastes KI *Dnm2*$^{R465W/+}$ montrent une accumulation du marqueur de l'autophagie LC3-II. Le traitement par l'inhibiteur de la dégradation par les autolysosomes (BafA1) induit une augmentation de LC3-II. Cette augmentation a été de 4 fois dans les myoblastes WT et de 1,8 dans les myoblastes KI *Dnm2*$^{R465W/+}$ ce qui suggère un défaut d'autophagie dans ces myoblastes. En cultivant les cellules dans un milieu pauvre en nutriment afin de stimuler l'autophagie, la BafA1 a induit une augmentation de LC3-II qui n'était pas statistiquement significative entre les myoblastes WT et KI *Dnm2*$^{R465W/+}$. En prenant en compte ces deux observations, la mutation *Dnm2* R465W ralentirait la dégradation du contenu des autolysosomes. Ce phénotype a été décrit partiellement dans des fibroblastes embryonnaires de souris portant la mutation *Dnm2* R465W à l'état homozygote. L'inactivation ou la correction allèle-spécifique de la mutation *Dnm2* R465W dans les myoblastes de souris ont corrigé le défaut d'autophagie.

J'ai pu ainsi caractériser deux phénotypes cellulaires (endocytose et autophagie) dérégulés par la mutation DNM2 R465W dans les myoblastes murins. L'inactivation ou la correction allèle-spécifique de la mutation hétérozygote a corrigé ces phénotypes.

Modifications du génome allèle-spécifique *in vivo*

Afin de tester si cette stratégie est applicable *in vivo*, j'ai transféré l'outil CRISPR/Cas9 aux souris hétérozygotes KI *Dnm2*$^{R465W/+}$ à l'aide d'un croisement avec une souris qui exprime Cas9-GFP de manière constitutive et en injectant de vecteurs viraux AAV exprimant le guide ARN-matrice de réparation. Les injections ont été réalisées directement dans le muscle tibial antérieur à l'âge de 3 semaines. A l'âge de deux mois, j'ai prélevé le muscle afin de mesurer 2 paramètres : les modifications génomiques au niveau de l'ADN et la réduction du niveau protéique de la DNM2. Au niveau de l'ADN, CRISPR/Cas9 induit majoritairement des insertion-délétions (indels) par la voie du NHEJ. Les résultats préliminaires par analyse des hétéroduplexes sur gel d'acrylamide montrent que cette efficacité varie entre 12 et 46% avec des modifications mineures sur l'allèle WT (0,5 à 3,3%) suggérant que cette approche pourrait modifier l'ADN génomique de *Dnm2 in vivo* de manière allèle-spécifique. Les muscles injectés présentent une réduction du niveau protéique de DNM2.

Table des matières

Résumé.....7
Table des matières.....10
1 Introduction 13
1.1 Les myopathies centronucléaires 13
1.1.1 Les myopathies congénitales.....13
1.1.2 Les myopathies centronucléaires 13
1.1.3 La myopathie centronucléaire à transmission autosomique dominante liée à DNM2 15
1.1.3.1 Symptômes cliniques.....15
1.1.3.2 Caractéristiques histo-pathologiques 15
1.1.3.3 Corrélation phénotype-génotype 16
1.1.4 La dynamine 2 16
1.1.4.1 La famille des dynamines.....17
1.1.4.2 Les mutations *DNM2* dans les pathologies humaines 19
1.1.4.3 Hypothèses physiopathologiques (CNM-DNM2) : relation mutation-structure-activité de DNM2 20
1.1.4.4 Rôles de DNM2.....21
1.1.4.4.1 Endocytose 21
1.1.4.4.2 Interaction avec le cytosquelette.....22
1.1.4.4.3 Trafic intracellulaire.....23
1.1.4.4.4 Mitochondries 24
1.1.4.4.5 Régulation de l'autophagie.....25
1.1.4.5 La souris KI *Dnm2*$^{R465W/+}$ pour étudier la physiopathologie de la myopathie centronucléaire AD 25
1.1.4.6 Développement préclinique de thérapies contre la myopathie centronucléaire AD 26
1.2 Edition du génome : nouvelle ère du génie génétique.....28
1.2.1 Le système CRISPR/Cas9.....28
1.2.1.1 Historique 28
1.2.1.2 Le système CRISPR/Cas de type II 31
1.2.1.3 CRISPR/Cas9 et immunité adaptative bactérienne.....32
1.2.1.4 Mécanisme d'action pour l'édition du génome.....33
1.2.1.5 Mécanismes endogènes de réparation de l'ADN 35
1.2.1.5.1 La voie du NHEJ 35
1.2.1.5.2 La recombinaison homologue.....37

1.2.1.5.3 Applications des voies de réparation de l'ADN à l'édition du génome..37
1.2.1.6 Les variants du système CRISPR/Cas9 38
1.2.1.6.1 Les variants naturels.....38
Les modifications artificielles de la Cas9 39
1.2.1.6.2.....39
1.2.1.6.2.1 La nCas9 « nickase » 39
1.2.1.6.2.2 La dCas9 « dead » 39
1.2.1.6.2.3 La dCas9 « fusion » 40
1.2.1.6.2.4 La dCas9 couplée à une désaminase 40
1.2.1.6.2.5 La HiFi Cas9 « High Fidelity ».....41
Les applications du système CRISPR/Cas9 41
1.2.1.7 41
1.2.1.7.1 Génération de modèles animaux.....41
1.2.1.7.2 Études fonctionnelles : imagerie, transcription.....42
1.2.1.7.3 Stratégies thérapeutiques 42
1.2.1.7.3.1 Les stratégies *ex-vivo* 43
1.2.1.7.3.2 Les Stratégies *in vivo*.....45
1.2.1.8 Limitations du système CRISPR/Cas9 46
1.2.1.8.1 Les effets hors-cibles « off-target ».....46
1.2.1.8.2 Faible efficacité de la voie HDR.....48
1.2.1.8.3 Vectorisation du système CRISPR/Cas9.....48
1.2.2 Enjeux bioéthiques liés à l'utilisation de CRISPR/Cas9 49
2 Contexte et objectifs de la thèse.....52
3 Matériels et méthodes (non publiés) 54
4 Résultats.....57
4.1 Inactivation et correction allèle-spécifique de la mutation DNM2 R465W in cellulo 57
4.1.1 Contexte de l'étude.....57
4.1.2 Résultats 58
4.1.3 Résultats non publiés 59
4.1.3.1 Détection de l'HDR dans un pool cellulaire 59
4.1.3.2 Augmenter l'HDR.....60
4.1.3.3 État redox mitochondrial.....60
4.1.3.4 Polymérisation de l'actine 61
4.1.4 Contributions : 61
4.2 Participation à la publication.....87

4.2.1 Contexte de l'étude 87
4.2.2 Résultats 87
4.2.3 Contributions : 87
4.3 Participation à l'étude du rôle de BIN1 dans la régulation de DNM2 pour la maturation du muscle. 104
4.3.1 Contexte de l'étude 104
4.3.2 Résultats 104
4.3.3 Contributions 105
4.4 Edition du génome *in vivo* 117
5 Discussion et perspectives 119
5.1 Les myoblastes immortalisés comme modèle cellulaire pour étudier l'impact des mutations CNM-DNM2 119
5.2 Mécanismes pathologiques cellulaires de la myopathie centronucléaire à transmission autosomique dominante 121
5.2.1 Endocytose 121
5.2.2 Autophagie 124
5.2.3 Impact de la mutation DNM2 sur la polymérisation de l'actine et l'état redox mitochondrial 127
5.3 Inactivation et correction allèle-spécifique de la mutation DNM2 R465W 129
5.3.1 Dans les cellules humaines 129
5.3.2 Dans les cellules murines 130
5.3.3 Effet de l'inactivation ou la correction allèle spécifique de la mutation DNM2 R465W 131
5.4 Edition du génome *in vivo* 132
5.5 Moduler le système CRISPR/Cas9 134
6 Conclusion générale 135
7 Liste des figures et tableaux 136
8 Bibliographie 137

1 Introduction

1.1 Les myopathies centronucléaires

1.1.1 Les myopathies congénitales

Les myopathies congénitales regroupent un large groupe hétérogène de maladies musculaires qui peuvent se manifester à la naissance ou plus tardivement. Les myopathies congénitales sont non-dystrophiques. En effet ces pathologies ne présentent pas ou peu de boucles de dégénération-régénération qui aboutissent au remplacement du tissu musculaire par du tissu adipeux et fibreux. La structure de la fibre musculaire est souvent modifiée, entraînant une faiblesse musculaire. Les myopathies congénitales sont classées selon les caractéristiques histopathologiques (Romero and Clarke 2013). On distingue ainsi trois groupes majeurs de myopathies congénitales :

- Les myopathies à némaline : caractérisées par la présence de « corps à némaline » ou « bâtonnets » au niveau de la biopsie musculaire. Ces structures représentent des agrégats d' α-actinine et autres protéines cytoplasmiques.
- Les myopathies avec cores : caractérisées par des zones anormales sans mitochondrie et donc par l'absence d'activité oxydative. Ces zones sont appelées « cores ». On distingue les cores centraux et les mini-cores.
- Les myopathies centronucléaires : caractérisées par une proportion importante de myofibres avec une localisation anormale des noyaux au centre de la fibre.

1.1.2 Les myopathies centronucléaires

Les myopathies centronucléaires (CNM) présentent des symptômes cliniques très hétérogènes. L'apparition de la maladie varie de la naissance à l'âge adulte avec des sévérités allant d'une hypotonie généralisée et très sévère chez le nouveau-né à une faiblesse musculaire modérée chez l'adulte (Romero 2010).

Trois formes de myopathies centronucléaires ont été décrites selon le mode de transmission : liée au chromosome X, autosomique récessive (AR) et autosomique dominante (AD).

La myopathie centronucléaire liée au chromosome X, appelée aussi myopathie myotubulaire, est la forme la plus sévère et la plus fréquente des myopathies centronucléaires. En France, son incidence est de 1 garçon sur 50.000 nouveau-nés (Jungbluth, Wallgren-Pettersson et al. 2008). La maladie se déclare souvent à la naissance avec une hypotonie très sévère, une paralysie faciale, une ophtalmoplégie, un ptosis, *etc*… L'affection engageant le pronostic vital reste l'insuffisance respiratoire qui nécessite souvent une assistance respiratoire et une trachéotomie (McEntagart, Parsons et al. 2002).

Cette forme de myopathie centronucléaire est due principalement à des mutations au niveau du gène *MTM1* (Hu, Laporte et al. 1996, Laporte, Hu et al. 1996, Smolenicka, Laporte et al. 1996) qui code pour une enzyme (MTM1) qui déphosphoryle des phospholipides membranaires.

La myopathie centronucléaire à transmission autosomique récessive présente des symptômes cliniques variables, avec une apparition prédominante à l'enfance. Les patients souffrent de retard moteur et présentent une atrophie et une faiblesse musculaire diffuse qui touchent préférentiellement les muscles proximaux. Un ptosis et une ophtalmoplégie sont souvent présents. Notre laboratoire a identifié des mutations au niveau du gène *BIN1* (Bridging Integrator-1) responsables de cette forme (Nicot, Toussaint et al. 2007). *BIN1* code pour une protéine ubiquitaire Amphiphysine 2 / BIN1 impliquée dans la courbure et la tubulation des membranes plasmiques.

La myopathie centronucléaire à transmission autosomique dominante est due aux mutations au niveau du gène codant pour la dynamine 2 (DNM2) et BIN1 (Bitoun, Maugenre et al. 2005, Bitoun, Bevilacqua et al. 2007, Bohm, Biancalana et al. 2012) (Kouwenberg, Bohm et al. 2017). Kouwenberg *et al*. ont décrit une famille une mutation BIN1 V18G. Les patients

présentaient une faiblesse musculaire proximale modérée, une myalgie, une intolérence à l'exercice et un défaut cognitif. Mon projet de thèse de doctorat est focalisé sur la myopathie centronucléaire liée à DNM2 dont je détaillerai les principales caractéristiques dans le sous-chapitre suivant.

1.1.3 La myopathie centronucléaire à transmission autosomique dominante liée à DNM2

1.1.3.1 Symptômes cliniques

Les patients atteints de myopathie centronucléaire à transmission AD liée à DNM2 présentent des phénotypes variables. Les formes sévères se déclarent à l'enfance alors que les formes adultes sont modérées. Le tableau clinique du phénotype classique correspond à une forme modérée de la maladie chez l'adolescent et l'adulte avec un retard moteur tel que la marche et la course, une faiblesse musculaire modérée, et une opthalmoplégie (Bitoun, Bevilacqua et al. 2007). Pour les cas les plus sévères, s'ajoutent une hypotonie, une faiblesse faciale avec « bouche ouverte » (Figure 1A), un ptosis, une faiblesse musculaire généralisée ainsi que des affections plus prononcées telle que la scoliose et l'atrophie musculaire. Certains patients présentent un défaut cognitif et des atteintes axonales périphériques modérés (Echaniz-Laguna, Nicot et al. 2007).

1.1.3.2 Caractéristiques histo-pathologiques

Les biopsies musculaires montrent une localisation anormale des noyaux au centre des fibres musculaires (Figure 1B), un réarrangement sarcoplasmique radial sous forme de « rayons de roue » (Figure 1C-D) visible après coloration NADH-TR, qui n'est pas observé chez les autres formes de CNM, et une hypotrophie des fibres musculaires avec une prédominance des fibres de type I (Romero and Bitoun 2011).

La structure des triades est souvent conservée et les noyaux centralisés ne présentent pas d'aberrances morphologiques après analyse en microscopie électronique.

1.1.3.3 Corrélation phénotype-génotype

Plusieurs mutations au niveau du gène *DNM2* ont été identifiées par le Dr. Marc Bitoun (Bitoun, Maugenre et al. 2005, Bitoun, Bevilacqua et al. 2007), puis par notre laboratoire (Bohm, Biancalana et al. 2012) (Figure 2) : E368K/Q, R369Q/W, F372C, V375G, R465W, R522C/H, R523G, E540K, E560K, D614N, A618D/T, S619L/W, L621P, V625del, P627H/R et E650K. La mutation R465W est la plus fréquente (27%) et les patients présentent une forme modérée de la maladie. La mutation S619L est la plus sévère avec un tableau clinique proche des patients souffrant de myopathie centronucléaire liée au chromosome X. Le tableau 1 classifie les mutations DNM2 selon leurs sévérités. De manière générale, les mutations situées dans le domaine PH (Pleskstrin Homology) de la DNM2 sont les plus sévères.

1.1.4 La dynamine 2

Le gène *DNM2* (19p13.2), localisé dans le bras court du chromosome 19, code pour une mécano-enzyme, la dynamine 2, qui appartient à la superfamille des GTPases larges (Ferguson and De Camilli 2012). Le gène est composé de 22 exons et la protéine comporte entre 866 et 870 acides aminés. Il existe 6 isoformes produites par épissage alternatif dont une isoforme musculaire (résultats non publiés). En solution, elle se présente sous forme de tétramère. Cette famille des DLP (Dynamin-Like Proteins) comporte des dynamines et des protéines appelées « dynamin-related » impliquées dans plusieurs processus biologiques tels que l'endocytose (Warnock, Baba et al. 1997), l'exocytose (Di, Nelson et al. 2003), le remodelage membranaire (Oh, McIntosh et al. 1998, Galkina, Fedorova et al. 2015), l'interaction avec le cytosquelette (McNiven, Kim et al. 2000), l'autophagie (Schulze, Weller et al. 2013) et la division mitochondriale (Lee, Westrate et al. 2016).

1.1.4.1 La famille des dynamines

La dynamine a été découverte comme GTPase qui a été co-purifiée avec des microtubules du cerveau (Shpetner and Vallee 1989). Chez les mammifères, il existe trois gènes *DNM* : *DNM1*, *DNM2* et *DNM3*. Les trois DNM présentent 80% d'homologie et partagent la même organisation (Ferguson and De Camilli 2012). Elles diffèrent des autres membres de la superfamille des GTPases par leur haut poids moléculaire (environ 100 kDa), une activité GTPasique endogène importante et une faible affinité pour le GTP (10-100 µM) (Muhlberg, Warnock et al. 1997). DNM1 est exprimée dans les neurones (Shpetner and Vallee 1989, Obar, Collins et al. 1990, Chen, Obar et al. 1991) (Romeu and Arola 2014), DNM3 est exprimée dans préférentiellement dans le cerveau, les testicules et les poumons (Romeu and Arola 2014). Seule la DNM2 est ubiquitaire, mais de manière paradoxale les mutations au niveau du gène *DNM2* causent deux maladies non systémiques : la myopathie centronucléaire et une neuropathie périphérique appelée maladie de Charcot-Marie-Tooth (Zuchner, Noureddine et al. 2005).

Chez les invertébrés, il existe une seule dynamine, ce qui pourrait suggérer l'aspect « gène de ménage » de DNM2 et la spécialisation des autres dynamines dans des processus cellulaires au niveau des tissus de prédilection de DNM1 et/ou DNM3.

Toutes les dynamines partagent la même organisation et se composent des domaines suivants (Figure 2) :

- **Le domaine G / GTPase** qui interagit et hydrolyse le GTP. Il s'agit du domaine le plus conservé dans la famille des dynamines (Warnock, Baba et al. 1997).
- **Le domaine intermédiaire « middle domain » :** responsable de la dimérisation de DNM de manière « croisée » et donnant un dimère avec une orientation opposée des domaines G (Ferguson and De Camilli 2012).
- **Le domaine d'homologie à la Pleckstrine « PH domain »** : interagit avec des phospholipides localisés dans la face cytosolique de la membrane plasmique et le

phosphatidyl-inositol-4,5-biphosphate (PtdIns(4,5)P_2), ce qui permet le recrutement de DNM à la membrane. Cette liaison est de faible affinité. Il permet aussi de réguler l'activité GTPasique en régulant l'oligomérisation (Reubold, Faelber et al. 2015). Il a été suggéré que quand le domaine PH est lié au domaine intermédiaire et domaine G, il constituerait un état « fermé » qui inhiberait l'activité de la DNM (Muhlberg, Warnock et al. 1997). La liaison du domaine PH à la membrane activerait la polymérisation et l'hydrolyse du GTP (Hohendahl, Roux et al. 2016). Une boucle hydrophobe pourrait promouvoir les interactions avec des membranes ainsi que leur courbure.

- **Le domaine GED** (GTPase Effector Domain) : interagit avec le domaine GTPase et l'active. A la différence des autres GTPases de la famille RAS, les dynamines ne nécessitent pas de GAP et GEF (GTPase-Activating Proteins, Guanine nucleotide Exchange Factor). Grâce au domaine GED, les dynamines sont auto-activables (Sweitzer and Hinshaw 1998).
- **Le domaine riche en proline « PRD domain »** : permet l'interaction des dynamines avec des protéines possédant un domaine SH3 (endophilines, amphiphysines, SNX, syndapines) (McPherson, Takei et al. 1994, David, McPherson et al. 1996, Hohendahl, Roux et al. 2016) et ainsi coordonner les fonctions des dynamines avec ces autres effecteurs. Ce domaine est le moins conservé entre les différentes dynamines permettant des propriétés de liaison à différents partenaires.

La fonction des dynamines la plus étudiée est la fission membranaire. Initialement, le mécanisme d'action proposé consiste en la polymérisation autour d'une courbure membranaire suivie de l'hydrolyse du GTP qui a pour effet une constriction et un étirement de la membrane et ainsi une fission (Ferguson and De Camilli 2012). Des études récentes

(Figure 3) en cristallographie et microscopie cryo-électronique ont montré que la dimérisation du domaine G est essentielle à l'activité GTPase. Cette dimérisation nécessite l'interaction de domaines adjacents de l'hélice formée par la DNM. Un polymère de DNM s'enroule autour de la membrane et peut ainsi se connecter et interagir avec un autre polymère. Enfin l'hydrolyse du GTP par le domaine G entraîne un mouvement de « levier » du domaine adjacent ce qui entraine à son tour une vague de constriction des hélices DNM. Ainsi la vésicule est libérée par fission membranaire.

1.1.4.2 Les mutations *DNM2* dans les pathologies humaines

Outre la myopathie centronucléaire à transmission AD, d'autres mutations *DNM2* ont été rapportées causant la neuropathie périphérique de Charcot-Marie-Tooth (CMT) : G358R, G537C, D555del3, K559del, K62E/del, L570H, T855-856del (Gonzalez-Jamett, Haro-Acuna et al. 2014). Cette maladie est caractérisée par une perte de la sensation du toucher, une douleur neuropathique, une faiblesse musculaire et une atrophie et dans certains cas une neutropénie. Les mutations *DNM2* causent la forme axonale de CMT (CMT2) et la forme dominante intermédiaire (DI-CMT-B). La plupart des mutations sont localisées au niveau N-terminal du domaine PH dans une « poche de liaison lipidique » impliquée dans l'interaction de DNM2 avec des membranes lipidiques (Bohm, Biancalana et al. 2012). Elles diminuent la liaison aux phosphoinositides, contrairement aux mutations identifiées chez les patients CNM (Kenniston, Lemmon et al. 2010).

Une étude a rapporté l'implication de DNM2 dans la forme tardive de la maladie d'Alzheimer. L'un des facteurs de risques de cette forme le plus caractérisé est l'allèle ε4 de l'apolipoprotéine E (ApoE), situé dans le bras long du chromosome 19. Les porteurs de cet allèle présentent une accumulation extracellulaire de la protéine β-amyloïde (Aβ). La région 19p13.2 du bras court du chromosome 19 a été suggérée comme locus à risque. Cette région

incluant le gène *DNM2*, des polymorphismes de type SNP dans les introns 1 et 3 ont été associés avec la maladie d'Alzheimer (Kamagata, Kudo et al. 2009). L'expression de DNM2 était réduite chez des patients atteints de la forme tardive de la maladie. La sur-expression du mutant dominant négatif DNM2 K44A entraîne l'augmentation de la sécrétion de Aβ. Des défauts cognitifs ont été rapportés chez les patients atteints de myopathie centronucléaire à transmission AD et portant les mutations E368Q et R465W (Echaniz-Laguna, Nicot et al. 2007).

1.1.4.3 Hypothèses physiopathologiques (CNM-DNM2) : relation mutation-structure-activité de DNM2

DNM2 est une protéine ubiquitaire qui joue un rôle pléiotrope dans divers processus cellulaires. Le mécanisme par lequel des mutations au niveau d'un gène de « ménage » entraînent deux maladies touchant des organes différents, le muscle squelettique et le système nerveux, reste à élucider. Parmi les mutations qui causent la myopathie centronucléaire AD, E368K, R369W, R465W, A618T, S619L et V625del ont été biochimiquement caractérisées (Kenniston and Lemmon 2010, Wang, Barylko et al. 2010, James, Digman et al. 2014, Chin, Lee et al. 2015). *In vitro*, toutes ces mutations montrent une activité GTPasique augmentée et une dissociation dépendante du GTP diminuée comparées à DNM2 sauvage (WT). Les mutants R369W, S619L et V625del s'auto-assemblent plus rapidement. Ces deux activités augmentées peuvent être expliquées par la levée de l'auto-inhibition exercée par le domaine PH de la DNM2. La majorité des mutations CNM-DNM2 sont localisées à l'interface entre le domaine intermédiaire et le domaine PH, changeant la charge ou l'hydrophobie d'un acide aminé. La mutation la plus fréquente (R465W), localisée dans le domaine intermédiaire, perturberait une autre interface intermoléculaire : elle est localisée dans le monomère externe en interface avec l'élément BSE (Bundle Signalling Element) du monomère interne (Reubold, Faelber et al. 2015). La substitution d'un acide aminé polaire et chargé positivement par un

acide aminé hydrophobe pourrait perturber l'auto-inhibition exercée par le domaine PH. DNM2 formerait alors des oligomères anormaux stables. Ainsi, la caractérisation biochimique de certaines mutations CNM-DNM2 suggère le caractère dominant gain de fonction de ces mutations. Cependant, des études fonctionnelles des mutants CNM-DNM2 suggèrent un caractère dominant négatif notamment sur l'endocytose (Bitoun, Durieux et al. 2009, Koutsopoulos, Koch et al. 2011). Cette controverse sera étudiée plus en détail au cours de mon projet de thèse.

1.1.4.4 Rôles de DNM2

1.1.4.4.1 Endocytose

Le rôle des dynamines a été initialement décrit chez les drosophiles Shibire portant des mutations au niveau de l'unique gène *DNM* et provoquant une paralysie sensible à la température (Chen, Obar et al. 1991, van der Bliek and Meyerowitz 1991). Cette paralysie réversible résulte d'une déplétion des vésicules synaptiques due à un défaut d'endocytose conduisant à une accumulation des neurotransmetteurs dans la fente synaptique.

La DNM2 joue un rôle clé dans l'endocytose dépendante de la clathrine. Elle se produit au niveau de sites spécialisés de la membrane plasmique, appelés puits et couverts par un réseau protéique formé de triskèles de clathrine (Hinshaw and Schmid 1995, Takei, McPherson et al. 1995) (Warnock, Baba et al. 1997). La clathrine est un hexamère constitué de trois chaînes lourdes associées à des chaînes légères formant une structure à trois bras appelée triskèle. Lors de l'endocytose, ces triskèles s'assemblent pour constituer des cages creuses (Figure 4). Cet assemblage provoque l'inflexion de la membrane. La spécificité du ciblage et du transport des vésicules est due aux protéines d'adaptation (AP) qui composent cet assemblage. Le complexe AP2 participe à l'endocytose dépendante de la clathrine. La DNM2 joue un rôle dans le bourgeonnement des vésicules en s'assemblant sous forme d'anneau hélicoïdal et en libérant ces vésicules par constriction mécanique. Dans le cytosol, DNM2 forme un complexe

avec SNX9 (Sorting Nexin 9) et fructose-1,6-biphosphate aldolase. Suite à la phosphorylation de SNX9, le complexe SNX9-DNM2 est libéré de l'aldolase et peut être recruté à la membrane via l'interaction avec des phosphoinositides membranaires et d'autres protéines possédant un domaine BAR (Rangarajan, Park et al. 2010). Des études ont montré que la DNM2 co-localise avec la clathrine avant l'internalisation des vésicules de clathrine suggérant, outre leur rôle de fission, un rôle de maturation des puits de clathrine (Loerke, Mettlen et al. 2009).

La plupart des récepteurs d'endocytose possèdent une partie transmembranaire et leur interaction avec le puits de clathrine est régulée par des séquences appelées motifs d'internalisation. Par exemple le motif d'internalisation du récepteur aux LDL est FXNPXY (où X peut être un acide aminé quelconque) et celui du récepteur de la transferrine est YTRF.

La DNM2 participe aussi à l'endocytose indépendante de la clathrine notamment dans la formation des phagosomes et des cavéoles (Shajahan, Timblin et al. 2004). Il s'agit de vésicules pyriformes constituées d'un auto-assemblage de cavéoline. Les cavéoles sont riches en cholestérol et en glycosphingolipides. L'internalisation des cavéoles est régulée par la DNM2.

La DNM2 joue aussi un rôle dans l'internalisation de gouttelettes de milieux extracellulaires accompagnées de portions membranaires. Ce processus est appelé pinocytose (Cao, Chen et al. 2007).

1.1.4.4.2 Interaction avec le cytosquelette

L'interaction de la DNM2 avec le réseau d'actine est importante pour le trafic intracellulaire des vésicules d'endocytose (Ferguson, Raimondi et al. 2009). Elle interagit avec Abp1 (Actin-binding protein 1) et la cortactine qui peut s'assembler avec les filaments d'actine. DNM co-localise avec des protéines du réseau de l'actine telles que N-WASP (Neuronal Wiskott-

Aldrich Syndrome Protein), WAVE et ARP2/3 (Actin-Related Protein 2/3). N-WASP étant un régulateur de la polymérisation de l'actine (Hussain, Jenna et al. 2001), DNM jouerait un rôle dans ce processus. L'interaction avec les protéines régulatrices de l'actine se fait *via* le domaine PRD notamment avec des protéines qui contiennent un domaine CDC42 (Orth and McNiven 2003). Le domaine intermédiaire de la DNM peut lier l'actine F (Mooren, Kotova et al. 2009). L'interaction DNM-actine pourrait contribuer au recrutement de la DNM aux sites d'endocytose mais aussi à la régulation des processus cellulaires dépendant de l'actine tels que la migration cellulaire via la formation de lamellipodes.

DNM a été initialement identifiée comme une protéine qui se lie aux microtubules. La DNM2 interagit aussi avec le réseau de microtubules. En effet une étude avait démontré que l'inhibition de l'expression de DNM2 par des siARN entraînait l'augmentation du taux de la tubuline acétylée, un marqueur de la stabilité du microtubule (Tanabe and Takei 2009), suggérant le rôle de DNM2 dans le maintien de l'équilibre polymérisation-dépolymérisation. Une autre étude a montré que DNM2 lie la γ-tubuline *via* son domaine intermédiaire et se localise au niveau du centrosome (Thompson, Cao et al. 2004). La réduction du niveau de DNM2 entraîne la fragmentation du centrosome suggérant son implication dans la cohésion du centrosome.

1.1.4.4.3 Trafic intracellulaire

DMN2 est localisée au niveau de l'appareil de Golgi notamment dans le réseau *trans*-Golgi (Maier, Knoblich et al. 1996). Le transport des vésicules à partir du *trans*-Golgi est sous le contrôle de l'association entre DNM2 avec la cortactine (Cao, Weller et al. 2005). Cette étude a démontré que la perturbation de l'interaction entre DNM2 et cortactine diminue le taux de DNM2 au niveau du Golgi et bloque le trafic des protéines à partir du *trans*-Golgi. DNM2 est localisée aussi au niveau des vésicules de clathrine dans l'endosome précoce et tardif (van

Dam and Stoorvogel 2002). DNM2 aurait ainsi un rôle dans le transport et le recyclage des vésicules d'endocytose.

1.1.4.4.4 Mitochondries

Les mitochondries représentent des organelles hautement dynamiques alternant des cycles de fission-fusion. Cette dynamique mitochondriale régule la forme, le nombre, la taille des mitochondries afin de répondre et s'adapter aux besoins énergétiques et à l'état métabolique de la cellule. La fusion des membranes externes mitochondriales fait intervenir des GTPases : les mitofusines (Mfn1 et Mfn2) et celle des membranes internes OPA1. La fission mitochondriale fait intervenir deux acteurs majeurs : Drp1 (Dynamin-related protein 1) et DNM2. A la différence des DNM, Drp1 ne possède ni de domaine PH ni PRD (Tilokani, Nagashima et al. 2018). Le recrutement de Drp1 au niveau de la membrane externe de la mitochondrie entraîne son oligomérisation et la formation d'un anneau de constriction. Cet assemblage fait intervenir le domaine intermédiaire de Drp1. Des études ont montré que Drp1 n'est pas capable de finir la fission mitochondriale. *In vitro*, Drp1 recombinante peut former des tubules à partir de liposomes sans les couper (Yoon, Pitts et al. 2001). L'étape finale de la fission mitochondriale nécessite l'intervention de DNM2 qui s'assemble autour de l'anneau de Drp1 et sépare les deux mitochondries. La réduction du taux de DNM2 induit une élongation des mitochondries avec la présence de sites de constriction ce qui prouve le rôle de DNM2 dans la phase finale de scission mitochondriale (Lee, Westrate et al. 2016). D'autres études ont montré l'implication du réseau du réticulum endoplasmique dans la pré-constriction des mitochondries afin de réduire le diamètre des mitochondries (Friedman, Lackner et al. 2011).

1.1.4.4.5 Régulation de l'autophagie

L'autophagie reflète l'adaptation de la cellule à un milieu pauvre en nutriments. Suite à la fusion des lysosomes avec les autophagosomes, leur contenu est dégradé et des nouveaux lysosomes sont formés après l'élongation de la membrane des autolysosomes et la libération de protolysosomes. Ce processus est appelé reformation de lysosome autophagique (ALR ; Figure 5) (Chen and Yu 2018). Cette extension membranaire contient la clathrine, AP2 et PI(4,5)P_2. Cette composition ressemble à celle des vésicules d'endocytose dépendante de la clathrine. Durant l'ALR, la clathrine forme des bourgeons à la surface des autolysosomes où PIP5K1B catalyse la réaction pour former PI(4,5)P_2 à partir de PI(4)P. La moto-protéine KIF5B entraîne l'élongation et la formation de tubules au niveau des bourgeons de clathrine *via* son interaction avec le microtubule. La formation de protolysosomes fait intervenir la DNM2 qui joue un rôle classique de fission des membranes. Une étude a montré que l'inhibition pharmacologique de DNM2 ou la réduction du taux de DNM2 par des siARN entraînait la formation de structures autolysosomales élargies (Schulze, Weller et al. 2013).

1.1.4.5 La souris KI *Dnm2*$^{R465W/+}$ pour étudier la physiopathologie de la myopathie centronucléaire AD

Afin d'étudier les mécanismes physiopathologiques de la maladie *in vivo*, l'équipe du Dr. Marc Bitoun a généré, en collaboration avec l'Institut Clinique de la Souris (ICS, Illkirch) un modèle murin portant la mutation la plus fréquente R465W (Durieux, Vignaud et al. 2010). Il s'agit d'un knock-in hétérozygote (KI) généré par la technique de recombinaison homologue chez une souris de fond génétique C57BL/6. An niveau du muscle, le niveau de DNM2 est comparable à celui du WT suggérant que la mutation n'impacte pas l'expression de la DNM2. Les homozygotes ne survivent pas après la naissance (seuls 2% survivent jusqu'à trois semaines). Les souris KI *Dnm2*$^{R465W/+}$ ne présentent pas de différence au niveau du poids, espérance de vie, croissance. Les mâles développent une atrophie musculaire qui commence à

2 mois et s'aggrave à 8 mois. Le tibialis antérieur (TA) est le muscle affecté en premier. A 8 mois, l'atrophie gagne aussi le gastrocnemius, le plantaris et le quadriceps. L'analyse histologique des fibres du TA ne montre pas de localisation centralisée des noyaux. La coloration NADH-TR (qui colore les mitochondries et le réticulum sarcoplasmique) est diminuée et montre une désorganisation de la matrice intermyofibrillaire. L'accumulation de mitochondries et de réticulum sarcoplasmique est observée dans 10% des fibres à 2 mois et 30% à 8 mois. Le diamètre minimal des fibres est réduit de 14% à 2 mois et 21% à 8 mois. Cette atrophie affecte les fibres de type II-b. La mesure de la force musculaire du TA montre une faiblesse musculaire, notamment une diminution de 40% de la force absolue maximale. La mesure du calcium dans des fibres isolées montre une augmentation du taux calcique basal suggérant un défaut d'homéostasie calcique impliquant probablement les tubules-T et le réticulum sarcoplasmique.

Comparé aux patients portants la même mutation (R465W), ce modèle murin présente un phénotype aussi modéré que celui observé chez les patients, avec une atteinte musculaire progressive. Il partage avec le phénotype humain un réarrangement du compartiment oxydatif des fibres musculaires. La faiblesse musculaire précède les modifications histologiques mais à la différence des patients, les souris KI *Dnm2*$^{R465W/+}$ ne présentent pas une localisation centrale des noyaux au niveau des fibres musculaires.

1.1.4.6 Développement préclinique de thérapies contre la myopathie centronucléaire AD

Le défi thérapeutique pour cette forme de myopathie centronucléaire consiste à cibler de manière spécifique une protéine mutée mais qui ne diffère de la forme sauvage (WT) que par un seul acide aminé dans un contexte de mutations hétérozygotes où la DNM2 WT est exprimée au même niveau que la DNM2 mutée, sachant que la DNM2 joue un rôle pléiotrope dans plusieurs processus cellulaires. C'est dans ce contexte que Trochet *et al.* ont développé

une stratégie d'extinction allèle-spécifique grâce aux ARNi (interférence) (Trochet, Prudhon et al. 2018). Le TA de la souris KI *Dnm2*$^{R465W/+}$ a été injecté par des AAV exprimant des shARN ciblant spécifiquement le transcrit mutant. La réduction du transcrit mutant n'était pas totale (40-50%) et pourtant, les muscles des souris traitées ont montré une augmentation de la force musculaire et une amélioration des défauts histologiques.

Parmi les approches non spécifiques, Trochet *et al*. ont tenté de reprogrammer le transcrit de DNM2 de l'exon 11 (contenant la mutation R465W) au dernier exon par une approche de trans-splicing *in cellulo* et *in vivo* afin de réparer l'ARN (Trochet, Prudhon et al. 2016). L'approche de 3'-trans-splicing a entraîné l'expression de peptides tronqués et une toxicité *in vivo*. En utilisant une stratégie de 5'-trans-splicing et en supprimant le site de polyadénylation (polyA), les auteurs ont détecté le trans-spliced ARNm et la protéine DNM2 dans les fibroblastes et les muscles de la souris KI *Dnm2*$^{R465W/+}$. Ces muscles ne présentaient pas de toxicité.

Gibbs *et al.* ont remarqué un défaut de transmission au niveau de la jonction neuromusculaire chez les patients portant les mutations E368K et S619L (Gibbs, Clarke et al. 2013). Suite à un traitement par un inhibiteur de l'acétylcholinestérase, tous les patients ont montré une amélioration au niveau de la fatigabilité, force musculaire et la fonction motrice. Cette découverte remet en cause l'hypothèse de la non-implication de défauts neuromusculaires chez les patients CNM.

1.2 Edition du génome : nouvelle ère du génie génétique

1.2.1 Le système CRISPR/Cas9

Il est admis aujourd'hui que le système CRISPR/Cas9 représente une des plus grandes révolutions biologiques qui a transformé le génie génétique permettant de modifier ou même « personnaliser » le génome. Pourtant, ce système provient de l'immunité acquise chez les procaryotes et sa découverte est un mélange de curiosité scientifique, persistance et innovation.

1.2.1.1 Historique

La découverte du système CRISPR/Cas9 remonte à la fin des années 80 quand Yoshizumi Ishino a trouvé chez *Escherichia coli* des mystérieuses séquences de 29 nucléotides répétées espacées par 32 nucléotides. Il a rapporté (Ishino, Shinagawa et al. 1987) : « Jusqu'à aujourd'hui, jamais une séquence similaire à celle-ci n'avait été observée chez les procaryotes, sa signification biologique est inconnue ».

En 1989, Francisco Mojica a découvert chez une bactérie archaïque des séquences de 30 bases répétées palindromiques, séparées par 36 bases : des « spacers » (Mojica, Juez et al. 1993). Ensuite il a décrit des loci CRISPR dans 20 espèces bactériennes dont *Clostidium difficile*, *Mycobacterium tuberculosis* et *Yersinia pestis* (Mojica, Ferrer et al. 1995). D'autres études ont rapporté l'existence de ce type de séquences répétitives chez d'autres espèces et ont commencé à s'interroger sur le rôle de ces structures dans le génome bactérien. Au fur et à mesure que les bibliothèques de séquences d'ADN des différentes espèces sont mises à jour, Mojica a pu comparer par un programme de « blast », les séquences des spacers et il a trouvé que la séquence d'une souche d'*E. coli* correspondait à celle d'un prophage (P1 phage) qui infecte différentes espèces d'*E coli*. Cependant, cette bactérie est connue pour sa résistance à ce virus. L'idée que ces séquences participent à l'immunité bactérienne commence à voir le jour. Mojica envoie son article en novembre 2003 mais il a été rejeté par *Nature*. Il n'a été

accepté qu'en 2005 par *Journal of Molecular Evolution* (Mojica, Diez-Villasenor et al. 2005). Il décrit que les archées qui possèdent des « spacers » sont résistantes aux virus possédant des séquences similaires. Au même moment, Philippe Horvath, qui a étudié la génétique des bactéries acido-lactiques de fermentation de la choucroute, a été chargé par sa firme agro-alimentaire *Rodhia Food* d'identifier des espèces bactériennes utilisées dans des procédés de fermentation et qui seraient résistantes aux infections des phages. Avec ses collègues, il a voulu tester l'hypothèse de l'implication de CRISPR dans l'immunité adaptative bactérienne. En utilisant des souches de *Streptococcus thermophilus* sensibles à des bactériophages, il a pu isoler des souches devenues résistantes en acquérant des séquences du phage au niveau de leurs loci CRISPR (Barrangou, Fremaux et al. 2007). Il a pu aussi observer que certains phages qui échappaient à cette immunité présentaient des mutations ponctuelles au niveau des « spacers ».

En parallèle, des études ont classifié les gènes *Cas* et en 2008, John Van der Oost a transféré le système CRISPR d'une souche d'*E. coli* à une autre qui en était dépourvue et a purifié un complexe de 5 protéines Cas, aussitôt appelé Cascade (Brouns, Jore et al. 2008). Il a prouvé que ce complexe est nécessaire pour le clivage d'un long précurseur d'ARN issu de la transcription du locus CRISPR de 61 nucléotides. Les ARN maturés appelés crARN (CRISPR ARN) commencent tous par les huit dernières bases des séquences répétées suivies par la séquence du « spacer » et le début de la suivante région répétée suggérant que les séquences palindromiques pourraient former des structures secondaires (Sorek, Kunin et al. 2008). Van der Oost a aussi construit un système CRISPR artificiel dirigé contre le phage lambda. Comme prévu, les souches bactériennes étaient résistantes à ce virus, représentant la première reprogrammation du système CRISPR. En plus, en créant deux versions de ce système, une anti-sens et l'autre sens, le fait que cette dernière était plus efficace suggérait que la cible n'était pas l'ARNm mais plutôt l'ADN. Cette hypothèse a été renforcée par la découverte de

Luciano Marraffini (travaillant dans le laboratoire d'Eric Sontheimer) quand il a décrit la capacité de CRISPR à bloquer des plasmides (Marraffini and Sontheimer 2008). Ils ont eu l'idée que CRISPR pourrait être utilisé pour l'édition du génome et ont même formulé une demande de brevet incluant l'utilisation du système dans des cellules eucaryotes.

Le système CRISPR était si efficace que le mécanisme d'action par lequel ce système détruit l'ADN n'a pas pu être observé. Ce n'est que grâce aux travaux de Sylvain Moineau que cette interaction a été élucidée. En effet, en étudiant l'antibiorésistance conférée par des plasmides et son inactivation il a trouvé chez une souche bactérienne particulière une protection partielle contre des plasmides transformés par électroporation, et que les plasmides étaient linéarisés (Garneau, Dupuis et al. 2010). Après séquençage, il a trouvé un site unique de clivage trois nucléotides avant le PAM (Proto-spacer Adjascent Motif). Moineau a aussi observé des résultats similaires sur l'ADN viral ouvrant la voie vers la clef du fonctionnement du système CRISPR.

L'élément manquant du puzzle était le tracrARN (trans-activating CRISPR ARN). Sa découverte est attribuée à Emmanuelle Charpentier qui s'intéressait à des ARN non codants, régulateurs et à leur identification chez *Streptococcus pyogenes*. Emanuelle Charpentier et Jörg Vogel ont observé une abondance d'un petit ARN proche du locus CRISPR/Cas9. Elle s'est ensuite rendu compte que le système CRISPR/Cas9 ne nécessitait que 3 éléments : le tracrARN, le crARN et la protéine Cas9 (Sharma, Hoffmann et al. 2010).

Virginijus Siksnys a étudié l'activité de CRISPR/Cas9 *in vitro* et a démontré que le complexe pouvait couper les deux brins d'ADN (Gasiunas, Barrangou et al. 2012). En mutant les deux domaines catalytiques de Cas9, HNH et RuvC, il a démontré que HNH coupait le brin complémentaire au crARN et que RuvC clivait l'autre brin. En s'associant, Jenifer Doudna et Emmanuelle Charpentier sont arrivées aux mêmes conclusions de Siksnys mais ont en plus découvert que les deux ARN pouvaient être fusionnés en un seul ARN guide appelé « single-

guide RNA ». L'article de Siksnys a été publié le 4 septembre 2012 alors que celui de Charpentier et Doudna est apparu en ligne le 28 juin 2012 (Jinek, Chylinski et al. 2012).

Le système CRISPR/Cas9 était alors bien caractérisé chez les bactéries et *in vitro* mais son transfert et son utilisation chez des cellules de mammifères ont été réalisés par Feng Zhang qui a optimisé la Cas9 par des signaux d'adressage au noyau et des codons optimisés (Cong, Ran et al. 2013). Son article paru chez *Science* en 2013 a rapporté la possibilité de modifier des génomes humains et murins. Le même mois, trois autres publications ont vu le jour rapportant l'utilisation du système CRISPR/Cas9 chez les cellules de mammifères. Sur les deux demandes de brevet déposées par Doudna et Zhang, c'est le dernier qui a obtenu gain de cause et a déclenché ainsi une bataille juridique.

1.2.1.2 Le système CRISPR/Cas de type II

De nombreuses études ont permis la classification des différents systèmes CRISPR/Cas selon l'organisation du locus de la machinerie qui clive l'ADN exogène (Makarova and Koonin 2015, Shmakov, Abudayyeh et al. 2015). Par sa simplicité, le système de classe II a été choisi pour les applications de l'édition du génome.

Le locus CRISPR de type II contient les gènes *cas1* et *cas2* qui sont communs à tous les systèmes CRISPR, mais aussi le gène *cas9* codant pour l'endonucléase Cas9. Cette protéine est impliquée dans l'acquisition des « spacers », la maturation de crARN et la coupure de l'ADN exogène (Jinek, Chylinski et al. 2012). Il code aussi pour un ARN non traduit appelé tracrARN qui se lie au crARN. La Cas9, une protéine de 800-1400 acides aminés, contient deux domaines de types nucléases : HNH et RuvC. Cas9 est composée de deux lobes (Jinek, Jiang et al. 2014, Nishimasu, Ran et al. 2014). Le premier contient un domaine REC (recognition) interagissant avec le crARN et le deuxième lobe interagit avec le PAM. Les domaines HNH et RuvC sont situés dans le deuxième lobe. La séquence de l'ADN cible et l'ARN guide sont à l'interface de ces deux lobes.

Le système CRISPR type II est classifié en trois sous-types : II-A, II-B et II-C (Makarova and Koonin 2015, Shmakov, Abudayyeh et al. 2015). Le type II-A comprend un gène supplémentaire : *csn2*. Csn2 aurait un rôle dans l'intégration des « spacers ». Le type II-B ne possède pas de gène *csn2* mais comprend un quatrième gène appartenant à la famille *Cas4* dont le rôle est inconnu. Le type II-C ne comprend que les trois gènes *cas1, cas2 et cas9*.

1.2.1.3 CRISPR/Cas9 et immunité adaptative bactérienne

Le fonctionnement du système CRISPR/Cas9 au cours de l'immunité adaptative des bactéries peut être décomposé en trois étapes (Figure 6) : adaptation, transcription du locus CRISPR et la phase d'interférence. Ce paragraphe détaillera le mécanisme d'action du système CRISPR type II.

La première phase d'adaptation consiste à acquérir et intégrer les « spacers ». Elle débute par la détection de la séquence envahissante et l'intégration d'un fragment de 30 nucléotides dans le génome bactérien du côté « leader » du locus CRISPR. Cette séquence doit avoir à son extrémité un PAM (Heler, Samai et al. 2015, Wei, Chesne et al. 2015). L'intégration fait intervenir les intégrases Cas1 et Cas2 qui sont communes à tous les systèmes CRISPR (Nunez, Harrington et al. 2015, Nunez, Lee et al. 2015, Wei, Chesne et al. 2015, Wei, Terns et al. 2015). Ces deux protéines forment un complexe. Cas1 possède une activité endonucléase nécessaire à l'intégration, Cas2 aurait une fonction non enzymatique. D'autres protéines comme Csn2 peuvent participer à cette phase en stabilisant la coupure double-brin.

La sélection de la séquence à insérer dépend de la proximité d'un PAM. Le motif PAM n'est pas intégré au génome bactérien afin d'éviter une reconnaissance auto-immune et une coupure du génome du « soi ». L'insertion de plusieurs séquences virales dans le locus CRISPR confère à ce dernier une mémoire immunologique, d'où la qualification de système immun adaptatif ou acquis.

La deuxième étape consiste en la maturation du pre-crARN en crARN qui implique des complexes ARN endonucléases ou par une voie faisant intervenir l'ARNase III bactérienne (Deltcheva, Chylinski et al. 2011). Dans le système de type II-A et II-B, un seul ARN précurseur est transcrit, le pre-crARN qui s'hybride ensuite à plusieurs tracrARN, ce qui permet le recrutement de la protéine Cas9 qui stabilise ce complexe. Le clivage du pre-crARN est assuré par la ARNase III au niveau des séquences répétées donnant naissance à plusieurs complexes crARN:tracrARN:Cas9 immatures. Un autre clivage permet la maturation des crARNs contenant des « spacers » de 20 nucléotides capables de s'hybrider avec l'ADN envahissant (Deltcheva, Chylinski et al. 2011, Jinek, Chylinski et al. 2012). Pour le système CRISPR type II-C, plusieurs pre-crARNs de tailles différentes sont transcrits et seraient capables de reconnaitre l'ADN exogène sans maturation préalable (Zhang, Heidrich et al. 2013).

La dernière étape est l'interférence avec la séquence cible. L'ADN étranger est ciblé grâce à la séquence « proto-spacer ». Le complexe crARN :tracrARN :Cas9 parcourt l'ADN exogène à la recherche du PAM. L'interaction entre Cas9 et le PAM entraîne la déformation de l'ADN double-brin et ensuite grâce à la complémentarité de Watson et Crick, le crARN s'hybride avec la séquence ADN exogène (Jinek, Jiang et al. 2014, Nishimasu, Ran et al. 2014). La Cas9 change alors de conformation et clive l'ADN double brin grâce à ses domaines HNH et RuvC. Ce clivage aboutit à une coupure franche double brin trois nucléotides avant le PAM. L'appariement avec les douze nucléotides avant le PAM est essentiel à l'activité de la Cas9.

1.2.1.4 Mécanisme d'action pour l'édition du génome

La Cas9 représente l'endonucléase guidée par l'ARN du système CRSPR de type II. Ce système a été détourné au profit de l'édition du génome pour sa simplicité et sa taille. Lors de son interaction avec l'ADN double-brin, cette protéine reconnaît d'abord le PAM grâce à son domaine CTD (C-Terminal Domain), qui est spécifique pour chaque espèce bactérienne d'où

provient le système CRISPR/Cas9. Il s'agit d'une courte séquence adjacente à la séquence ciblée. Le PAM n'est pas intégré au génome de la bactérie et est présent dans le génome du virus envahissant. Cela permet de couper les séquences virales sans toucher la séquence du génome bactérien. Après la liaison au PAM, Cas9 parcourt la séquence du brin opposé à la recherche d'une complémentarité avec l'ARN guide (Figure 7). L'ARN guide résulte de la fusion synthétique entre le crARN et tracrARN procurant ainsi une flexibilité dans l'utilisation du système CRISPR/Cas9 dans le domaine du génie génétique. Dans ce cas, l'ADN se déroule formant une boucle R (boucle composée par un ADN simple brin hybridé avec un ARN) et l'ARN complémentaire s'hybride via la règle de complémentarité de Watson et Crick (Haurwitz, Jinek et al. 2010, Jinek, Jiang et al. 2014). Les douze nucléotides avant le PAM sont essentiels à l'appariement et cette séquence est appelée « seed ». La Cas9 change alors de conformation et ses domaines HNH et RuvC clivent les deux brins d'ADN à un endroit précis : 3 nucléotides en amont de l'extrémité 5' du PAM (Sternberg, LaFrance et al. 2015). La spécificité du système est assurée par la présence du PAM et de la séquence complémentaire, mais aussi par la différence de temps que Cas9 passe à parcourir des séquences cibles dites « on-target » et hors-cibles dites « off-target » (Sternberg, LaFrance et al. 2015). En effet, en parcourant l'ADN, Cas9 passe plus de temps au niveau des séquence cibles qu'au niveau des séquences hors-cibles qui ne s'hybrident que partiellement. Cela contribue à la spécificité du système CRISPR/Cas9.

L'étude cristallographique du complexe Cas9-ARN guide (Cas9 de *Streptococcus pyogenes*) a montré que les deux lobes de Cas9 changent d'orientation et que les zones riches en acides aminés chargés positivement interagissent avec l'ADN cible et se retrouvent exposées l'une en face de l'autre (Jinek, Jiang et al. 2014, Nishimasu, Ran et al. 2014). Un canal est ainsi formé permettant l'interaction entre l'ARN guide et l'ADN cible. Après reconnaissance du PAM au niveau du brin non complémentaire, l'ADN cible se dénature, une séparation locale

des deux brins a lieu et l'ARN guide peut ainsi s'hybrider avec un brin d'ADN. La formation de cette structure permet une rotation de la Cas9 et l'enveloppement complet de l'ADN. Les deux domaines nucléases HNH et RuvC se trouvent alors en face des deux brins cibles et clivent respectivement le brin complémentaire et le non complémentaire 3 à 4 nucléotides en 5' du PAM.

La coupure double-brin d'une séquence cible représente la clé de l'édition du génome. Le rôle du système CRISPR/Cas9 s'arrête à cette étape et c'est ensuite la machinerie cellulaire de réparation de l'ADN qui prend le relais. Cette coupure représente un des signaux cellulaires les plus toxiques et la cellule dispose de plusieurs mécanismes pour réparer l'ADN dont les plus importants : la voie du NHEJ (Non-Homologous End Joining) et celle de l'HDR (Homology-directed repair).

1.2.1.5 Mécanismes endogènes de réparation de l'ADN

1.2.1.5.1 La voie du NHEJ

Ce mécanisme de réparation consiste à « recoller » les deux extrémités de la cassure double-brin. Il intervient pendant toutes les phases du cycle cellulaire et essentiellement pendant la phase G1 (Lieber 2008). L'acteur majeur de cette voie est l'hétérodimère KU70/80, composé de deux protéines d'une taille de 70 et 86 kDa (Figure 8, 10). L'hétérodimère forme un anneau asymétrique au contact de l'ADN. Cet hétérodimère interagit avec plusieurs types d'extrémités cassures double-brin (CDB) tels que les bout-francs (blunt), les extrémités sortantes (overhangs) et les extrémités en épingles à cheveux (hairpins) (Downs and Jackson 2004). Il serait aussi impliqué dans la stabilité des télomères (Wang, Ghosh et al. 2009). Durant la voie du NHEJ, l'hétérodimère KU détecte l'ADN lésé et recrute la sous-unité catalytique du complexe DNA-PK (DNA-PKc pour DNA Protein Kinase catalytic subunit) (Singleton, Torres-Arzayus et al. 1999). Il s'agit d'une sérine thréonine kinase de la famille des PIKKs (Phosphoinositide 3-kinase related kinases). L'interaction de DNA-PKc avec KU

active son domaine kinase ce qui phosphoryle tous les facteurs de la voie du NHEJ (DeFazio, Stansel et al. 2002). Le complexe KU/DNA-PKc participe au maintien des extrémités clivés et recrute les autres facteurs : Artémis qui joue un rôle protecteur de l'ADN clivé, PNKP (Plynucléotide Kinase/Phosphatase) possédant une activité 3'-phosphatase et 5'-kinase qui peut ajouter ou enlever un groupement 5'phosphate, des polymérases qui « remplissent » les brèches avant la ligation et ADN-ligase IV qui permet la ligation des deux bouts (Davis, Chen et al. 2014).

En 2015, un autre facteur a été identifié : PAXX (PAralog of XRCC4 and XLF) (Ochi, Blackford et al. 2015). Ce facteur peut interagir avec KU pour stabiliser le complexe KU et les autres protéines du NHEJ et stimulerait la ligation des extrémités clivées.

Une autre voie du NHEJ, appelée NHEJ alternatif (ou MMEJ pour Microhomology-Mediated End-Joining), agit comme une variable du NHEJ et implique d'autres facteurs durant la phase M - S précoce (Figure 10). Le plus étudié est la protéine PARP1 qui se lie aux cassures *via* son domaine en doigt de zinc (ZnF) (Ame, Spenlehauer et al. 2004). Cette voie utilise souvent des microhomologies qui sont des courtes séquences complémentaires de part et d'autre de la zone clivée. Ces séquences peuvent s'apparier en perdant quelques nucléotides et la réparation peut comprendre l'ajout de quelques nucléotides par l'action d'une polymérase. Ces microhomologies peuvent être rapprochées (proximales) ou éloignées (distales). Les microhomologies sont révélées grâce à l'action du complexe MRN-CtIP qui dégrade les extrémités des cassures (Rass, Grabarz et al. 2009, Boboila, Alt et al. 2012). Cette voie, comme la recombinaison homologue, comprend une étape de résection qui implique deux nucléases : Mre11 et CtIP (Boboila, Alt et al. 2012). En s'hybridant, les microhomologies libèrent les extrémités sortantes qui vont être éliminées entraînant des délétions de nucléotides. La ligation se fait grâce à l'action de la Ligase III.

1.2.1.5.2 La recombinaison homologue

La recombinaison homologue (RH) est une voie encore plus intéressante du point de vue des applications biotechnologiques car elle permet de modifier de manière précise la séquence d'intérêt. Cette voie est active au cours des phases S et G2 du cycle cellulaire quand l'ADN est déjà répliqué. La réparation est assurée par la présence de deux chromatides sœurs (Jasin 2000). La première étape consiste en la résection des extrémités des CDB qui implique le complexe MRX/MRN formé par les protéines : MRE11, RAD50 et XRS2/NBS1 (chez les eucaryotes), et CtIP (Paull 2010) (Figure 9, 10). Les extrémités 3' sont alors exposées à l'action d'autres nucléases de type EXO1 (Mimitou and Symington 2008). L'ADN simple brin est stabilisé par les protéines RPA (Replicative Protein A). Le suppresseur de tumeur BRCA1 interagirait avec MRN et CtIP. Afin de stabiliser les extrémités 3' simple-brin, la protéine RPA se lie à ces extrémités sortantes (Stark, Pierce et al. 2004, Schlegel, Jodelka et al. 2006). En interagissant avec BRCA2 via PALB2, BRCA1 stimule la formation du complexe BRCA2-PALB2 qui recrute un acteur majeur de la recombinaison homologue : l'ATPase Rad51 impliquée dans la recherche d'homologie (Sy, Huen et al. 2009, Sy, Huen et al. 2009) (West 2003). Un filament nucléoprotéique est formé et s'enroule sur l'extrémité de l'ADN permettant l'invasion du brin homologue, formant ainsi une boucle-D « D-loop » (il s'agit de structure d'ADN où les deux brins sont étirés et un troisième brin vient s'apparier avec l'un des deux) puis d'une jonction Holliday (West 2003). Rad54 serait impliquée dans la stabilisation du filament nucléoprotéique, la recherche d'homologie et le remodelage de la chromatine. La synthèse de l'ADN se fait par des ADN polymérases en utilisant le brin complémentaire.

1.2.1.5.3 Applications des voies de réparation de l'ADN à l'édition du génome

Le développement exponentiel de l'outil CRISPR/Cas9 a été rendu possible grâce à sa simplicité de conception et de production. La facilité par laquelle ce système peut cibler une

séquence spécifique et introduire une cassure double-brin a fait de lui une révolution du génie génétique. Les applications dépendent du résultat espéré. La voie du NHEJ est souvent qualifiée de source d'erreur. Souvent cette réparation n'est pas fidèle et elle induit des mutations de type insertions-délétions : indels. Ces mutations peuvent créer un décalage du cadre de lecture. Ainsi la voie du NHEJ est utilisée souvent pour inactiver des gènes (KO : knock-out). D'un autre côté, la voie de la recombinaison homologue est plus fidèle et en présence d'un ADN donneur, il est possible d'introduire des modifications précises du génome (KI : knock-in). Il s'agit de modifications contrôlées par l'HDR (Homology-Directed Repair) qui utilise la voie de la RH.

Les principales applications de ces deux voies majeures dans le domaine biomédical seront détaillées dans un autre sous-chapitre.

1.2.1.6 Les variants du système CRISPR/Cas9

La première modification artificielle du système CRISPR/Cas9 a été réalisé par les équipes de Jenifer Doudna et Emmanuelle Charpentier qui ont fusionné le tracrARN et le crARN pour constituer un seul ARN guide (sgARN pour single-guide ARN) (Doudna and Charpentier 2014). Il conserve les éléments de la forme non fusionnée nécessaires au fonctionnement et comporte une boucle de liaison entre les deux éléments. L'avantage de cette modification est la simplicité de production en laboratoire. Cela évite les longues étapes d'hybridation (annealing) pour lier le tracrARN au crARN.

1.2.1.6.1 Les variants naturels

Il existe plusieurs Cas9 appartenant à des espèces bactériennes différentes. La Cas9 la plus utilisée est celle de *Streptococcus pyogenes* de par la simplicité de son PAM (NGG) avec une taille de 1388 acides aminés (a.a) (Komor, Badran et al. 2017). Celle de *Staphilococcus aureus* est plus petite avec 1053 a.a. et nécessite un PAM plus long NNGRRT. Les Cas9 de

Streptococcus thermophilus St1Cas9 et St3Cas9 ont une taille respectivement de 1121 et 1388 a.a. et utilisent un PAM NNAGAAW et NGGNG. *Neisseria meningitidis* possède une Cas9 relativement petite de 1082 a.a avec un PAM NNNNGATT. D'autres nucléases de type Cpf1 ont été découvertes notamment celles de *Acidaminococcus sp*. et *Lachnospiraceae bacterium* qui, à la différence des autres Cas9, n'utilisent que le crARN. Elles ont une taille de 1307 et 1228 a.a et nécessitent un PAM TTTN à l'extrémité 5', contrairement au PAM 3' pour les autres Cas9. Elles génèrent des bouts collants. Ces enzymes sont adaptées à l'édition du génome des séquences T-riches. Cette diversité de PAM élargit encore les possibilités de cibler des séquences d'intérêt dans le génome.

1.2.1.6.2 Les modifications artificielles de la Cas9

1.2.1.6.2.1 La nCas9 « nickase »

Étant donné que la Cas9 procède à une coupure double-brin grâce à ces deux domaines nucléases HNH et RuvC, la mutation d'un des deux domaines entraîne son inactivation et une coupure simple-brin. Cette activité est appelée « nickase » (Ran, Hsu et al. 2013, Shen, Zhang et al. 2014). Cette cassure est rapidement réparée par la machinerie cellulaire qui utilise le brin complémentaire. Afin de générer une cassure double-brin, deux nickases sont nécessaires afin de couper les deux brins opposés. Il a été démontré que cette stratégie augmente la spécificité de la Cas9 du fait de la faible probabilité que les deux cassures simple-brin hors cibles soient assez rapprochées pour générer une cassure double-brin mais elle est moins efficace que la Cas9 conventionnelle.

1.2.1.6.2.2 La dCas9 « dead »

En mutant les deux domaine nucléases HNH et RuvC, la Cas9 perd son activité endonucléase d'où le nom de « dead » Cas9. Cependant elle garde sa capacité à cibler et lier des séquences spécifiques du génome, guidée par l'ARN guide. Cette stratégie est utilisée pour inhiber la

transcription d'un gène et appelée CRISPRi (interférence) (Larson, Gilbert et al. 2013). L'encombrement stérique réprime l'élongation par l'ARN polymérase ou bloque la liaison des facteurs de transcription offrant ainsi une alternative à l'ARNi.

1.2.1.6.2.3 La dCas9 « fusion »

La capacité de cibler une séquence de l'ADN sans le couper peut être utilisée dans plusieurs applications ou la dCas9 sert de « véhicule » qui transporte les facteurs bien définis à la zone ciblée. Ainsi la Cas9 peut être couplée à des enzymes (Gaudelli, Komor et al. 2017), facteurs de transcriptions (Hilton, D'Ippolito et al. 2015, Kearns, Pham et al. 2015), fluorophores (Chen, Gilbert et al. 2013) dont les applications seront détaillées dans un autre chapitre « applications du système CRISPR/Cas9 ».

1.2.1.6.2.4 La dCas9 couplée à une désaminase

La fréquence élevée des événements NHEJ au détriment de l'HDR a poussé les chercheurs à trouver des solutions qui pourraient contourner la voie du NHEJ. Ainsi une étude a montré qu'il était possible de coupler une enzyme à dCas9 et qui serait capable de changer un seul nucléotide : la citidine désaminase (Komor, Kim et al. 2016). Guidée par l'ARN guide à la séquence cible, cette enzyme catalyse la transformation de la cytosine en uracile sur le brin ciblé. La machinerie cellulaire remplace ensuite l'uracile par une thymine. L'hétéroduplexe formé T :G sera corrigé en T :A et ainsi le résultat final est la substitution ponctuelle d'un C:G en T:A. Le système d'édition de base le plus utilisé est celui de 3ème génération (BE3) qui utilise une désaminase qui catalyse la réaction dans une fenêtre de 5 nucléotides au niveau de la bulle simple brin créée par la Cas9. Le système est couplé à une nickase qui coupe le brin non ciblé et stimule ainsi la substitution du G par un A. La désaminase utilisée existe à l'état naturel. Une étude plus récente a développé des adénine désaminases afin de catalyser le changement de A:T en G:C (Gaudelli, Komor et al. 2017). Ainsi plusieurs possibilités de

substitutions ponctuelles sont devenues possibles. Ces stratégies évitent les coupures double-brin et ainsi la génération d'indels par le NHEJ.

1.2.1.6.2.5 La HiFi Cas9 « High Fidelity »

Les effets hors-cibles "off-target" représentent un handicap majeur de l'utilisation du système CRISPR/Cas9. Afin de diminuer ces effets, une étude a suggéré que le complexe SpCas9-sgARN possède plus d'énergie qu'il en a besoin pour cibler la séquence « on-target » et qu'en modifiant l'état énergétique de ce complexe, cela maintiendrait son activité « on-target » mais diminuerait sa capacité à cliver des séquences mis-appariées (Kleinstiver, Pattanayak et al. 2016). Cette étude s'est concentrée sur la liaison du complexe SpCas9-sgARN à l'ADN par des liaisons hydrogène médiées par quatre résidus : N497, R661, Q695 et Q926 ; en mutant un ou plusieurs résidus, ils modifieraient l'état énergétique du complexe. Les chercheurs ont identifié un variant SpCas9-HF1 avec quatre mutations (N497A / R661A / Q695A / Q926A) qui a montré une faible activité « off-target » sans affecter son activité « on-target ». Dans une autre étude, la mutation de trois acides aminés de la Cas9 a augmenté sa spécificité. Le variant est appelé eSpCas9 (Slaymaker, Gao et al. 2016).

1.2.1.7 Les applications du système CRISPR/Cas9

1.2.1.7.1 Génération de modèles animaux

La relative facilité par laquelle CRISPR/Cas9 peut introduire des mutations au niveau d'une séquence ciblée a permis le développement de modèles animaux afin d'étudier mes pathologies humaines (Hsu, Lander et al. 2014). Par une injection dans le zygote au stade d'une cellule, cette technique évite les longues étapes de sélection de cellules embryonnaires souches nécessaires aux techniques de recombinaison homologue classique. Cela a aussi permis de développer des modèles d'autres espèces comme le rat, le lapin, le singe *etc*… où la manipulation de cellules embryonnaires souches n'est pas aussi maitrisée que chez la souris.

1.2.1.7.2 Études fonctionnelles : imagerie, transcription

Les modifications apportées à la Cas9 telle que la « dead » Cas9 (dCas9) qui lui permettent sa propriété de cibler une séquence définie sans la couper ont mené les chercheurs à « détourner » la Cas9 de son usage classique. En fusionnant la dCas9 à un flurophore, il est désormais possible de visualiser des régions telle la chromatine de manière dynamique (Chen, Gilbert et al. 2013). Une étude a mesuré la longueur des télomères de cellules cancéreuses comparée à des cellules saines. La technique de référence de marquage de l'ADN est la FISH (Fluorescent In Situ Hybridazation) mais elle est réalisée sur des cellules fixées contrairement au CRISPR qui peut être utilisé sur des cellules vivantes. La capacité de CRISPR/Cas9 à cibler des séquences différentes simultanément a permis l'utilisation de plusieurs fluorophores à la fois. Une des techniques célèbres est CRISPR « rainbow » (Ma, Tu et al. 2016).

Une autre application de la dCas9 consiste à réguler l'expression génique (Hilton, D'Ippolito et al. 2015, Kearns, Pham et al. 2015). En la fusionnant à des facteurs de transcriptions, le complexe interagit avec la séquence cible et peut ainsi déclencher (CRISPRa) ou réprimer (CRISPRi) la transcription. La fusion avec des acétyltransférases et déméthylases permettrait une modulation épigénétiques.

1.2.1.7.3 Stratégies thérapeutiques

Parmi les 25000 gènes du génome humain, 3000 sont impliqués dans des maladies génétiques. Pour ces maladies, plusieurs approches thérapeutiques ont été développées ces dernières décennies dont la thérapie génique par remplacement de gène et l'ARN interférence qui permet d'inhiber l'expression des gènes défectueux. Cependant ces deux approches ont montré leurs limites telles que l'intégration aléatoire des transgènes, la taille des transgènes à délivrer ainsi qu'une expression ou une inhibition non contrôlée. Les pathologies causées par des mutations gain de fonction restent souvent réfractaires à ces stratégies thérapeutiques. En

théorie, le moyen le plus efficace serait de corriger ou enlever la mutation au niveau de l'ADN. L'édition du génome par le système CRISPR/Cas9 a ouvert la voie à cette approche plus radicale pour traiter les maladies monogéniques.

1.2.1.7.3.1 Les stratégies *ex-vivo*

Cette approche consiste à extraire les cellules du patient, les modifier et les réimplanter. Cela permet un traitement contrôlé de ces cellules, une sélection des cellules « guéries » et évite le rejet du greffon vu qu'il s'agit d'une autogreffe. Par contre, cette stratégie exige des cellules capables de se multiplier en dehors de leur milieu habituel sans perdre leurs caractéristiques après les manipulations *in vitro*. Cela réduit considérablement les applications thérapeutiques qui se limitent aux tissus ayant une population de cellules souches avec des propriétés d'auto-régénération comme les cellules hématopoïétiques. Un autre paramètre à prendre en considération est la faible proportion des cellules corrigées et greffées par rapport aux cellules non-corrigées, ce qui réduirait l'efficacité du traitement. Cette efficacité pourrait être optimisée par l'élimination préalable des cellules non-corrigées par des moyens plus au moins invasifs tel que le traitement par des rayons X. Une autre possibilité, mais qui ne dépend que de la physiopathologie de la maladie, serait que les cellules corrigées remplaceraient les non-corrigées par le moyen de sélection positive.

Un des exemples des pathologies hématopoïétiques est le large groupe de β-hémoglobinopathies causées par des mutations du gène *HBB*. L'anémie falciforme ou drépanocytose est due à des mutations ponctuelles au niveau du gène de la β-globine. Des études ont pu corriger *ex vivo* par HDR la mutation au niveau des cellules souches hématopoïétiques de patients et restaurer ainsi l'expression de la β-globine (Dever, Bak et al. 2016). En utilisant la même stratégie basée sur l'HDR, une autre étude a montré la correction

bi-allélique de la délétion β-41/42 (TCTT) causant une β-thalassémie chez les cellules souches pluripotentes induites de patients (Liu, Yang et al. 2017).

Dans le domaine de la thérapie du cancer, et notamment l'immunothérapie personnalisée, des équipes ont eu l'idée de modifier les récepteurs des cellules T (TCR) du patient afin de stimuler la reconnaissance de l'antigène tumoral, jugée insuffisante lors de la réponse immunitaire anti-tumorale. Les cellules ainsi modifiées sont appelées cellules CAR-T (Chimeric Antigen Receptor) (Reardon 2015). Jusqu'à aujourd'hui, trois générations de cellules CAR-T ont été développées et cette approche innovatrice est en train d'être testée dans des d'essais cliniques. Une compétition biomédicale a eu lieu entre une équipe américaine et chinoise qui ont essayé d'inactiver le gène *PD-1* qui code pour une protéine de surface chez les lymphocytes T (Cyranoski 2016, Su, Hu et al. 2016). Un de ses ligands, PDL-1 est exprimé par les cellules saines pour la reconnaissance du « soi ». Les cellules tumorales, en exprimant ce ligand, échappent à la réponse immunitaire. L'inactivation de ce gène dans les lymphocytes T restaurerait cette réponse anti-tumorale.

Une autre approche thérapeutique de modification des cellules immunitaires consiste à modifier les lymphocytes T au cours d'une infection par le virus VIH et plus précisément pendant la phase de latence virale. Le virus envahit les cellules T CD4+ en se liant au récepteur CCR5 ou le co-récepteur CXCR4. Les personnes porteuses de mutations homozygotes au niveau du gène du récepteur CCR5 (CCR5del32) sont résistantes à l'infection par le virus VIH. Le cas de Thimothy Brown, un patient atteint de SIDA et qui a reçu deux greffes de cellules souches hématopoïétiques d'un individu portant cette mutation a déclenché un grand espoir. Suite à ce traitement, le taux VIH sanguin était indétectable (Burke, Boyd et al. 2013). Plusieurs études ont ainsi essayé d'inactiver (KO) ce récepteur (Kang, Minder et al. 2015). Les résultats sont prometteurs mais cela n'exclut pas la possibilité d'une mutation virale conduisant à l'utilisation du CXCR4. L'inactivation simultanée de

CCR5 et CXCR4 ne serait pas dépourvue d'effets néfastes sur les patients. Ces thérapies sont en cours d'évaluation clinique.

1.2.1.7.3.2 Les Stratégies *in vivo*

L'édition du génome *in vivo* impliquerait un acheminement de l'outil directement au tissu malade. Outre l'avantage de cibler des cellules qui ne peuvent pas être manipulées en dehors de leur milieu naturel, cette approche pourrait être adaptée aux maladies impliquant plusieurs organes et tissus. Cette approche exige une vectorisation appropriée du système CRISPR/Cas9 notamment par des vecteurs viraux. Ces vecteurs présentent plusieurs limites en termes de taille, réponse immunitaire de l'hôte contre le virus et la Cas9, intégration aléatoire et une efficacité variable à transduire les tissus.

Une des premières réussites *in vivo* était le traitement de la tyrosinémie de type 1 par simple administration hydrodynamique de plasmides Cas9-sgARN-matrice de réparation chez un modèle murin adulte de la maladie (Yin, Xue et al. 2014). La tyrosinémie de type 1 est une maladie métabolique du foie causée par des mutations du gène *FAH* qui code pour la fumarylacetoacetate hydrolase et l'accumulation de métabolites toxiques. Les auteurs ont ensuite utilisé une combinaison de nanoparticules et AAV afin d'administrer *in vivo* les composants CRISPR (Yin, Song et al. 2016). Ce type de maladie représente un bon modèle de correction par HDR car le tissu ciblé est composé d'hépatocytes qui sont en régénération et que la correction de 6% des cellules a suffi pour corriger les phénotypes et les marqueurs hépatiques.

Traiter des maladies musculaires représente un défi thérapeutique étant donné que le muscle squelettique représente environ 40 à 50% de la masse corporelle. La dystrophie de Duchenne est une maladie liée à X touchant 1/3500 naissances. Un des modèles de la pathologie est la souris *mdx*. La souris *mdx* présente une mutation stop au niveau de l'exon 23 responsable du phénotype dystrophique. Étant donné que le muscle est constitué de cellules post-mitotiques,

la correction par l'HDR ne serait pas le premier choix d'attaque de cette maladie car cette voie de réparation n'est active qu'en phase S et G2 après réplication de l'ADN. Trois études, parues dans le même volume du journal *Science,* ont proposé une stratégie innovante (Long, Amoasii et al. 2016, Nelson, Hakim et al. 2016, Tabebordbar, Zhu et al. 2016) : en associant la voie du NHEJ à l'utilisation de deux guides ARN, ils ont pu provoquer une délétion ciblée de l'exon 23 contenant un codon stop prématuré. Ils ont ainsi pu restaurer la phase de lecture et l'expression partielle d'une dytrophine tronquée mais fonctionnelle. Cette stratégie est qualifiée de « saut d'exon permanent ». L'administration d'AAV par voie systémique et locale a amélioré les phénotypes musculaires de la souris *mdx* même si le pourcentage des noyaux « corrigés » n'a pas excédé 20%. Récemment, Bengtssen *et al.* ont testé une double stratégie : délétion par la voir du NHEJ et une correction par l'HDR. Comme prévu, le pourcentage d'ADN corrigé par HDR était très faible (0,8%) mais ceci représentait une preuve de concept d'une correction au niveau du muscle (Bengtsson, Hall et al. 2017)

1.2.1.8 Limitations du système CRISPR/Cas9

1.2.1.8.1 Les effets hors-cibles « off-target »

L'une des propriétés qui pourrait limiter l'utilisation de CRISPR/Cas9 en thérapeutique est sa capacité à tolérer les mésappariements de quelques nucléotides entre la séquence cible et l'ARN guide. Ces effets, s'ils ont lieu, sont permanents (modification de l'ADN) et peuvent avoir des effets néfastes graves (en activant par exemple des facteurs oncogènes). Plusieurs outils bio-informatiques (ex : CRISPOR) permettent l'identification *in silico* de ces séquences hors cibles susceptibles d'être clivées, tout en indiquant le nombre et la position des mésappariements. Tout en intégrant des données théoriques et pratiques, ces outils proposent une prédiction et un score de clivage. Il a été démontré que les mésappariements à l'extrémité 5' sont plus tolérés que ceux proches du PAM (Pattanayak, Lin et al. 2013). En effet, du point de vue mécanistique, la séquence nécessaire à l'activité de la Cas9 se situe dans les 12

premiers nucléotides avant le PAM, c'est la séquence « seed », et l'appariement se fait dans une direction 3'-5' en partant du PAM. La nature des mésappariements peut aussi influencer les effets hors cibles. Des études ont montré par exemple que 89% des mésappariements G :T maintiennent l'activité de la Cas9. La validation et la détection pratique de ces effets ont été développées par plusieurs études utilisant des techniques sensibles et non biaisées et sont résumées dans cette revue (Hendel, Fine et al. 2015).

Afin d'augmenter la spécificité du système CRISPR/Cas9 plusieurs équipes ont développé des stratégies différentes afin de modifier l'ARN guide ou la Cas9. L'utilisation de guide ARN tronqué a augmenté la spécificité et a prouvé qu'une longueur de 17 à 18 nucléotides représentait le compromis idéal entre le maintien de l'effet « on-target » et la diminution des effets « off-target » (Fu, Sander et al. 2014). Ces guides tronqués sont moins tolérants envers les mésappariements. Dans mon projet de thèse, ce type de guides a été utilisé. Une autre modification consiste à ajouter deux guanines mésappariées du côté 5' du guide (5'GGX20) (Cho, Kim et al. 2014). Ces deux mésappariements ajusteraient l'état énergétique de liaison et Cas9 nécessiterait une complémentarité plus astringente.

Concernant la modification de la Cas9, on notera le développement d'enzymes haute-fidélité décrites dans le sous-chapitre « Les variants de Cas9 » et la Cas9 nickase utilisant deux guides ARN. Un variant de la SpCas9, le D1135E, diminue l'utilisation des PAM non canoniques de type NAG et NGA et ainsi les effets hors cible liés à l'utilisation de ces PAM (Kleinstiver, Prew et al. 2015). L'utilisation de Cas9 qui nécessite un PAM plus astringent comme le NNGRRT de SaCas9 réduirait la probabilité d'un clivage hors-cible.

Malgré toutes ces améliorations, l'utilisation de ces variants de Cas9 ou guide ARN modifié peut être confrontée à une diminution de l'effet cible et donc d'une édition du génome estompée. Par exemple, il a été démontré que l'utilisation des guides ARN tronqués avec la

Cas9 haute-fidélité diminuerait de manière drastique le clivage de la séquence cible (Slaymaker, Gao et al. 2016).

1.2.1.8.2 Faible efficacité de la voie HDR

Du point de vue génie génétique, la réparation par la voie de l'HDR reste plus intéressante que celle du NHEJ car elle aboutit à des modifications orientées et « personnalisées » du génome. Cependant la fréquence de cette voie reste relativement faible et dépend de plusieurs facteurs : le cycle cellulaire, le type cellulaire, la région de l'ADN ciblée, le guide ARN utilisé (Mali 2013, Wang 2013). La réparation par l'HDR serait plus compatible avec des cellules en régénération, une technique où les cellules peuvent être enrichies *ex vivo* ou par sélection positive leur permettant de repeupler le tissu affecté. Afin d'augmenter le taux d'HDR, des études ont tenté d'inhiber la voie du NHEJ ou stimuler celle de l'HDR par des agents pharmacologiques tels que le SCR7 (Maruyama, Dougan et al. 2015), un inhibiteur de la ligase IV ou le RS-1 (Song, Yang et al. 2016), un stimulateur de Rad51. Ces deux molécules ont été utilisées au cours de ma thèse et leurs effets seront discutés dans d'autres chapitres.

1.2.1.8.3 Vectorisation du système CRISPR/Cas9

Les AAV constituent le moyen le plus sûr de nos jours en termes de vecteurs viraux destinés à la thérapie génique. Outre les limites liées à l'utilisation de ces vecteurs telles que la réponse immunitaire (environ une personne sur trois est immunisée contre les AAV) et la transduction variable des tissus, la taille limite d'encapsulation d'un transgène est d'environ 4,5 Kb et reste le principal handicap à la vectorisation du système CRISPR/Cas9. La SpCas9 comporte à elle seule environ 1300 a.a sans compter les autres composants et le promoteur. Malgré le développement de mini-promoteurs, l'utilisation de SpCas9 *in vivo* nécessite souvent l'association de deux AAV, un pour la Cas9 et l'autre pour guide ARN et la matrice de

réparation. L'utilisation de Cas9 plus courtes telle que celle de *Staphilococcus aureus* (environ 300 a.a. de moins) permet l'encapsulation des composants dans un seul vecteur.

Une autre limite de l'association CRISPR/Cas9-AAV est l'expression durable de la Cas9 dans les cellules, ce qui entraînerait un effet hors-cible. Plusieurs équipes ont pu développer des vecteurs non-viraux afin de transférer la Cas9 sous forme d'ARNm ou complexe ribonucléoprotéique qui seraient dégradable par la cellule. Plusieurs vecteurs ont été testés tels que les vecteurs lipidiques, nano-particules et récemment des particules appelés CRISPR-Gold ont montré leur efficacité chez la souris *mdx* en ayant des effets hors cible réduits (Yin, Song et al. 2016, Lee, Conboy et al. 2017).

1.2.2 Enjeux bioéthiques liés à l'utilisation de CRISPR/Cas9

L'explosion exponentielle des applications du système CRISPR/Cas9 notamment dans le domaine des thérapies géniques a permis le développement de stratégies thérapeutiques pour des maladies qui étaient réfractaires aux stratégies de thérapies géniques conventionnelles. Cependant la manipulation d'une technologie à la fois relativement simple d'utilisation et puissante pose de nombreuses interrogations bioéthiques.

L'infinie possibilité d'édition du génome rendue possible grâce aux nucléases programmables a rapidement ouvert le débat sur son application chez l'homme. Ce véritable couteau suisse du génome permettrait de « personnaliser » le génome humain. Le Dr. Jennifer Doudna décrit cet outil de génie génétique dans son livre intitulé « *A Crack in Creation* » :

« Pratiquement du jour au lendemain, nous nous sommes retrouvés à l'aube d'un nouvel âge en génie génétique et en maîtrise biologique - une ère révolutionnaire dans laquelle les possibilités ne sont limitées que par notre imagination collective. »

En 2015, une équipe chinoise a publié l'utilisation du système CRISPR/Cas9 dans des embryons humains non-viables. Cette étude représente une étape majeure de l'édition du génome : la première tentative de modification de cellules germinales humaines.

La capacité de cet outil à modifier une séquence de l'ADN pose deux points majeurs qui nécessitent réflexion : l'effet hors-cible et la modification des cellules germinales.

L'effet hors-cible consiste à modifier une séquence autre que celle ciblée. Les modifications apportées par le système CRISPR/Cas9 sont permanentes. Les effets hors-cibles que CRISPR/Cas9 pourrait induire dans les cellules somatiques n'impliqueraient que la personne traitée. Leur évaluation pourrait être assimilée à celle des thérapies géniques conventionnelles où le facteur déterminant est la balance bénéfice/risque pour le patient. Il faudrait bien comprendre les risques et avoir les moyens technologiques qui permettent l'identification et la détection de ces effets hors-cibles. Ils peuvent ainsi être évaluées par les organismes réglementaires actuels afin d'approuver la justification de l'usage de cette thérapie sur les cellules somatiques du patient.

Depuis des millions d'années, la vie a progressé selon la théorie de l'évolution qui stipule que les organismes développent des mutations aléatoires dont certaines leur confèrent des avantages. En modifiant les cellules germinales, l'expérimentateur modifieraient le flux d'informations génétiques qui connecte une génération à une autre et pourrait ainsi en quelque sorte orienter l'évolution en modifiant l'ADN des générations futures. Ainsi il faudrait considérer que ces modifications, notamment les effets hors-cibles, impliqueraient le patient traité mais aussi ses descendants. Il serait irresponsable d'envisager une utilisation en clinique de cet outil pour traiter des cellules germinales sans avoir maitrisé son profil de biosécurité et son innocuité. De plus, son utilisation devrait être contrôlée et encadrée par une réglementation appropriée alors que plusieurs discordances existent entre les réglementations des différents pays. D'où la nécessité d'une harmonisation et d'un consensus global qui

définiraient le cadre légal de cette application thérapeutique. Cette réglementation serait sujette à une réévaluation régulière au fur et à mesure que le développement technologique permettrait une meilleure compréhension et une maîtrise de l'édition du génome.

2 Contexte et objectifs de la thèse

La plupart des myopathies sont des maladies monogéniques rares ayant un impact important sur les patients, les familles et notre système de soin. La myopathie centronucléaire à transmission autosomique dominante est causée par des mutations hétérozygotes principalement au niveau du gène *DNM2*. A ce jour, il n'existe pas de traitement spécifique pour cette maladie. Théoriquement, la stratégie thérapeutique la plus efficace pour les maladies monogéniques consisterait à corriger la mutation au niveau du génome du patient. Aujourd'hui les technologies innovantes de correction du génome utilisant des nucléases guidées constituent une alternative prometteuse qui permettrait de corriger directement la mutation. L'outil le plus prometteur de cette famille de nucléases est la classe d'endonucléases CRISPR/Cas9 qui ciblent une séquence bien définie du génome grâce à un guide ARN. Cette enzyme coupe l'ADN double brin ce qui sollicite la machinerie cellulaire de réparation de l'ADN. Les deux voies majeures sont la voix du **NHEJ** (Non-homologous end-joining) qui permet l'inactivation des gènes et celle de l'**HDR** (Homology directed repair) qui permet la correction précise de la séquence ciblée. Les mutations CNM-DNM2 étant des mutations hétérozygotes, le défi de mon projet consiste à cibler de manière spécifique l'allèle muté.

Nous proposons deux stratégies. La première consiste à corriger la mutation de manière à restaurer un allèle sauvage (WT). La seconde approche consiste à inactiver de manière spécifique l'allèle muté. En effet pour ce deuxième point, les travaux du Dr. Belinda Cowling dans l'équipe ont démontré que la réduction de la DMN2 représenterait une stratégie thérapeutique potentielle pour les CNM et que la réduction de la DNM2 de 50% n'a pas d'impact phénotypique au moins chez la souris (Cowling, Chevremont et al. 2014). Cette approche serait plus appropriée pour les thérapies CRISPR/Cas9 du muscle car ce dernier est

constitué essentiellement par des cellules post-mitotiques où la voie de l'HDR n'est pas active.

Le but de mon projet est d'établir un modèle cellulaire qui se rapproche du contexte musculaire afin de valider la preuve de principe de la correction ou l'inactivation de la mutation DNM2 R465W allèle-spécifique au niveau du génome *in vitro* et *in vivo* comme stratégie thérapeutique potentielle pour ces myopathies congénitales.

La deuxième partie de mon projet consiste à élucider les mécanismes pathologiques cellulaires de la myopathie centronucléaire à transmission AD et de décrire des phénotypes cellulaires liés aux mutations CNM-DNM2. En inactivant ou corrigeant les mutations CNM-DNM2 de manière allèle-spécifique, je testerai le potentiel du système CRISPR/Cas9 à corriger ces phénotypes.

3 Matériels et méthodes (non publiés)

Quantification de l'état redox mitochondrial

Les myoblastes murins immortalisés ont été cultivés dans le milieu de prolifération jusqu'à 50% de confluence. Après trois lavages au PBS 1X, les cellules ont été incubées en présence de la sonde MitoSOX™ 5 µM (Molecular Probes) dans l'HBSS pendant 10 mn à 37°C. Les cellules ont été ensuite traitées par la trypsine diluée pendant 5 mn. La trypsine a été inactivée par le milieu de prolifération et les cellules ont été centrifugées à 1200 rpm pendant 5 mn. Les cellules ont été resuspendues dans du PBS 1X et remises sur glace. L'intensité de fluorescence par cellule a été mesurée par un cytomètre en flux (FACS) et la moyenne géométrique de l'intensité de chaque expérience indépendante a été déterminée par le logiciel FlowJo.

Polymérisation de l'actine *de novo*

Les myoblastes murins immortalisés ont été cultivés dans le milieu de prolifération jusqu'à 50% de confluence. Après trois lavages au PBS 1X, les cellules ont été perméabilisées durant 6 mn avec la digitonine 0,3 µM dans le milieu KGEP (mM:139 K-glutamate, 20 PIPES, 5 EGTA, 2 ATP-Mg^{2+} et 10 µM Ca^{2+}, pH6.6) en présence de l'actine-G-AF488 (Molecular Probes). Les cellules ont été ensuite fixées par le paraformaldéhyde 4% (PFA 4%) pendant 20 mn et les lamelles montées sur lame de verre en utilisant le milieu de montage Fluorsave (Calbiochem). Des images ont été prises par le microscope confocal SP8 (Leica). Le plan équatorial de la cellule a été considéré comme plan de référence. La quantification de la fluorescence moyenne par cellule a été réalisée par le logiciel ImageJ après soustraction de la fluorescence du fond (cellules non traitées par l'actine-G-AF488).

Expérimentation animale

Les protocoles d'expérimentation animale ont été approuvés par le comité éthique de l'institut Com'Eth IGBMC-ICS. Les animaux ont été hébergés dans une animalerie conventionnelle ayant une température contrôlée (19-22°C) et sous un cycle lumière/obscurité de 12:12h. Les souris ont été sacrifiées selon les normes de la législation européenne en vigueur. Les muscles de souris ont été disséqués après les avoir sacrifiées par dislocation cervicale et congelés dans de l'isopentane refroidi dans de l'azote liquide.

Edition du génome *in vivo*

Les souris KI *Dnm2*$^{R465W/+}$ de souche C57BL6/J ont été croisées avec les souris KI Cas9-GFP homozygotes de même souche qui expriment la Cas9 de manière constitutive (Platt, Chen et al. 2014). Les souris KI *Dnm2*$^{R465W/+}$ obtenues expriment la Cas9. A l'âge de 3 semaines ces souris ont été injectées en intramusculaire (tibialis antérieur ; TA) avec 20 µl de préparations d'AAV 2/9 exprimant le guide ARN sous promoteur U6, la CFP (cyan fluorescent protein) sous promoteur CAG et la matrice de réparation ou un AAV vide après anesthésie par injection intrapéritonéale de 5 ml/g de kétamine (20mg/ml ; Virbac, Carros) et de Xylasine (0,4%, Rompun ; Bayer, Wuppertal). La dose utilisée était de 3,6 10^{13} vg/ml. A l'âge de 8 semaines les souris ont été sacrifiées et le TA a été prélevé pour quantifier les modifications génomiques et la réduction du taux protéique de DNM2. Afin d'extraire l'ADN, la moitié du TA a été lysée dans un tampon de lyse et digérée avec la protéinase K pendant 12 h. La protéinase K a été inactivée à 85°C pendant 10 mn. Les amorces G : ACT TTC CAC CTC CAA TCG CTG, D : CGA AGT TAT ACT AGA GCG GCC G ont permis l'amplification spécifique de l'allèle muté (site loxP) et les amorces G : CTT TCC CAC TCC ACA TGC CC, D : CTT GGA GAC TAT GGC TGG GAG ont permis l'amplification spécifique de l'allèle

WT par PCR en utilisant une polymérase haute-fidélité (Phusion High-Fidelity DNA Polymerase ; Thermo Fisher).

Les produits de PCR ont subi des cycles de dénaturation-renaturation de l'ADN de 95°C à 25°C afin de former les hétéroduplexes. Les produits de PCR ont été ensuite déposés sur gel d'acrylamide 10% (Acrylamide 10%, TBE 1X, APS 0,1% et TEMED 0,01%) et migrés à 200V pendant 1h. Après révélation à l'UV, l'intensité des hétéroduplexes et homoduplexes ont été quantifiés par le logiciel ImageJ. L'intensité des hétéroduplexes relative à l'intensité totale (hétéroduplexes + homoduplexes) reflète le taux de modifications génomiques.

Production AAV

Les AAV 2/9 codant pour un guide ARN sous promoteur U6, la CFP sous promoteur CAG et la matrice de réparation (identique à celle utilisée dans les cellules) ont été produits par la plateforme de biologie moléculaire de l'IGBMC par la technique de tri-transfection des cellules HEK 293. Les particules physiques ont été quantifiées par PCR en temps réel et les titres de vecteurs sont exprimés en génome viral par ml (vg/ml).

4 Résultats

4.1 Inactivation et correction allèle-spécifique de la mutation DNM2 R465W *in cellulo*

Publication 1 (1er auteur) : « **Allele-specific CRISPR/Cas9 correction of a heterozygous DNM2 mutation rescues centronuclear myopathy cell phenotypes** »

4.1.1 Contexte de l'étude

La myopathie centronucléaire à transmission AD est causée par des mutations ponctuelles hétérozygotes gain de fonction au niveau du gène qui code pour la DNM2. La mutation la plus fréquente est R465W. A ce jour, il n'existe pas de traitement spécifique de cette forme de myopathie centronucléaire. Théoriquement, le moyen le plus efficace serait de corriger directement les mutations en cause et ce le plus tôt possible au cours du développement de la maladie. Aujourd'hui, les technologies innovantes de correction du génome utilisant des nucléases guidées constituent une alternative prometteuse qui permettrait de corriger directement la mutation, donc la cause de la pathologie. Ces outils ont été récemment utilisés notamment dans un modèle murin de la Dystrophie de Duchenne, mais leur potentiel à corriger des mutations ponctuelles hétérozygotes n'a été que rarement exploité. L'endonucléase Cas9 du système CRISPR/Cas9 coupe l'ADN double-brin au niveau de la séquence ciblée grâce à un guide ARN, ce qui entraîne l'activation de la machinerie cellulaire de réparation de l'ADN. Les deux voies majeures sont le NHEJ qui introduit des indels et donc inactive le gène, et l'HDR qui corrige de manière précise l'ADN. Nous proposons deux stratégies. La première consiste à corriger la mutation DNM2 R465W de manière à restaurer un allèle WT (HDR). La seconde approche consiste à inactiver de manière spécifique l'allèle muté (NHEJ). En effet pour ce deuxième point, les travaux du Dr. Belinda Cowling (Cowling, Chevremont et al. 2014) dans l'équipe ont démontré que la réduction de la DMN2

représenterait une stratégie thérapeutique potentielle pour les CNM et que la réduction de la DNM2 de 50% n'a pas d'impact phénotypique au moins chez la souris. L'objectif de cette partie du projet de ma thèse est de tester et valider l'efficacité et la spécificité des outils CRISPR/Cas9 sur des cellules portant une mutation hétérozygote DNM2.

La DNM2 est impliquée dans plusieurs processus cellulaires. Cependant les mécanismes physiopathologiques de la myopathie centronucléaire à transmission AD ne sont pas bien élucidés, notamment au niveau cellulaire. Plusieurs études ont évalué l'impact des mutations CNM-DNM2 sur l'endocytose mais leurs résultats étaient basés sur une sur-expression des mutants ou sur des observations dans des cellules non-musculaires. Le but de mon projet de thèse est de décrire des phénotypes cellulaires liés à DNM2 dans un contexte musculaire exprimant un niveau endogène de DNM2 et ensuite vérifier si ces phénotypes seraient corrigés par l'inactivation ou la correction allèle-spécifique de la mutation DNM2 R465W.

4.1.2 Résultats

Afin de tester l'outil CRISPR/Cas9 (Cas9, guide ARN et matrice de réparation), j'ai immortalisé des myoblastes de souris KI *Dnm2*$^{R465W/+}$ en insérant le gène CDK4 (Cyclin-Dependant Kinase 4) après infection par un lentivirus. Ces myoblastes se différencient en myotubes après 7 jours de différentiation et ont ainsi gardé leur potentiel myogénique. L'utilisation de guides ARN tronqués (18 nucléotides) a permis de cibler spécifiquement l'allèle muté dans les myoblastes de souris immortalisés et les fibroblastes de patient portant la même mutation. La mutation DNM2 R465W a été inactivée (NHEJ ; 95% dans les myoblastes murins) ou corrigée (HDR ; 6% dans les myoblastes murins). Des clones ont été ainsi isolés : les clones NHEJ présentent des indels au niveau de l'allèle muté et n'expriment qu'environ 50% de DNM2 WT, les clones HDR présentent deux allèles WT et expriment 100% de DNM2.

La DNM2 est une GTPase ubiquitaire impliquée dans plusieurs processus biologiques dont le plus décrit est la fission des vésicules lors de l'endocytose. Afin d'évaluer l'impact de la mutation R465W sur l'endocytose, j'ai mesuré l'intensité du signal intracellulaire de la transferrine couplée à la CY3 dans les lignées de myoblastes immortalisés de souris WT et KI *Dnm2*$^{R465W/+}$. Ces derniers montrent une augmentation de la transferrine internalisée, suggérant un mécanisme gain-de-fonction de la mutation. Ce phénotype a été confirmé dans les myoblastes de patients portant les mutations R369Q et R465W.

Schulze *et al.* ont relevé le rôle de la DNM2 dans l'autophagie (Schulze, Weller et al. 2013). Dans les conditions basales, les myoblastes KI *Dnm2*$^{R465W/+}$ montrent une accumulation du marqueur de l'autophagie LC3-II. Le traitement par l'inhibiteur de la dégradation par les autolysosomes (BafA1) induit une augmentation de LC3-II. Cette augmentation a été de 4 fois dans les myoblastes WT et de 1,8 dans les myoblastes KI *Dnm2*$^{R465W/+}$, suggérant un défaut d'autophagie lié à la mutation DNM2 R465W.

L'inactivation ou la correction allèle-spécifique de la mutation hétérozygote a corrigé ces phénotypes.

4.1.3 Résultats non publiés

4.1.3.1 Détection de l'HDR dans un pool cellulaire

L'analyse des clones a montré un faible taux d'HDR dans les myoblastes de souris (6% pour le guide C20) et aucun clone de fibroblastes de patient n'a été détecté. Afin de détecter l'ADN corrigé par la voie de l'HDR dans un pool cellulaire, j'ai optimisé des amorces HDR-spécifiques qui s'hybrident aux mutations silencieuses intégrées par la matrice de réparation. En utilisant ces amorces, j'ai pu amplifier la séquence corrigée via HDR en qPCR dans les fibroblastes de patients et murins transfectés par le plasmide Cas9/guide ARN et matrice de réparation. Cette amplification a été absente dans les celllules non transfectées utilisées comme contrôles. Le séquençage des produits de qPCR a montré l'incorporation des

mutations silencieuses. Cette approche a permis de détecter les modifications via l'HDR dans un pool cellulaire en analysant plus d'évènements par rapport à l'analyse des séquences des clones.

4.1.3.2 Augmenter l'HDR

Plusieurs études ont suggéré que l'inhibition de la voie NHEJ (Maruyama, Dougan et al. 2015) ou la stimulation de la voie HDR (Song, Yang et al. 2016) par des modulateurs pharmacologiques augmenterait le pourcentage des cellules corrigées par la voie de l'HDR. Une autre étude a aussi rapporté que l'utilisation de matrice de réparation modifiée chimiquement augmente aussi l'HDR (Renaud, Boix et al. 2016). Une des modifications est une matrice simple brin avec des phosphorothioate-extrémité 5' et 3' qui confèrerait une résistance contre les nucléases cellulaires et ainsi une meilleure stabilité. Au cours de mon projet de thèse, j'ai testé trois approches : l'inhibition du NHEJ par SCR7, un inhibiteur de la ligase IV, la stimulation de l'HDR par RS-1, une drogue qui stimule le complexe Rad51 et une matrice de réparation modifiée dans les myoblastes murins. L'analyse des clones n'a pas montré une augmentation du taux d'HDR.

4.1.3.3 État redox mitochondrial

La DNM2 est impliquée dans la fission mitochondriale après l'action de constriction par Drp1. Afin d'évaluer l'impact de la mutation R465W sur l'état redox des mitochondries, les myoblastes murins ont été cultivés avec un indicateur fluorescent de la production de l'anion superoxide : MitoSOX™ (Thermofisher Scientific). Les résultats (Figure 11) n'ont pas montré de différence statistiquement significative entre les myoblastes de souris WT et KI *Dnm2*$^{R465W/+}$. Ces résultats préliminaires suggèrent que la mutation DNM2 R465W n'a pas d'impact sur l'activité oxydative de la mitochondrie.

4.1.3.4 Polymérisation de l'actine

Enfin, afin d'évaluer l'impact de la mutation sur la dynamique de l'actine dans les myoblastes murins, les cellules ont été incubées avec de l'actine monomérique marquée par un fluorophore afin de quantifier son incorporation *de novo* après perméabilisation par la digitonine. Après 6 min d'incubation, l'actine G s'est polymérisée dans le réseau d'actine cellulaire (Figure 12A). La quantification de l'intensité de fluorescence n'a pas montré de différence significative entre les myoblastes de souris WT et KI *Dnm2*$^{R465W/+}$ (Figure 12B). La quantification du ratio entre l'actine monomérique et l'actine filamenteuse dans ces lignées pourrait infirmer l'impact de la mutation DNM2 R465W sur la dynamique de l'actine.

4.1.4 Contributions :

Le Dr. Bernardo Reina San-Martin (IGBMC) a fourni les plasmides CRISPR/Cas9 et effectué le design des guides ARN et des matrices de réparation, Kamel Mamchaoui (Institut de Myologie) a immortalisé les fibroblastes de patients. J'ai généré et caractérisé les myoblastes immortalisés de souris et testé l'allèle-spécificité des guides ARN sur des cellules Hela, fibroblastes de patient et myoblastes murins puis j'ai effectué les tests fonctionnels.

Title

Allele-specific CRISPR/Cas9 correction of a heterozygous *DNM2* mutation rescues centronuclear myopathy cell phenotypes

Aymen Rabai[1,2,3,4], Léa Reisser[1,2,3,4], Bernardo Reina-San-Martin[1,2,3,4], Kamel Mamchoui[5], Belinda S. Cowling[1,2,3,4], Anne-Sophie Nicot[1,2,3,4], Jocelyn Laporte[1,2,3,4]

[1]Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Illkirch, France
[2]INSERM U1258, Illkirch, France
[3]CNRS UMR7104, Illkirch, France
[4]Strasbourg University, Illkirch, France
[5]UMR S787, Institut de Myologie, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France
Correspondence should be addressed to J.L. (jocelyn@igbmc.fr). Tel: +33 3 88653412; Fax: +33 3 88653246;
The work was done in Illkirch, France.

ABSTRACT

Genome editing with the CRISPR/Cas9 technology has emerged recently as potential strategy for therapy in genetic diseases. For dominant mutations linked to gain-of-function effects, allele-specific correction may be the most suitable approach. Here we tested allele-specific inactivation or correction of a heterozygous mutation in the Dynamin 2 (*DNM2*) gene causing the autosomal dominant form of centronuclear myopathies (CNM), a rare muscle disorder belonging to the large group of congenital myopathies. Truncated single guide RNAs targeting specifically the mutated allele were tested on cells derived from a mouse model and patients. The mutated allele was successfully targeted in patient fibroblasts and *Dnm2*$^{R465W/+}$ mouse myoblasts, and clones were obtained with both precise genome correction or inactivation. *Dnm2*$^{R465W/+}$ myoblasts showed an alteration in transferrin uptake and autophagy. Specific inactivation or correction of the mutated allele rescued these phenotypes. These findings illustrate the potential of CRISPR/Cas9 to target and correct heterozygous point mutations leading to a gain-of-function effect in an allele-specific manner, and to rescue autosomal dominant CNM-related phenotypes. This strategy may be suitable to a large number of diseases caused by germ-line or somatic mutations resulting in a gain-of-function mechanism.

.

INTRODUCTION

Autosomal dominant diseases represent a challenge for therapies. Whereas haploinsufficiency might be treated by conventional gene replacement, diseases linked to gain-of-function or toxic effect in essential proteins require the targeting of the mutated allele. The mutated allele can be either inactivated, leading to haploinsufficiency, or corrected to revert to a wild-type genotype. In the case of disease-implicated genes essential for cellular functions, allele-specific correction would be preferred to avoid deleterious effects due to an overall decrease of the protein expression. Here we tested the potential of genome editing to rescue the phenotypes of a dominant disease through allele-specific inactivation or correction.

Allele-specific gene inactivation can be achieved through gene silencing with shRNA (1) or antisense oligonucleotides, leading to haploinsufficiency. Mutation correction can be obtained at the RNA level through trans-splicing (2) (3), albeit allele-specific targeting is still challenging with this strategy. The most upstream approach would be to target the mutation at the DNA level. Genome editing using programmable nucleases has emerged as a powerful tool to target specific sequences. The Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)-related CRISPR associated protein 9 (Cas9) system is the most commonly used tool. Cas9 endonuclease is guided to a specific DNA sequence by a single-guide RNA (sgRNA) (4) and makes a double-strand break (DSB) which triggers the cellular repair machinery. The main repair pathways are the “error prone” non-homologous end joining (NHEJ) mainly leading to gene inactivation, or the precise correction via homologous directed repair (HDR) with the help of a DNA repair template (5). Monteys *et al*. (6) assessed the allele specificity of CRISPR/Cas9 based on SNPs in *cis* that form a Protospacer Adjacent Motif (PAM) on the huntingtin mutated allele in patients’ fibroblasts, while Yamamoto et al. (7) assessed the specificity of CRISPR/Cas9 to target a heterozygous single point mutation in the *CALM2* gene in human induced pluripotent stem cells. Both studies disrupted specifically the mutated allele by non-homologous end joining (NHEJ) but did not report allele-specific correction.

As a paradigm to test allele-specific genome editing, we focused on a dominant form of centronuclear myopathy (CNM). CNM are rare muscle disorders belonging to the group of congenital myopathies. Several forms of the disease have been described with different severities (8). The autosomal dominant form is characterized by neonatal to adult onset, muscle weakness and delayed motor milestones. Autosomal dominant CNM is mainly caused by heterozygous mutations in the *DNM2* gene which encodes for the dynamin 2 (DNM2) GTPase enzyme (9,10). The *DNM2* R465W point mutation represents the most frequent mutation occurring in approximately 1 out of 4 patients (11). A knock-in (KI) mouse model of this mutation has been generated and develops a progressive muscle weakness with reduced muscle force and histological features including reduced fiber size and central accumulation of oxidative staining (12). *In vitro*, *DNM2*-CNM mutations enhance the GTPase activity and promote oligomerization, suggesting a gain-of-function pathomechanism (13,14). However, this gain-of-function hypothesis has not been fully validated at the cellular level. DNM2 is an ubiquitous GTPase involved in the fission of endocytic vesicles during clathrin-mediated endocytosis (15), cytoskeleton interaction (16-18) and autophagy regulation (19). Alterations of transferrin or EGFR uptake in cells expressing different DNM2 mutants have been reported, suggesting a defect in endocytosis (20-22). In mouse embryonic fibroblasts (MEF) harboring the DNM2 R465W mutation at

the homozygous state, autophagy defects were also reported (23). However, the cellular pathomechanism of the disease is still not well understood. To date, there is no specific treatment for the autosomal dominant form of centronuclear myopathy, and the potential of using CRISPR/Cas9 to treat dominant inherited diseases has yet to be better explored.

The aim of this study is to assess the impact of the most common DNM2 R465W mutation on cellular pathways in myoblasts, providing a cellular context to investigate the disease, and to determine if genome editing can inactivate (NHEJ) or correct (HDR) the *DNM2* mutation in an allele-specific manner and reverse the disease related phenotypes.

RESULTS

Establishment of *Dnm2*$^{R465W/+}$ knock-in immortalized myoblasts

To be able to assess the cellular pathology and the efficiency of the CRISPR/Cas9 system in cells relevant for the disease, we established *Dnm2*$^{R465W/+}$ immortalized myoblasts. Primary myoblasts were isolated from lower limb muscles of postnatal day 5 (P5) WT and *Dnm2*$^{R465W/+}$ mice and transduced with a lentivirus expressing CDK4. After antibiotic selection of CDK4 expressing clones, cell sorting and clone expansion, 3 WT and 2 *Dnm2*$^{R465W/+}$ (thereafter named KI) clones were established. The genotype was confirmed by PCR and Sanger sequencing (Fig. 1A). We verified that immortalization did not affect their ability to fuse into myotubes (Fig. 1B-C). After 7 days in differentiation medium, all clones were able to differentiate into myotubes, as assessed by the fusion index and the expression of caveolin 3 (Fig. 1B-C). The DNM2 mutation had no significant impact on the DNM2 protein level in these muscle cells (Fig. 2F-G).

Allele-specific inactivation and correction of the *DNM2* mutation

DNM2-related CNM is mainly caused by heterozygous single point mutations. The CGG codon in human or the AGG codon in mouse (Fig. 2A) code for the conserved arginine residue. In patient and *Dnm2*$^{R465W/+}$ KI mouse CGG and AGG codons are changed into TGG encoding a tryptophan To inactivate or correct specifically the mutated human and mouse alleles, we designed pan-allelic gRNAs targeting both the mutated and wild-type alleles or allele-specific gRNAs targeting only the mutated allele (Fig. 2B and 2C). For the pan-allelic gRNAs the PAM was selected precisely at the codon encoding R465 (**C**GG or **A**GG in humans and mice, respectively) or at the R465W (**T**GG) mutation. As the first nucleotide of the PAM is variable (NGG), these gRNAs should recognize both alleles. To avoid off-target effects and to provide allele-specific recognition of the mutated allele, we used 18 bp truncated gRNAs (25). The PAM for the allele-specific gRNAs was selected downstream of the R465W (**T**GG) mutation, thus generating a 1 bp mismatch between the gRNA and the wild-type allele target sequence (Figure 2B and 2C). As tru-gRNAs are sensitive to mismatches, this should provide allele-specificity (25).

Cells were transfected with a vector co-expressing Cas9-EGFP and the gRNA together with a 200 bp single-stranded oligonucleotide (ssODN) homology directed repair (HDR) template bearing silent mutations allowing to determine correct integration by restriction digest (Fig. 2B and 2C). Cells were sorted for EGFP expression and cultured under clonal conditions. Individual clones were isolated and genotyped by PCR, restriction digest and Sanger sequencing to score for inactivating mutations

through NHEJ or for correction through HDR. NEHJ-mediated repair led to small insertions or deletions (Fig. 2D), with 86% of out-of-frame modifications potentially leading to premature stop codons. Although HDR was less frequent, it allowed the correction of the *DNM2* point mutation (Fig. 2D). Correct HDR events were verified by restriction digest (Fig. 2E). In conclusion, both inactivation and specific correction of the mutated allele were achieved.

To test CRISPR/Cas9 mediated genome editing in human cells, we transfected HeLa cells with a pan-allelic sgRNA (HeLa cells harbor only the wild-type allele) and an HDR template. Genomic modification through NHEJ and HDR was obtained with an efficiency of 13,5% and 9,5% , respectively (Table). To validate allele-specific targeting in human cells, we used immortalized fibroblasts obtained from patients harboring the heterozygous DNM2 R465W mutation and an allele-specific gRNA. Analysis of single cell clones showed 60% NHEJ (Table). Importantly, all of the NHEJ events detected occurred exclusively on the mutated allele (Table).

To determine whether allele-specific inactivation or correction of the DNM2 mutation can be achieved in a muscular context, two allele-specific gRNAs and one pan-allelic gRNA were transfected together with an HDR template into immortalized KI myoblasts derived from the *Dnm2*$^{R465W/+}$ mouse model. While one of the allele-specific gRNAs led exclusively to clones with NHEJ (95%), the other led to NHEJ (90,62%) and HDR (6,25%) (Table; SI Appendix, Fig. S1). As expected, in the corrected clones, the mutated T was reverted to A and 3 silent mutations were introduced (Fig. 2D). HDR was confirmed by restriction digest (Fig. 2E). Notably, while the pan-allelic sgRNA targeted both alleles (25% of clones modified), only the mutated allele was targeted with the allele-specific gRNAs.

In addition, the allele-specificity was also verified by quantification using heteroduplex mobility assay on the cell pools. The WT allele of the C19, C20 and C22 transfected and GFP sorted cell pools was specifically amplified, using a PCR primer that is disrupted by the loxP site present on the mutated allele of the KI myoblasts (SI Appendix, Fig. S2). After denaturation-annealing cycles, heteroduplex were formed and migrated slower than homoduplex in native PAGE 10% due to the open angle caused by the mismatched DNA of the indel mutations. The pan-allelic sgRNA (C22) targeted the WT allele with an efficiency of 37% while the allele specific sgRNAs modifications of the WT allele were 8% and 4% respectively for the C19 and C20 sgRNAs (SI Appendix, Fig. S3). These minor modifications on the WT allele were not detected in clonal analysis due to the lower analyzed events compared to the cell pools.

We assessed the effect of NHEJ modification on the DNM2 protein level. Among the isolated myoblast clones, some of them carried allele-specific out-of-frame insertion-deletions (indels) and were expected to produce premature stop codons, and others carried allele-specific in-frame indels (SI Appendix, Fig. S1). DNM2 protein level was quantified by western blot in these two types of clones (Fig. 2F-G). In cells with out-of-frame indels (KI1-NHEJ1, KI1-NHEJ3 and KI1-NHEJ5), DNM2 was decreased to about half the level found in WT cells and in non-edited KI cells (KI1-NHEJ1: 0.27±0.05; KI1-NHEJ3: 0.25±0.1; KI1-NHEJ5: 0.43±0.18). However, no protein reduction was observed following allele-specific in-frame deletion (clone KI1-NHEJ4). We conclude that out-of-frame indels lead to protein disruption, supporting that NHEJ modification can be used to remove the disease-causing

mutated protein. Conversely, allele-specific correction by HDR leads to expression of a normal level of DNM2 (Fig. 2F-G).

We conclude that allele-specific inactivation and/or correction of the mutated R465W allele was achieved in different cell types from both murine and human origin.

Allele-specific inactivation or correction of the DNM2 mutation rescue the alterations in endocytosis

DNM2 is important for the fission of vesicles during clathrin-mediated endocytosis (27). Contradictory data were previously reported on the impact of DNM2-CNM mutations on endocytosis with either no effect or decreased endocytosis (20,22,28). These previous data were obtained on transfected cells or on non-muscle cells. To assess the impact of the R465W mutation on the endocytic pathway in a muscular context expressing DNM2 endogenously, CY3-labelled transferrin uptake was measured in mouse immortalized myoblasts using FACS at indicated times (Fig. 3A). The two independent *Dnm2*$^{R465W/+}$ KI myoblasts lines showed an increase of transferrin uptake after 10 and 20 min compared to 3 independent WT myoblasts lines (at 10 min, KI1: 2.42±0.28 fold increase; KI2 1.77±0.25; at 20 min, KI1: 1.93±0.35. KI2: 2.15±0.06). To analyze the contribution of DNM2 in this phenotype, we used a dynamin pharmacological inhibitor, dynole 34-2 (29) (Fig. 3B). Transferrin uptake was inhibited in WT and KI myoblasts with a concentration of 5µM (WT1: 1.15±0.03; WT2: 0.82±0.32; WT3: 0.88±0.14; KI1: 2.6±0.11; KI2: 1.43±0.22) and 50 µM (WT1: 0.41±0.04; WT2: 0.26±0.16; WT3: 0.3±0.15; KI1: 0.98±0.06; KI2: 0.63±0.13), validating the increase of transferrin uptake seen in KI myoblasts is due to DNM2 impairment. In addition, DNM2 inhibition by dynole 34-2 at 50 µM normalized the increase of transferrin uptake in KI clones (Fig. 3B). To confirm if this endocytosis alteration is disease-relevant, we quantified the transferrin uptake in human myoblast lines (Fig. 3C-D). Three controls and two patient lines with different *DNM2* mutations were used. Myoblasts derived from patient biopsies harboring DNM2 R465W and R369Q mutations showed an increase of transferrin uptake compared to control cells (R465W: 15.2±1.11 intensity mean; R369Q: 8.66±0.25; controls between 3 and 5). This phenotype was also observed both in primary and immortalized myoblasts (Fig. 3D). Taken together, these data show that DNM2-CNM mutations increase endocytosis in muscle cells, and behave as gain-of-function mutations.

We further investigated the potential of allele-specific genome editing to rescue this phenotype in mouse myoblasts. Allele-specific out-of-frame NHEJ inactivation of the mutated allele decreased the transferrin uptake at 10 min compared to the mutated cells and partially rescued or fully normalized the endocytosis phenotype (Fig. 3E). Allele-specific NHEJ in-frame deletion also normalized the phenotype. Of note, both out-of-frame and in-frame NHEJ modifications recue the phenotype albeit out-of-frame NHEJ led to decreased DNM2 protein level while the in-frame NHEJ clone had a normal DNM2 level, suggesting the in-frame NHEJ led to protein inactivation as well.

In addition, using a pan-allelic sgRNA, we generated one clone (KI1-NHEJ7; Fig. 3E) in which the WT allele was disrupted through out-of-frame NHEJ while the mutated allele was preserved. In that specific clone, we didn't observe a statistically significant difference compared to non-edited myoblasts, suggesting that the mutated protein is more active than the WT protein.

Concerning the allele-specific correction through HDR, the two tested clones rescued the endocytosis phenotype in these myoblasts (Fig. 3E).

In conclusion, allele-specific inactivation or correction rescue the alteration of endocytosis found in the *Dnm2*$^{R465W/+}$ KI myoblasts.

Allele-specific inactivation or correction of the DNM2 mutation rescue autophagy defects

DNM2 was proposed to play a role in autophagy via autophagic lysosome reformation (19). Previously, a study reported a decrease in autophagy dynamics in mouse embryonic fibroblast with a homozygous R465W mutation (23). However, the impact of a heterozygous DNM2 mutation in a muscle cell was never reported.

In order to assess the impact of the DNM2 R465W mutation on autophagy flux in myoblasts, LC3-II level was quantified by western blot in WT and *Dnm2*$^{R465W/+}$ KI immortalized myoblasts treated or not with bafilomycin A1 (BafA1) under basal and starved conditions. BafA1 inhibits the lysosomal Na^+/H^+ pump and in consequence blocks the autophagy flux at the degradation step in the autolysosomes. Under basal conditions in untreated cells, the KI myoblasts showed an increase of lipidated LC3 (LC3-II) levels compared to WT myoblasts (WT1: 1.36±0.19; WT2: 1.25±0.49; KI1: 3.46±1.04; KI2: 3.3±0.5) (Fig. 4A-B). In order to define if this observation underlines a blockade or an increase in autophagy, BafA1-treated cells were analyzed. Under basal conditions, BafA1 treatment induced an increase of around 4-fold of LC3-II in WT myoblasts (Fig. 4A, C). However, in KI myoblasts the effect of BafA1 was increased by only 1.65 or 1.86-fold depending on the clones. Under starved condition, BafA1-induced increase in LC3-II was hampered in KI myoblasts, albeit the difference with WT myoblasts was not statistically significant (Fig. 4C). Altogether, these data suggest a decrease in autophagy dynamics in KI myoblasts.

To assess whether the inactivation or the correction of the DNM2 R465W mutation could reverse the autophagy defects, LC3-II expression level was quantified in edited myoblasts under basal condition after BafA1 treatment. In allele-specific NHEJ inactivated clones, both by out-of-frame or in-frame indels, the BafA1-induced accumulation of LC3-II was increased compared to the non-edited KI myoblasts, to the level observed in WT myoblasts (Fig. 4D-E). In allele-specific HDR corrected clones, we also observed a similar rescue, with a BafA1-induced LC3-II/GAPDH accumulation ratio of 4.5 and 4.8-fold depending on the clones that was comparable to the WT value of 4-fold (Fig. 4F-G). Overall, allele-specific inactivation or correction rescued the alteration of autophagy observed in the *Dnm2*$^{R465W/+}$ KI myoblasts.

DISCUSSION

In this study, we investigated the pathomechanisms of DNM2-related centronuclear myopathy in muscle cells from a mouse model and patients' cells and identified an aberrant increase in endocytosis, supporting a gain-of-function effect of DNM2 mutations. Autophagy dynamics were also altered in DNM2 mutated myoblasts. In addition, we validated allele-specific genome editing for inactivation or correction of the mutated allele for this dominant inherited disease and showed that both correlated with a rescue of the different DNM2-CNM phenotypes.

Pathomechanisms of DNM2 centronuclear myopathy

DNM2 is a GTPase involved in the clathrin-mediated endocytosis(30) (31). In this study, we assessed the impact of the most common heterozygous DNM2 mutation (R465W) on transferrin uptake. We observed a significant increase of transferrin uptake in *Dnm2*$^{R465W/+}$ murine myoblasts. The same phenotype was observed when CY3-labelled transferrin was visualized in patients' myoblasts compared to controls. In addition, inhibition of DNM2 activity with dynole 34-2 suggested this phenotype is linked to dynamin. Moreover, this endocytosis increase was rescued by either inactivation or correction of the DNM2 mutation, strongly supporting this mutation increases endocytosis rate.

These findings support the idea that DNM2-CNM mutations are gain-of-function, leading to a mutated protein with increased activity. This hypothesis is supported by previous *in vitro* experiments showing this mutation increases the GTPase activity and the oligomerization of mutated DNM2 recombinant proteins (14) (13). Of note, our data showed that specific inactivation of the mutated allele (*Dnm2*+/- cells from out-of-frame NHEJ; Fig. 3E) rescued the increased endocytosis, while specific inactivation of the WT allele (*Dnm2*$^{R465W/-}$ cells KI1-NHEJ7; Fig. 3E) had a similar activity as the uncorrected cells. Overall, it supports that the mutated DNM2 is more active than the WT protein.

In contrast to earlier findings, these results describe for the first time an increase in endocytosis due to DNM2-CNM mutations. Liu *et al* (22) used stable cell lines from conditional knock-out mouse fibroblasts infected with viral DNM2 vectors. The authors didn't observe any defect in transferrin uptake related to DNM2-CNM mutations. Trochet *et al.* (32) demonstrated a decrease of transferrin uptake in patients' fibroblasts while Koutsopoulos *et al.* (28) didn't observe a decrease in patients' fibroblasts. In other experiments (20) (28), a decrease of endocytosis was observed based on transient overexpression of DNM2 mutants. We focused our work on myoblasts derived from the mouse model of the disease, to remain in a muscular cellular context linked to the muscle disease. In addition, these myoblasts expressed DNM2 at endogenous level to avoid dominant negative or toxic effects due to overexpression. We verified the DNM2 mutation does not impact on the protein level (Fig. 2G).

Another phenotype we observed in *Dnm2*$^{R465W/+}$ murine myoblasts was a defect in autophagy. These myoblasts showed an accumulation of LC3-II under basal condition and, when autophagy flux was blocked by BafA1, LC3-II increase was compromised compared to WT. These findings suggest that DNM2 R465W mutation impairs autophagic degradation. Durieux *et al*. described the impact of DNM2 R465W homozygous mutation in mouse embryonic fibroblasts (23). Although their results were based on a different cell type and harboring the mutation at homozygous stage, they described a similar defect of LC3 lipidation under BafA1 treatment. DNM2 was described as a key player in the autophagic lysosome reformation during the proto-lysosome scission (33). In accordance, Shulze *et al* (19) reported that the pharmacological inhibition of DNM2 lead to enlarged autolysosomal structures and a compromised autolysosomal degradation.

Overall, we report the alteration of several cellular pathways due to DNM2 mutations, providing novel insight to the pathophysiology mechanisms of this muscle disease. Moreover, the findings that dynole 34-2 treatment normalizes the endocytosis defects suggesting inhibiting dynamin 2 could be developed further for therapeutic application.

Allele-specific correction of a heterozygous gain-of-function mutation

Here we succeeded to target specifically the mutated allele for both allele-specific inactivation and correction in a cell model of centronuclear myopathy linked to DNM2 heterozygous gain-of-function mutation. To achieve the allele-specificity, the guide sequences encompassed the mutation site. To our knowledge, it is a first report on allele-specific CRISPR/Cas9 correction of a dominant mutation. This strategy is especially adapted for gain-of-function mutation in house-keeping genes. The potential of CRISPR/Cas9 to target specifically heterozygous single-point mutations for NHEJ-mediated inactivation was reported in few studies (6,7). Monteys *et al*. assessed the allele specificity of CRISPR/Cas9 based on the SNPs forming a PAM in the huntingtin mutated allele in patients' fibroblasts while Yamato *et al*. targeted the guide sequence to the mutation site. Further development will need to address the efficiency of allele-specific correction *in vivo*. Allele-specific inactivation was recently achieved in heart for *PRKAG2* (34).

In addition, we used for the first time tru-gRNAs to provide allele-specificity. But there is still a risk of off-target effects that could be improved by the use of the high fidelity Cas9 (Cas9-HF1 or eSpCas9) which do not have any detectable off target effects and do not tolerate single bp mismatches between gRNA and targeted sequence (35,36).

In the case of DNM2-CNM, we found that both the specific inactivation and the correction of the heterozygous mutation rescued alterations in endocytosis and autophagy observed in a myoblast cell model. Genome editing thus represents a novel therapeutic approach validated at the pre-clinical level for DNM2-CNM, in addition to RNA silencing (32) and acetylcholine esterase inhibitors (37). As allele-specific correction *in vivo* may be difficult to achieve due to the fact that HDR may not be active in post-mitotic muscle fibers, one would need to either correct muscle progenitors or perform allele-specific NHEJ inactivation. In the case of DNM2-CNM, the later would be effective to potentially rescue the disease. Indeed, *Dnm2* heterozygous knock-out mice expressing 50 % of DNM2 do not display obvious phenotypes (38) and overall reduction of DNM2 through shRNA or antisense oligonucleotides did not induce detrimental effects in mice (26,39).

In conclusion, allele-specific CRISPR/Cas9-mediated correction of heterozygous mutations represents a suitable strategy that would be applicable to a large number of diseases due to germ-line or somatic mutations.

MATERIAL AND METHODS

Cell lines

Mouse primary myoblasts were extracted from hindlimbs of P5 wild-type (WT) and *Dnm2*$^{R465W/+}$ pups after collagenase (Sigma-Aldrich) and dispase (Gibco) digestion. Cell suspension was filtered through a 40 μm strainer. Non-myogenic cells were separated by 1,5 hour incubation and myogenic cells were collected in the supernatant and plated in 1% Matrigel coated wells in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM,Gibco) with 20% FCS and 1% chicken embryo extract (CEE, Gibco). Myoblasts were immortalized using lentivirus encoding for cyclin-dependent kinase 4 (CDK4). Briefly, 100,000 cells were infected with the lentivirus using multiplicity of infection (MOI) of 3 overnight and transduced cells were selected with geneticin for 7 days. Single cells were cloned using fluorescence-activated cell

sorter (FACS, BD) into 96-well plate. When myoblasts reached 50% of confluence, they were transferred to a 24-well plate then to a 6-well plate.
Patient fibroblasts harboring DNM2 R465W mutation were immortalized using a lentiviral encoding for the catalytic subunit of human telomerase (hTERT) vector as described before (24).

Plasmids and design of sgRNAs and HDR templates.
The sequence of exon 11 of the *DNM2 gene* was screened for NGG proto-adjacent motif (PAM) sequences adjacent to the R(CGG)465W(TGG) mutation in humans or to the R(AGG)465W(TGG) mutation in mice. To avoid off-target effects and to provide allele-specific recognition of the mutated allele we used 18 bp truncated gRNAs (25). Plasmids expressing the truncated tru-gRNA through a U6 promoter and co-expressing Cas9-EGFP through a CMV promoter were generated by Golden Gate cloning. As HDR templates we used 200 bp ssDNA oligonucleotides (IDT ultramers) bearing silent mutations to prevent gRNA recognition and Cas9-mediated cleavage of the corrected allele, as well as destruction or addition of specific restriction sites for screening and verification (Fig. 2B).

Cell culture and transfection
HeLa cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Life technologies) with 5% FCS, penicillin 100 U/ml and streptomycin 100 μg/ml. Patient fibroblasts were cultured in DMEM with 10% FCS and gentamicin 40 μg/ml. Mouse immortalized myoblasts were cultured in IMDM (Life technologies) supplemented with 20% FCS, 1% CEE and gentamicin 40 μg/ml.
For transfection, when cells reached 50-60% confluency, Sp-Cas9-EGFP and sgRNA plasmid and a single-stranded donor oligonucleotide (ssODN) as a repair template were transfected using Lipofectamine 3000 (Thermofisher) according to the manufacturer's protocol. 24 hours later, GFP cells were sorted using FACS (BD) and seeded in 6-well plate for expansion. 2 weeks later, single cells were isolated into 96-well plates using FACS. When cells reached 50% confluency, they were transferred to 24-well plate. Cell pellets were homogenized, and DNA of the clones was extracted using lysis buffer and proteinase-K. To genotype the clones, the DNM2 region of interest was amplified and PCR products were sequenced by Sanger sequencing. The following primers were used: human forward: 5'-CCC TGA AGC CCT GCA TGG-3' and human reverse: 5'-GCG TGA GTT ACT ACA CCC AG-3'; mouse forward: 5'-ACT CCA CAT GCC CCT GAC TG-3' and mouse reverse: 5'-TGG GAG GTC GCC AGA TTA GC-3'.

DNM2 quantification
Mouse immortalized myoblasts were seeded into 6-well plate and when reaching 70% confluency, adherent cells were mechanically scratched using RIPA buffer containing PMSF 1mM, DTT 1mM and protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostic) on ice. Lysates were passed through a 25G syringe and centrifuged (13000 g, 4°C, 5 min). Supernatant protein concentration was determined with BCA Protein Assay Kit 5 (Bio-Rad) using BSA concentration range. 20 μg of proteins was denatured at 95°C for 5 min. Samples were migrated on SDS-PAGE gels (10%) and transferred to nitrocellulose membranes using Transblot®Turbo™ (BIO-RAD). Unspecific sites were blocked using Tris buffered

saline (TBS) containing 0,1% Tween-20 (TBST 0,1%) and 3% BSA for 1 hour. DNM2 was detected with a homemade rabbit polyclonal (26) and GAPDH with mouse monoclonal anti-GAPDH (Sigma-Aldrich) antibodies in TBST 0,1% containing 0,5% BSA at 4°C overnight. Membranes were then incubated with peroxidase-conjugated secondary antibodies in TBST 0,1% and 0,5% BSA at room temperature for 45 min. Membranes were revealed using ECL kit (Thermofisher Scientific) and Imager AI 600. Protein quantification was determined using ImageJ software.

Assessment of myoblast differentiation

Mouse immortalized myoblasts were cultured in Ibidi wells (Biovalley) in proliferation medium (IMDM (Life technologies) supplemented with 20% FCS, 1% CEE and gentamicin) until 80% confluent. Differentiation into myotubes was initiated by changing the medium to a differentiation medium containing IMDM supplemented with 3% horse serum and gentamicin 40 μg/ml. Half of the medium was changed after 3 days then every 2 days until 7 days of differentiation. Myotubes were fixed with 4% para-formaldehyde (PFA). Nuclei were stained with Hoechst and myotubes were labeled with anti-caveolin 3 antibody (Santa Cruz) and visualized with fluorescence microscopy (Leica). The fusion index was expressed by counting the number of nuclei per myotube.

Endocytosis assays with Transferrin uptake

For mouse immortalized myoblasts, 100,000 cells were seeded in a 24-well plate coated with 1% matrigel. After 3 hours, cells were starved with IMDM containing 0.5% BSA for 30 min. Cells were then incubated with the same medium containing fluorescently labelled CY3-transferrin (Jackson's Lab) (20 μg/ml) for 10 min on ice and endocytosis was started by incubating the cells at 37 °C. At indicated times, cells were acid washed for 3 min before fixation to remove remaining bound transferrin at the cell surface. Cells were detached using trypsin and fixed with 1% PFA. Cells were resuspended in PBS and analysed by FACS (LSR Fortessa, BD). CY3 intensity geometric mean was measured by FACS Flowjo software. The intensity ratio of each cell line was calculated by dividing its intensity to WT intensity mean in each independent experiment.

For human myoblasts, the protocol described above was used with minor modifications. 100,000 cells were seeded in 24-well plates containing coverslips. After 3 hours, cells were starved with DMEM containing 0.5% BSA for 30 min. Cells were then incubated with the same medium containing fluorescently labelled CY3-transferrin (20 μg/ml) for 10 min on ice and endocytosis was started by incubating the cells at 37 °C. The cells were acid washed to remove remaining bound transferrin at the cell surface, then fixed with PFA 4%. Cells were visualized using Leica SP8 confocal microscope and single Z-images were taken at the equatorial plane of the cells. CY3 intensity per cell was measured using ImageJ software after the subtraction of CY3 intensity of cells which were not incubated with CY3-transferrin.

Autophagy assays

Mouse immortalized myoblasts were cultured in 6-well plates in proliferation medium or starved in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Sigma) for 2 hours. In order to block the degradation of

autolysosome content, cells were treated with 15 nM bafilomycin A1 (BafA1). Adherent cells were mechanically scratched using RIPA buffer containing PMSF 1mM, DTT 1mM and protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostic) on ice. Lysates were passed through 25G syringe and centrifuged (13000 *g*, 4°C, 5 min). Supernatant protein concentration was determined with BCA Protein Assay Kit 5 (Bio-Rad) using BSA concentration range. 20 μg of proteins was denatured at 95°C for 5 min. Samples were migrated on SDS-PAGE gels (15%) and transferred into nitrocellulose membranes using Transblot®Turbo™ (BIO-RAD). Unspecific sites were blocked using Tris buffered saline (TBS) containing 0,1% Tween-20 (TBST 0,1%) and 3% BSA for 1 hour. LC3-I and LC3-II were detected with a rabbit polyclonal anti-LC3 (Novus) and GAPDH with mouse monoclonal anti-GAPDH (Sigma-Aldrich) antibodies in TBST 0,1% containing 0,5% BSA at 4°C overnight. Membranes were then incubated with peroxidase-conjugated secondary antibodies in TBST 0,1% and 0,5% BSA at room temperature for 45 min. Membranes were revealed using ECL kit (Thermofisher Scientific) and Imager AI 600. Protein quantification was determined using ImageJ software.

Data analysis and statistics

GraphPad Prism 5.0 was used to perform statistical analysis and generate the graphs. Values were expressed by means ± SEM. One-way ANOVA followed by post-hoc was used to compare more than 2 groups. Non-parametric tests were assessed when the conditions for ANOVA could not be verified (n too small, no normality). When samples were linked, repeated measures ANOVA followed by post-hoc analysis was performed.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank Marc Bitoun for providing the *Dnm2*$^{R465W/+}$ mouse, Leigh Waddell for providing patient cells, Christine Kretz, Claudine Ebel, Muriel Philipps for excellent technical assistance, the animal house, cell culture, flow cytometry platforms and imaging Centre of IGBMC for support, and the human cells immortalization platform from the Institut de Myologie. This work was supported by INSERM, CNRS, University of Strasbourg, the Agence Nationale de la Recherche (ANR14-CE12-0009), and the grant ANR-10-LABX-0030-INRT, a French State fund managed by the ANR under the frame program Investissements d'Avenir (10-IDEX-0002). A.R. is a recipient of a doctoral fellowship from Strasbourg University.

Author contributions

B.S.C., A.S.N. and J.L. designed and supervised research; A.R. and L.R. performed research; B.R-S-M. and K.M. provided materials and advices; A.R., A.S.N. and J.L. analyzed data; A.R. and J.L. wrote the paper.

CONFLICT OF INTEREST

B.S.C. and J.L are co-founders of Dynacure. B.S.C. is now Dynacure employee. J.L. is scientific advisor of Dynacure. These arrangements have been reviewed and approved by INSERM.

REFERENCES

1. Trochet, D., Prudhon, B., Vassilopoulos, S. and Bitoun, M. (2015) Therapy for dominant inherited diseases by allele-specific RNA interference: successes and pitfalls. *Curr Gene Ther*, **15**, 503-510.
2. Puttaraju, M., Jamison, S.F., Mansfield, S.G., Garcia-Blanco, M.A. and Mitchell, L.G. (1999) Spliceosome-mediated RNA trans-splicing as a tool for gene therapy. *Nat Biotechnol*, **17**, 246-252.
3. Trochet, D., Prudhon, B., Jollet, A., Lorain, S. and Bitoun, M. (2016) Reprogramming the Dynamin 2 mRNA by Spliceosome-mediated RNA Trans-splicing. *Mol Ther Nucleic Acids*, **5**, e362.
4. Mali, P., Esvelt, K.M. and Church, G.M. (2013) Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods*, **10**, 957-963.
5. Cox, D.B., Platt, R.J. and Zhang, F. (2015) Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat Med*, **21**, 121-131.
6. Monteys, A.M., Ebanks, S.A., Keiser, M.S. and Davidson, B.L. (2017) CRISPR/Cas9 Editing of the Mutant Huntingtin Allele In Vitro and In Vivo. *Mol Ther*, **25**, 12-23.
7. Yamamoto, Y., Makiyama, T., Harita, T., Sasaki, K., Wuriyanghai, Y., Hayano, M., Nishiuchi, S., Kohjitani, H., Hirose, S., Chen, J. *et al.* (2017) Allele-specific ablation rescues electrophysiological abnormalities in a human iPS cell model of long-QT syndrome with a CALM2 mutation. *Hum Mol Genet*, **26**, 1670-1677.
8. Jungbluth, H., Wallgren-Pettersson, C. and Laporte, J. (2008) Centronuclear (myotubular) myopathy. *Orphanet J Rare Dis*, **3**, 26.
9. Bitoun, M., Bevilacqua, J.A., Prudhon, B., Maugenre, S., Taratuto, A.L., Monges, S., Lubieniecki, F., Cances, C., Uro-Coste, E., Mayer, M. *et al.* (2007) Dynamin 2 mutations cause sporadic centronuclear myopathy with neonatal onset. *Ann Neurol*, **62**, 666-670.
10. Bitoun, M., Maugenre, S., Jeannet, P.Y., Lacene, E., Ferrer, X., Laforet, P., Martin, J.J., Laporte, J., Lochmuller, H., Beggs, A.H. *et al.* (2005) Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nat Genet*, **37**, 1207-1209.
11. Bohm, J., Biancalana, V., Dechene, E.T., Bitoun, M., Pierson, C.R., Schaefer, E., Karasoy, H., Dempsey, M.A., Klein, F., Dondaine, N. *et al.* (2012) Mutation spectrum in the large GTPase dynamin 2, and genotype-phenotype correlation in autosomal dominant centronuclear myopathy. *Hum Mutat*, **33**, 949-959.
12. Durieux, A.C., Vignaud, A., Prudhon, B., Viou, M.T., Beuvin, M., Vassilopoulos, S., Fraysse, B., Ferry, A., Laine, J., Romero, N.B. *et al.* (2010) A centronuclear myopathy-dynamin 2 mutation impairs skeletal muscle structure and function in mice. *Hum Mol Genet*, **19**, 4820-4836.
13. Kenniston, J.A. and Lemmon, M.A. (2010) Dynamin GTPase regulation is altered by PH domain mutations found in centronuclear myopathy patients. *EMBO J*, **29**, 3054-3067.
14. Wang, L., Barylko, B., Byers, C., Ross, J.A., Jameson, D.M. and Albanesi, J.P. (2010) Dynamin 2 mutants linked to centronuclear myopathies form abnormally stable polymers. *J Biol Chem*, **285**, 22753-22757.
15. Praefcke, G.J. and McMahon, H.T. (2004) The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 133-147.

16. Ochoa, G.C., Slepnev, V.I., Neff, L., Ringstad, N., Takei, K., Daniell, L., Kim, W., Cao, H., McNiven, M., Baron, R. *et al.* (2000) A functional link between dynamin and the actin cytoskeleton at podosomes. *J Cell Biol*, **150**, 377-389.
17. Gu, C., Yaddanapudi, S., Weins, A., Osborn, T., Reiser, J., Pollak, M., Hartwig, J. and Sever, S. (2010) Direct dynamin-actin interactions regulate the actin cytoskeleton. *Embo J*, **29**, 3593-3606.
18. Shpetner, H.S. and Vallee, R.B. (1989) Identification of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules. *Cell*, **59**, 421-432.
19. Schulze, R.J., Weller, S.G., Schroeder, B., Krueger, E.W., Chi, S., Casey, C.A. and McNiven, M.A. (2013) Lipid droplet breakdown requires dynamin 2 for vesiculation of autolysosomal tubules in hepatocytes. *J Cell Biol*, **203**, 315-326.
20. Bitoun, M., Durieux, A.C., Prudhon, B., Bevilacqua, J.A., Herledan, A., Sakanyan, V., Urtizberea, A., Cartier, L., Romero, N.B. and Guicheney, P. (2009) Dynamin 2 mutations associated with human diseases impair clathrin-mediated receptor endocytosis. *Hum Mutat*, **30**, 1419-1427.
21. Koutsopoulos, O.S., Koch, C., Tosch, V., Bohm, J., North, K.N. and Laporte, J. (2011) Mild functional differences of dynamin 2 mutations associated to centronuclear myopathy and charcot-marie-tooth peripheral neuropathy. *PLoS One*, **6**, e27498.
22. Liu, Y.W., Lukiyanchuk, V. and Schmid, S.L. (2011) Common membrane trafficking defects of disease-associated dynamin 2 mutations. *Traffic*, **12**, 1620-1633.
23. Durieux, A.C., Vassilopoulos, S., Laine, J., Fraysse, B., Brinas, L., Prudhon, B., Castells, J., Freyssenet, D., Bonne, G., Guicheney, P. *et al.* (2012) A centronuclear myopathy--dynamin 2 mutation impairs autophagy in mice. *Traffic*, **13**, 869-879.
24. Aure, K., Mamchaoui, K., Frachon, P., Butler-Browne, G.S., Lombes, A. and Mouly, V. (2007) Impact on oxidative phosphorylation of immortalization with the telomerase gene. *Neuromuscul Disord*, **17**, 368-375.
25. Fu, Y., Sander, J.D., Reyon, D., Cascio, V.M. and Joung, J.K. (2014) Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol*, **32**, 279-284.
26. Tasfaout, H., Buono, S., Guo, S., Kretz, C., Messaddeq, N., Booten, S., Greenlee, S., Monia, B.P., Cowling, B.S. and Laporte, J. (2017) Antisense oligonucleotide-mediated Dnm2 knockdown prevents and reverts myotubular myopathy in mice. *Nat Commun*, **8**, 15661.
27. Kasai, K., Shin, H.W., Shinotsuka, C., Murakami, K. and Nakayama, K. (1999) Dynamin II is involved in endocytosis but not in the formation of transport vesicles from the trans-Golgi network. *J Biochem*, **125**, 780-789.
28. Koutsopoulos, O.S., Koch, C., Tosch, V., Bohm, J., North, K.N. and Laporte, J. (2011) Mild functional differences of dynamin 2 mutations associated to centronuclear myopathy and Charcot-Marie Tooth peripheral neuropathy. *PLoS One*, **6**, e27498.
29. Robertson, M.J., Deane, F.M., Robinson, P.J. and McCluskey, A. (2014) Synthesis of Dynole 34-2, Dynole 2-24 and Dyngo 4a for investigating dynamin GTPase. *Nat Protoc*, **9**, 851-870.
30. Chen, M.S., Obar, R.A., Schroeder, C.C., Austin, T.W., Poodry, C.A., Wadsworth, S.C. and Vallee, R.B. (1991) Multiple forms of dynamin are encoded by shibire, a Drosophila gene involved in endocytosis. *Nature*, **351**, 583-586.

31. Altschuler, Y., Barbas, S.M., Terlecky, L.J., Tang, K., Hardy, S., Mostov, K.E. and Schmid, S.L. (1998) Redundant and distinct functions for dynamin-1 and dynamin-2 isoforms. *J Cell Biol*, **143**, 1871-1881.
32. Trochet, D., Prudhon, B., Beuvin, M., Peccate, C., Lorain, S., Julien, L., Benkhelifa-Ziyyat, S., Rabai, A., Mamchaoui, K., Ferry, A. *et al.* (2018) Allele-specific silencing therapy for Dynamin 2-related dominant centronuclear myopathy. *EMBO Mol Med*, **10**, 239-253.
33. Chen, Y. and Yu, L. (2018) Development of Research into Autophagic Lysosome Reformation. *Mol Cells*, **41**, 45-49.
34. Xie, C., Zhang, Y.P., Song, L., Luo, J., Qi, W., Hu, J., Lu, D., Yang, Z., Zhang, J., Xiao, J. *et al.* (2016) Genome editing with CRISPR/Cas9 in postnatal mice corrects PRKAG2 cardiac syndrome. *Cell Res*, **26**, 1099-1111.
35. Kleinstiver, B.P., Pattanayak, V., Prew, M.S., Tsai, S.Q., Nguyen, N.T., Zheng, Z. and Joung, J.K. (2016) High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*, **529**, 490-495.
36. Slaymaker, I.M., Gao, L., Zetsche, B., Scott, D.A., Yan, W.X. and Zhang, F. (2016) Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, **351**, 84-88.
37. Robb, S.A., Sewry, C.A., Dowling, J.J., Feng, L., Cullup, T., Lillis, S., Abbs, S., Lees, M.M., Laporte, J., Manzur, A.Y. *et al.* (2011) Impaired neuromuscular transmission and response to acetylcholinesterase inhibitors in centronuclear myopathies. *Neuromuscul Disord*, **21**, 379-386.
38. Cowling, B.S., Chevremont, T., Prokic, I., Kretz, C., Ferry, A., Coirault, C., Koutsopoulos, O., Laugel, V., Romero, N.B. and Laporte, J. (2014) Reducing dynamin 2 expression rescues X-linked centronuclear myopathy. *J Clin Invest*, **124**, 1350-1363.
39. Tasfaout, H., Lionello, V.M., Kretz, C., Koebel, P., Messaddeq, N., Bitz, D., Laporte, J. and Cowling, B.S. (2018) Single Intramuscular Injection of AAV-shRNA Reduces DNM2 and Prevents Myotubular Myopathy in Mice. *Mol Ther*, **26**, 1082-1092.

TABLE AND FIGURES LEGENDS

Table. Allele-specific inactivation or/and correction in different cell types in human and mouse

Cell line	sgRNA	% NHEJ	% Allele-specific inactivation	% HDR	% Allele-specific correction
HeLa	C21 pan-allelic	13.5	NA	**9.3**	NA
Patient fibroblasts (R465W)	C18 allele specific	60	**100**	0	NA
Dnm2$^{R465W/+}$ mouse myoblasts	C19 allele specific	**95**	**100**	0	NA
	C20 allele specific	**90,6**	**100**	**6,2**	**100**
	C22 pan-allelic	25	NA	0	NA

More than 55 cell clones were sequenced per sgRNA that are either pan-allelic or allele-specific. NA: not applicable as no *DNM2* mutation in HeLa cells or utilization of pan-allelic sgRNAs.

Figure legends

Figure 1. Establishment of *Dnm2*$^{R465W/+}$ knock-in myoblasts with myogenic potential. (A) Examples of Sanger sequencing for *Dnm2*$^{R465W/+}$ KI and wild-type immortalized myoblasts. (B) Immortalized *Dnm2*$^{R465W/+}$ KI and WT muscle cells after 7 days of differentiation were labeled with DAPI for nuclei (fire) and caveolin 3 antibody (green) for a specific labelling of myotubes. (C) Fusion index, i.e. number of nuclei per myotubes, after 7 days of differentiation in two *Dnm2*$^{R465W/+}$ KI clones and three WT clones in duplicate. 22-48 myotubes were assessed per duplicate. Data are represented as mean ± SEM. Non-parametric Kruskal-Wallis and post-hoc Dunn's multiple comparison tests suggested no statistical differences.

Figure 2. Strategy and results for allele-specific inactivation or/and correction in muscle cells. (A) Alignment of the human and mouse WT sequences. The CGG codon in human (top) or the AGG codon in mouse (bottom) code for the conserved arginine residue. In patient and *Dnm2*$^{R465W/+}$ KI mouse CGG and AGG codons are changed into TGG encoding a tryptophan. Sequences of the human (B), *Dnm2*$^{R465W/+}$ KI mouse (C) mutated alleles, the sgRNAs and the repair templates. Note the presence of the NGG protospacer adjacent motif (PAM) near the mutation. We designed allele-specific high score sgRNAs and pan-allelic sgRNA. (D) Examples of chromatopherograms for a non-edited clone, a NHEJ clone and corrected HDR clones from *Dnm2*$^{R465W/+}$ KI mouse myoblasts. Positions of the mutated or corrected nucleotide is indicated by an arrow, and silent variations introduced by HDR with the repair template by stars. (E) SnaBI digestion of DNA from non-edited and corrected *Dnm2*$^{R465W/+}$ KI mouse myoblasts. (F) DNM2 protein levels assessed by western blot from WT (WT1, WT2) and *Dnm2*$^{R465W/+}$ KI (KI1, KI2) mouse myoblasts, and from *Dnm2*$^{R465W/+}$ KI myoblasts edited through out-of-frame NHEJ, in-frame NHEJ, or corrected through HDR. (G) Quantification from 3 independent experiments of DNM2 protein levels from WT (WT1, WT2) and *Dnm2*$^{R465W/+}$ KI (KI1,

KI2) mouse myoblasts, and from *Dnm2*$^{R465W/+}$ KI myoblasts edited through out-of-frame NHEJ, in-frame NHEJ, or corrected through HDR. Data are represented as mean ± SEM. No statistical difference was noted between WT and KI myoblasts by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison. Repeated measures ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison between KI1 clone and KI1-derived edited clones showed that out-of-frame NHEJ led to decreased DNM2 level while in-frame NHEJ clone had a normal DNM2 level (*p<0.05, **p<0.01).

Figure 3. Endocytosis alteration in *Dnm2*$^{R465W/+}$ KI myoblasts is rescued by allele-specific inactivation or correction. (A) Transferrin uptake assays in 3 WT and 2 *Dnm2*$^{R465W/+}$ KI mouse myoblast lines after 10 or 20 min incubation with CY3-labelled transferrin, normalized to the mean of CY3 intensity of the WT cells. CY3 fluorescent intensity geometric mean was measured by FACS from 3 independent experiments. Data are represented as mean ± SEM. One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. (B) Transferrin uptake in 3 WT and 2 *Dnm2*$^{R465W/+}$ KI mouse myoblast lines after 10 min incubation upon treatment with the dynamin inhibitor dynole 34-2 used at 2 different concentrations in DMSO. CY3 fluorescent intensity geometric mean was measured by FACS from 3 independent experiments and normalized to the mean of WT DMSO treated cells (represented by the dotted line). Data are represented as mean ± SEM. One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison; **p<0.01, ***p<0.001 vs. DMSO treated cells. (C) Primary human myoblasts from healthy or CNM patient with the R465W mutation were incubated with CY3-transferrin for 10 min and imaged by confocal microscopy. (D) Quantification of 3 independent experiments in duplicates as in (C). Three WT myoblast lines and 2 patient myoblast lines with either a R465W or a R369Q heterozygous mutation were compared. Controls 1 and 2 and the R465W patient cells are primary myoblasts, while control 3 and the R369Q patient cells are immortalized myoblasts. 125 to 217 cells per lines were quantified. Data are represented as mean ± SEM. Non-parametric Kruskal-Wallis and post-hoc Dunn's multiple comparison tests; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. R465W. (E) Quantification of 3 independent experiments as in (A). Transferrin uptake assays in 1 WT, 1 *Dnm2*$^{R465W/+}$ KI mouse myoblast lines and 7 NHEJ-derived clones and 2 HDR-derived clones after 10 min incubation with CY3-labelled transferrin, normalized to the CY3 intensity of the KI1 cells. Indels are indicated in brackets. One in frame NHEJ and 6 out-of-frame NHEJ clones were used. The KI1-NHEJ7 clone has an out-of-frame indel specifically on the WT allele. Data are represented as mean ± SEM. One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison; *p<0.05, **p<0.01 vs. KI1 and no statistically significant difference compared to WT3.

Figure 4. Autophagy defects in *Dnm2*$^{R465W/+}$ KI myoblasts is rescued by allele-specific inactivation or correction. (A) WT and KI immortalized myoblasts were treated or not with bafilomycin A1 (BafA1 in DMSO) under basal conditions and lipidated LC3-II was detected by western blot. GAPDH was used as a loading control. (B) Quantification of LC3-II levels in WT and KI myoblasts under basal conditions without any treatment. Four independent experiments. Data are represented as mean ± SEM. One-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison showed no statistically significant difference between WT and KI myoblats. (C) Quantification of BafA1-induced accumulation

of LC3-II in 2 WT and 2 KI myoblast lines under basal or starved conditions, expressed as ratio of BafA1-treated cells versus untreated cells. Four independent experiments. Data are represented as mean ± SEM. One-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison; **p<0.01 vs. WT1; $p<0.05, $$p<0.01 vs. WT2. (D) Levels of LC3-II in allele-specific NHEJ inactivated myoblasts treated or not with BafA1 under basal conditions. Clone C20-6 has an in-frame deletion in *Dnm2*, while the other clones carry out-of-frame indels. GAPDH was used as a loading control. (E) Quantification of BafA1-induced accumulation of LC3-II in 4 allele-specific NHEJ inactivated myoblast lines under basal conditions, expressed as ratio of BafA1-treated cells versus untreated cells. Clone KI1-NHEJ4 has an in-frame deletion in *Dnm2*, while the other clones carry out-of-frame indels. Three independent experiments. Ratio in the WT and KI myoblasts from (C) are shown as comparison. Data are represented as mean ± SEM. One-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison tests; *p<0.05 vs. KI1. No statistically significant difference compared to WT1. (F) Levels of LC3-II in 2 allele-specific HDR corrected myoblast lines and the non-edited KI myoblasts, treated or not with BafA1 under basal conditions. GAPDH was used as a loading control. (G) Quantification of BafA1-induced accumulation of LC3-II in 2 allele-specific HDR corrected myoblast lines and the non-edited KI myoblasts under basal conditions, expressed as ratio of BafA1-treated cells versus untreated cells. Three independent experiments. Data are represented as mean ± SEM. One-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison tests; *p<0.05 vs. KI1.

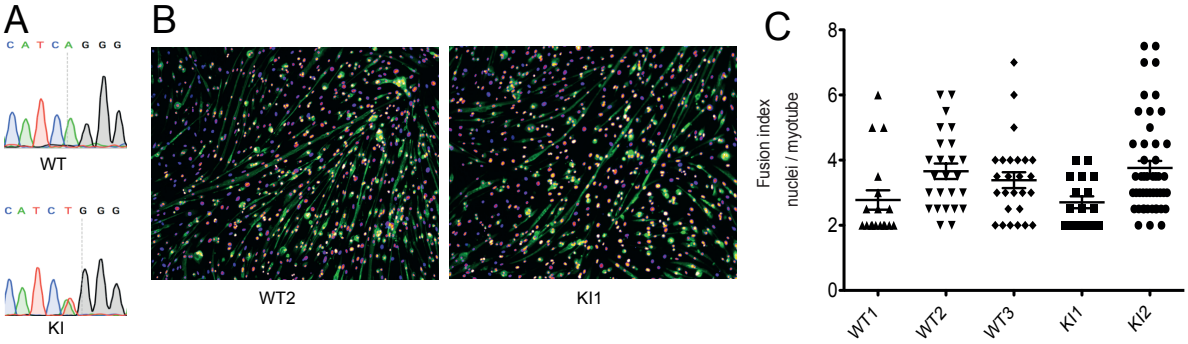

A
C A T C A G G G
WT
C A T C T G G G
KI
B
WT2
KI1
C
Fusion index
nuclei / myotube
8
6
4
2
0
WT1
WT2
WT3
KI1
KI2

Figure 1

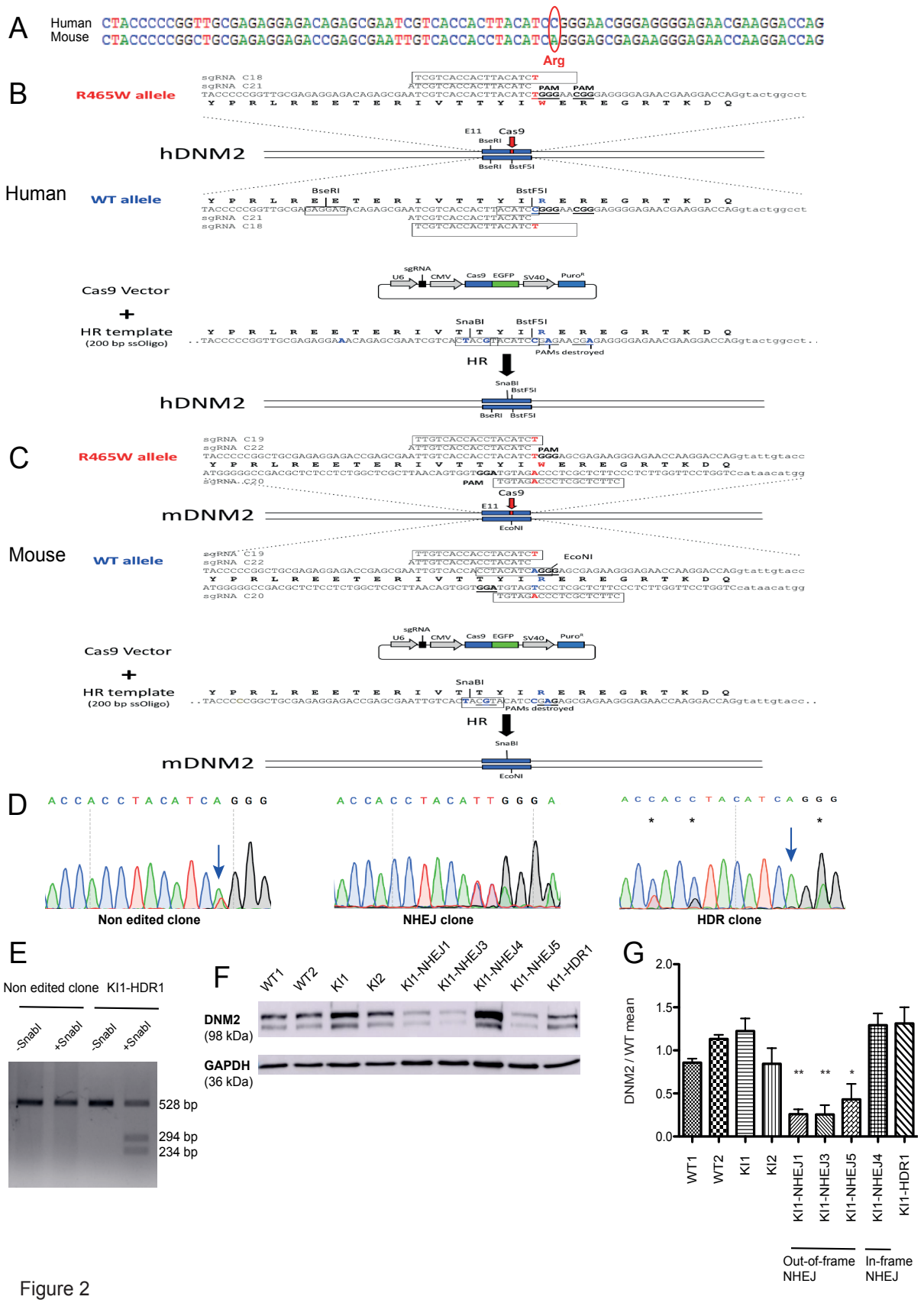

A
Human
Mouse
Arg
B
R465W allele
hDNM2
Human
WT allele
Cas9 Vector
HR template
(200 bp ssOligo)
HR
hDNM2
C
R465W allele
mDNM2
Mouse
WT allele
Cas9 Vector
HR template
(200 bp ssOligo)
HR
mDNM2
D
Non edited clone
NHEJ clone
HDR clone
E
Non edited clone
KI1-HDR1
-SnaBI
+SnaBI
528 bp
294 bp
234 bp
F
WT1
WT2
KI1
KI2
KI1-NHEJ1
KI1-NHEJ3
KI1-NHEJ4
KI1-NHEJ5
KI1-HDR1
DNM2
(98 kDa)
GAPDH
(36 kDa)
G
DNM2 / WT mean
Out-of-frame NHEJ
In-frame NHEJ

Figure 2

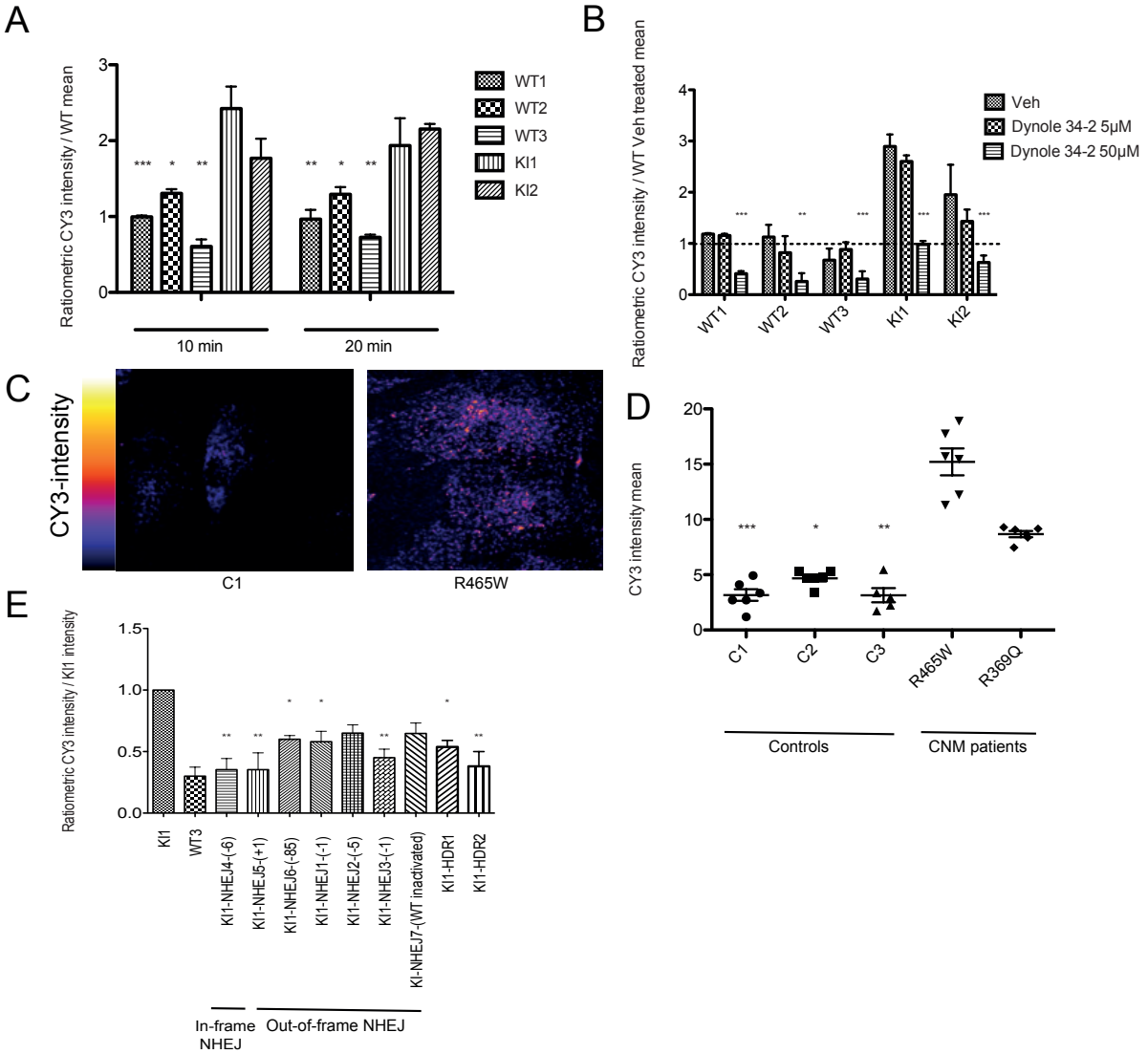

A
Ratiometric CY3 intensity / WT mean
WT1
WT2
WT3
KI1
KI2
10 min
20 min
B
Ratiometric CY3 intensity / WT Veh treated mean
Veh
Dynole 34-2 5µM
Dynole 34-2 50µM
WT1
WT2
WT3
KI1
KI2
C
CY3-intensity
C1
R465W
D
CY3 intensity mean
C1
C2
C3
R465W
R369Q
Controls
CNM patients
E
Ratiometric CY3 intensity / KI1 intensity
KI1
WT3
KI1-NHEJ4-(-6)
KI1-NHEJ5-(+1)
KI1-NHEJ6-(-85)
KI1-NHEJ1-(-1)
KI1-NHEJ2-(-5)
KI1-NHEJ3-(-1)
KI-NHEJ7-(WT inactivated)
KI1-HDR1
KI1-HDR2
In-frame NHEJ
Out-of-frame NHEJ

Figure 3

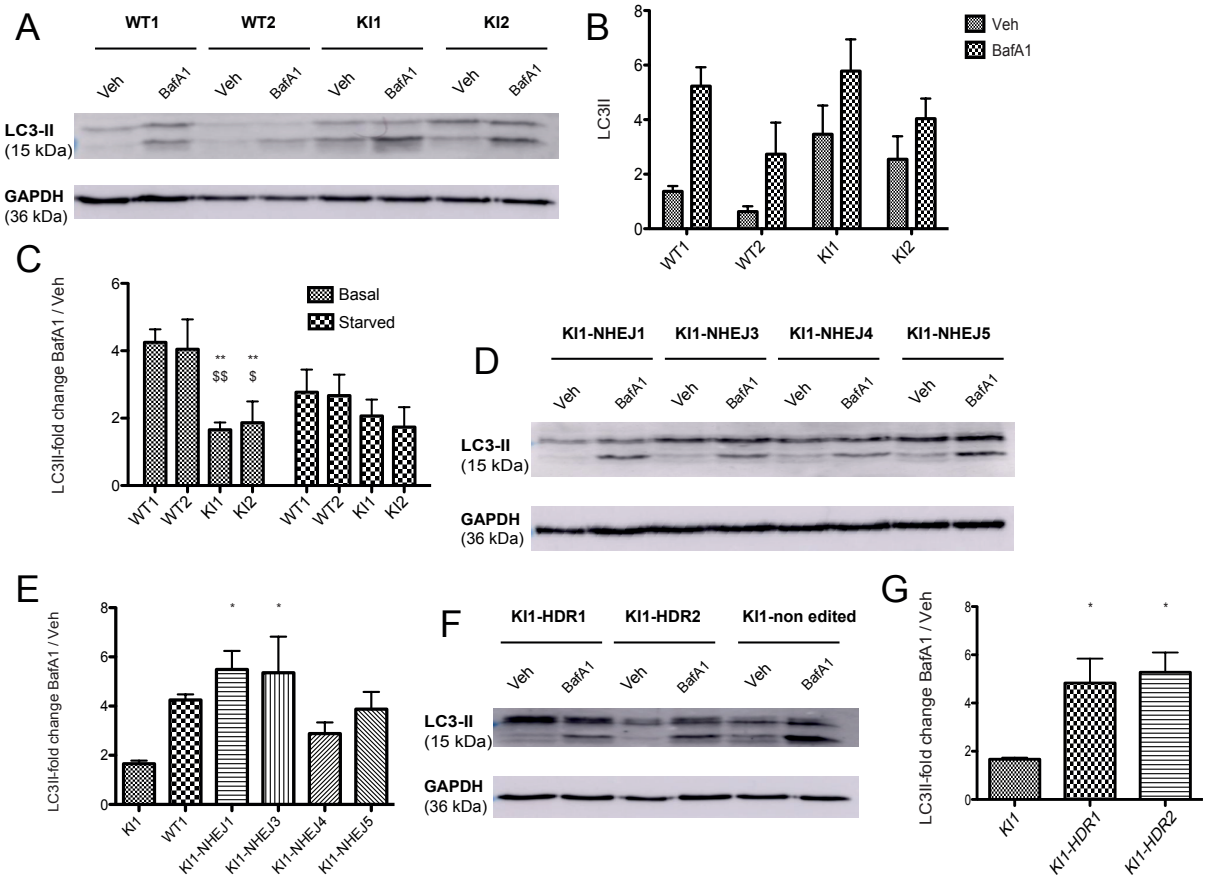
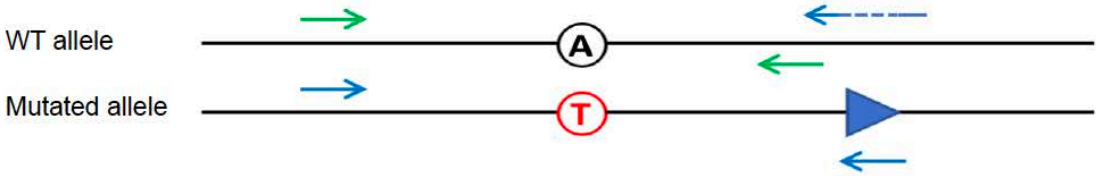

A
WT1
WT2
KI1
KI2
Veh
BafA1
LC3-II
(15 kDa)
GAPDH
(36 kDa)
B
LC3II
Veh
BafA1
C
LC3II-fold change BafA1 / Veh
Basal
Starved
D
KI1-NHEJ1
KI1-NHEJ3
KI1-NHEJ4
KI1-NHEJ5
E
LC3II-fold change BafA1 / Veh
KI1
WT1
KI1-NHEJ1
KI1-NHEJ3
KI1-NHEJ4
KI1-NHEJ5
F
KI1-HDR1
KI1-HDR2
KI1-non edited
G
LC3II-fold change BafA1 / Veh
KI1
KI1-HDR1
KI1-HDR2

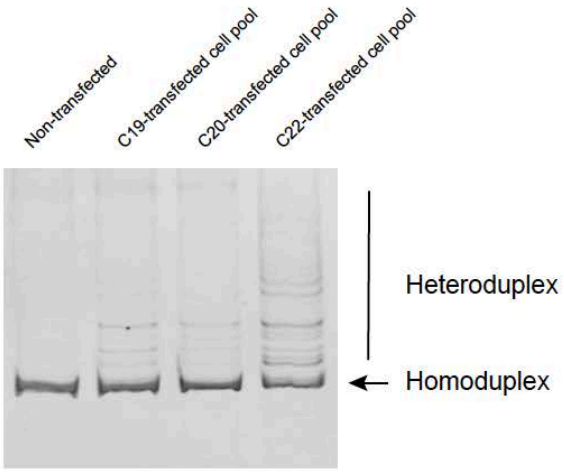
Figure 4

WT allele	CTGAGTTCCTACCCCCGGCTGCGAGAGGAGACCGAGCGAATTGTCACCACCTACATCAGGGAGCGAGAAGGGAGAACCAAGGACCAG
Mutated allele	CTGAGTTCCTACCCCCGGCTGCGAGAGGAGACCGAGCGAATTGTCACCACCTACATCTGGGAGCGAGAAGGGAGAACCAAGGACCAG
KI1-NHEJ1	CTGAGTTCCTACCCCCGGCTGCGAGAGGAGACCGAGCGAATTGTCACCACCTAC--TCTGGGAGCGAGAAGGGAGAACCAAGGACCAG
KI1-NHEJ2	CTGAGTTCCTACCCCCGGCTGCGAGAGGAGACCGAGCGAATTGTCACCAC----------TCTGGGAGCGAGAAGGGAGAACCAAGGACCAG
KI1-NHEJ3	CTGAGTTCCTACCCCCGGCTGCGAGAGGAGACCGAGCGAATTGTCACCACCTAC--TCTGGGAGCGAGAAGGGAGAACCAAGGACCAG
KI1-NHEJ4	CTGAGTTCCTACCCCCGGCTGCGAGAGGAGACCGAGCGAATTGTCACCA------------TCTGGGAGCGAGAAGGGAGAACCAAGGACCAG
KI1-NHEJ5	CTGAGTTCCTACCCCCGGCTGCGAGAGGAGACCGAGCGAATTGTCACCACCTACATTCTGGGAGCGAGAAGGGAGAACCAAGGACCAG
KI1-NHEJ6	CTG----------
KI1-NHEJ7	CTGAGTTCCTACCCCCGGCTGCGAGAGGAGACCGAGCGAATTGTCACCACCTA----TCAGGGAGCGAGAAGGGAGAACCAAGGACCAG

Supplementary Figure S1. Sequences of the NHEJ clones. Alignment of the sequences of the WT (green) and the mutated (red) mouse Dnm2 exon 11 and the NHEJ clones. Note that for KI1-NHEJ6 clone, 85 nucleotides were deleted.



Supplementary Figure S2. Schema of *Dnm2*$^{R465W/+}$ KI mouse exon 11 and the primers used for PCR amplification. "A" represents the WT nucleotide and "T" the mutated one. The mutated allele includes a Lox-P site in the 3'-*Dnm2* exon 11 intronic region. Primers in green amplify both alleles. Primers in blue amplify specifically either the mutated or the WT allele depending on the position of the reverse primer relative to the Lox-P site (Dashed-arrow shows the WT specific reverse primer disrupted by the Lox-P site).



Supplementary Figure S3. Modifications of the WT allele assessed on the cell pools. *Dnm2*$^{R465W/+}$ KI myoblasts were transfected with the indicated sgRNAs and GFP sorted C19 and C20 are alle-specific sgRNAs, C22 is pan-allelic sgRNA}. The WT allele was specifically amplified by PCR and after denaturation-annealing cycles, heteroduplex were formed and migrated slower than homoduplex in native PAGE 10% gel. The intensity of the bands was quantified by ImageJ software.

4.2 Participation à la publication

Publication 2: « **Allele-specific silencing therapy for Dynamin 2-related centronuclear myopathy** »

4.2.1 Contexte de l'étude

La myopathie centronucléaire à transmission AD est causée par des mutations ponctuelles hétérozygotes gain de fonction au niveau du gène qui code pour la DNM2. A ce jour, il n'existe aucun traitement curatif de la maladie. La souris KI *Dnm2*$^{R465W/+}$ représente un modèle qui permet l'étude physiopathologique de cette maladie. Ce modèle présente une faiblesse musculaire avec des atteintes histopathologiques du muscle. Dans notre laboratoire, Cowling *et al.* ont prouvé que la souris exprimant 50% de DNM2 est viable et ne présente aucun phénotype. Afin de développer une thérapie, cette étude s'est focalisée sur une stratégie d'ARN interférence spécifique de l'allèle muté. Cette stratégie a déjà prouvé son efficacité pour traiter les maladies à transmission dominantes.

4.2.2 Résultats

La validation *in cellulo* des différents siARN a permis le criblage et la sélection de deux siARN efficaces et spécifiques qui ont été ensuite utilisés *in vivo*. L'injection intramusculaire d'AAV exprimant les shARN a permis d'améliorer la force musculaire et les phénotypes histopatholigiques. L'injection à un âge précoce (3 semaines) était plus efficace que celle à un âge tardif (6 semaines) ce qui pourrait être expliqué par une transduction moins efficace des muscles plus matures.

4.2.3 Contributions :

Pour ce projet, j'ai fourni les lignées de myoblastes WT et KI que j'avais immortalisés. Cela a permis de tester et valider les siARN dans des cellules musculaires. La majorité des résultats

de l'article a été réalisé par Dr. Delphine Trochet et les autres membres de l'équipe du Dr. Marc Bitoun.

Published online: December 15, 2017

Research Article

TRANSPARENT PROCESS OPEN ACCESS

EMBO Molecular Medicine

Allele-specific silencing therapy for Dynamin 2-related dominant centronuclear myopathy

Delphine Trochet[1], Bernard Prudhon[1], Maud Beuvin[1], Cécile Peccate[1], Stéphanie Lorain[1], Laura Julien[1], Sofia Benkhelifa-Ziyyat[1], Aymen Rabai[2], Kamel Mamchaoui[1], Arnaud Ferry[1], Jocelyn Laporte[2], Pascale Guicheney[3], Stéphane Vassilopoulos[1] & Marc Bitoun[1,*]

Abstract

Rapid advances in allele-specific silencing by RNA interference established a strategy of choice to cure dominant inherited diseases by targeting mutant alleles. We used this strategy for autosomal-dominant centronuclear myopathy (CNM), a rare neuromuscular disorder without available treatment due to heterozygous mutations in the *DNM2* gene encoding Dynamin 2. Allele-specific siRNA sequences were developed in order to specifically knock down the human and murine *DNM2*-mRNA harbouring the p.R465W mutation without affecting the wild-type allele. Functional restoration was achieved in muscle from a knock-in mouse model and in patient-derived fibroblasts, both expressing the most frequently encountered mutation in patients. Restoring either muscle force in a CNM mouse model or DNM2 function in patient-derived cells is an essential breakthrough towards future gene-based therapy for dominant centronuclear myopathy.

Keywords allele-specific silencing therapy; centronuclear myopathy; Dynamin 2; RNA interference

Subject Categories Genetics, Gene Therapy & Genetic Disease; Musculoskeletal System

DOI 10.15252/emmm.201707988 | Received 5 May 2017 | Revised 14 November 2017 | Accepted 20 November 2017

Introduction

Autosomal-dominant centronuclear myopathy (AD-CNM) is a rare congenital myopathy without available curative treatment and with pathomechanisms still largely unknown. Autosomal-dominant centronuclear myopathy exhibits a wide clinical spectrum from severe-neonatal to mild-adult forms. The most frequent phenotype corresponds to late-childhood or adult onset forms in which motor milestones are delayed and diffuse skeletal muscle weakness mainly involves facial and limb muscles (Fischer *et al*, 2006; Hanisch *et al*, 2011). Muscle weakness is slowly progressive but loss of independent ambulation may occur during the fifth decade. In the vast majority of patients, respiratory and cardiac functions are normal. In the severe and early-onset CNM (Bitoun *et al*, 2007), paediatric patients usually have generalized weakness, hypotonia, facial weakness with open mouth, ptosis and ophthalmoplegia. Progression may be fatal (Jungbluth *et al*, 2010) but is most often slowly progressive (Melberg *et al*, 2010; Susman *et al*, 2010). Few children can improve their strength during early childhood (Susman *et al*, 2010), but some of them can still develop a restrictive respiratory syndrome at later ages (Bitoun *et al*, 2007; Melberg *et al*, 2010). The histological features in muscle biopsies consist of nuclear centralization associated with atrophy and predominance of type 1 fibres and radial arrangement of sarcoplasmic strands radiating from the central nuclei.

Autosomal-dominant centronuclear myopathy results from mutations in the *DNM2* gene which encodes Dynamin 2 (DNM2) (Bitoun *et al*, 2005) also involved in rare cases of Charcot–Marie–Tooth disease (Zuchner *et al*, 2005) and hereditary spastic paraplegia (Sambuughin *et al*, 2015). DNM2 belongs to the superfamily of large GTPases (Heymann & Hinshaw, 2009) and acts as a mechanochemical scaffolding molecule that can deform biological membranes leading to the release of vesicles from distinct membrane compartments. At the plasma membrane, DNM2 is involved in clathrin-dependent and clathrin-independent endocytosis. DNM2 is also involved in the formation of vesicles from endosomes and trans-Golgi network. Furthermore, several studies have highlighted the role of DNM2 as a regulator of actin and microtubule cytoskeleton networks (Durieux *et al*, 2010a).

The DNM2 protein is ubiquitously expressed, and to date, there is no explanation for the tissue-specific impact of the *DNM2* mutations. Several DNM2-dependent processes have been shown to be impaired by CNM mutations and supposed to contribute to muscle pathophysiological mechanisms (i.e. endocytosis, microtubules network and recently actin-mediated trafficking) (Durieux *et al*, 2010a; Gonzalez-Jamett *et al*, 2017). In mouse muscle fibre, DNM2 presents a striated transversal staining pattern on the I-band of the sarcomere centred on the Z-line. DNM2 localized to the perinuclear MTOC, Golgi apparatus, microtubules, sarcoplasmic reticulum, is

1 Research Center for Myology, UPMC Univ Paris 06 and INSERM UMRS 974, Institute of Myology, Sorbonne Universités, Paris, France
2 Department of Translational Medicine and Neurogenetics, IGBMC, INSERM U964, CNRS UMR7104, Collège de France, University of Strasbourg, Illkirch, France
3 Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), INSERM UMR_S1166, UPMC Univ Paris 06, Sorbonne Universités, Paris, France
*Corresponding author. Tel: +33 1 42 16 57 18; E-mail: m.bitoun@institut-myologie.org

© 2017 The Authors. Published under the terms of the CC BY 4.0 license

enriched at the neuromuscular junction and colocalized with clathrin heavy chain (Durieux *et al*, 2010b). *DNM2* mutations in AD-CNM patients are mostly missense (Bohm *et al*, 2012), and when tested, the mutant protein is expressed normally (Bitoun *et al*, 2005, 2009). Mutations are thought to be responsible for a gain of function and/or a dominant negative effect through an increased GTPase activity and formation of abnormal stable Dnm2 oligomers (Kenniston & Lemmon, 2010; Wang *et al*, 2010). We have previously developed a knock-in (KI) mouse model expressing the most frequent *DNM2*-CNM mutation (found in 30% of patients), that is the KI-*Dnm2*^{R465W} model (Durieux *et al*, 2010b). Heterozygous KI-*Dnm2* mice progressively develop features of the human CNM including impairment of force generation, muscle atrophy and altered spatial organization of the muscle fibre's oxidative compartments.

Whereas the full *Dnm2* knock-out is lethal at embryonic stages in mice, heterozygous knock-out mice expressing 50% of *Dnm2* are viable with unaffected muscle function (Ferguson *et al*, 2009; Tinelli *et al*, 2013; Cowling *et al*, 2014). A potential therapeutic approach is therefore the suppression of the mutant allele expression without reducing the wild-type allele. With this objective, allele-specific RNA interference (AS-RNAi) emerged as a powerful strategy for dominant inherited diseases (Trochet *et al*, 2015). Therapeutic benefit has been demonstrated in cells from patients (Klootwijk *et al*, 2008; Sierant *et al*, 2011; Kaplan *et al*, 2012; Muller *et al*, 2012), animal models (Xia *et al*, 2006; Jiang *et al*, 2013) and in a first clinical trial for an inherited skin disorder (Leachman *et al*, 2010). Here, we report the proof of principle of AS-RNAi therapy for AD-CNM. By applying this strategy, functional rescue was achieved in the KI-*Dnm2*^{R465W} mouse model and in patient-derived fibroblasts, both expressing the most frequently encountered mutation in patients.

Results

Identification of allele-specific siRNAs in heterozygous cells

In the KI-*Dnm2*^{R465W} mouse model, the missense mutation corresponds to a single-point mutation in exon 11 (c.1393 A>T, p.R465W). A screening for allele-specific siRNAs capable of silencing the mutant *Dnm2* allele without affecting the WT allele was performed in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) cultured from heterozygous (HTZ) KI-*Dnm2* embryos. We developed RT–PCR assay to discriminate the WT and mutant alleles after restriction enzyme digestion performed at the end of the exponential phase of PCR amplification (Appendix Fig S1). Using this assay, we assessed allele-specific properties of 12 siRNAs among the 19 possible siRNAs (Fig 1A). At low concentration (20 nM) of scramble siRNA, HTZ MEFs showed a mutant/WT ratio equal to 1 in agreement with similar expression of both WT and mutant alleles (Fig 1B). Among the 12 assessed siRNAs, six siRNAs (si9, si10, si11, si12, si15 and si16) exhibited allele-specific silencing properties as demonstrated by significant reduction in mutant/WT ratios compared to scramble siRNA-transfected cells (Fig 1B).

Further analyses were pursued for two of the most efficient siRNA sequences, that is si9 and si10 at higher concentrations (100 nM). After 48 h, semi-quantitative RT–PCR showed around 50% reduction in total *Dnm2*-mRNA expression (WT + mutant) for each siRNA (Fig 2A). Amplicon sequencing showed the HTZ *Dnm2*

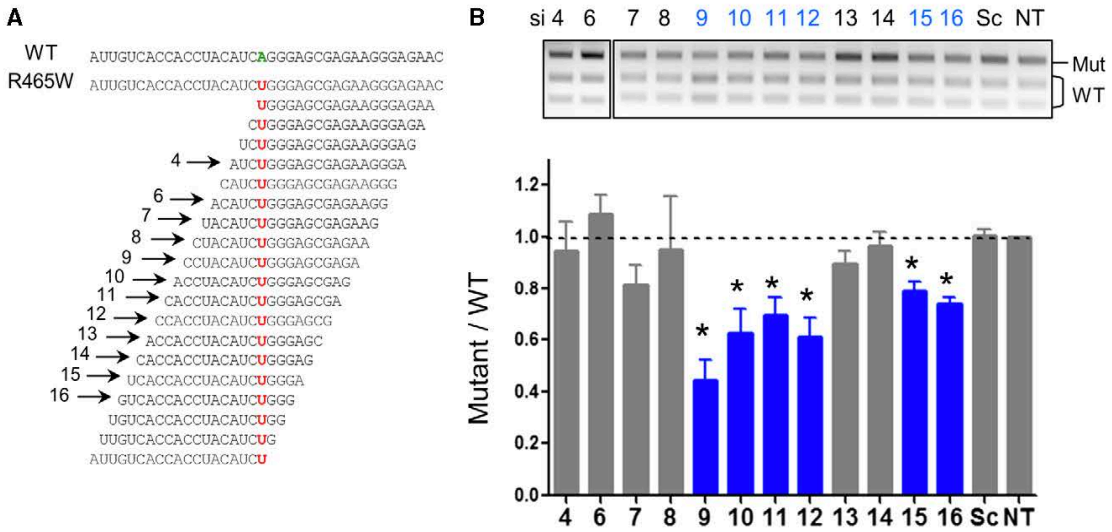


Figure 1. Identification of six allele-specific siRNAs in MEFs.

A Wild-type (WT) and mutant (R465W) mRNA sequences in the region of the mutation. The sequences of the 19 possible siRNAs targeting the mutation (in red) are indicated. Arrows show the sense strand of the 12 assessed siRNAs numbered relative to the position of the mismatch between siRNA and WT sequences.

B EcoNI digestion profile of the *Dnm2* RT–PCR products. Histogram represents mean ± SEM of calculated mutant/WT ratio for siRNAs transfected at 20 nM for 48 h. *$P < 0.05$, two-tailed using a Mann–Whitney *U*-test compared to scramble ($n = 4$).

 © 2017 The Authors

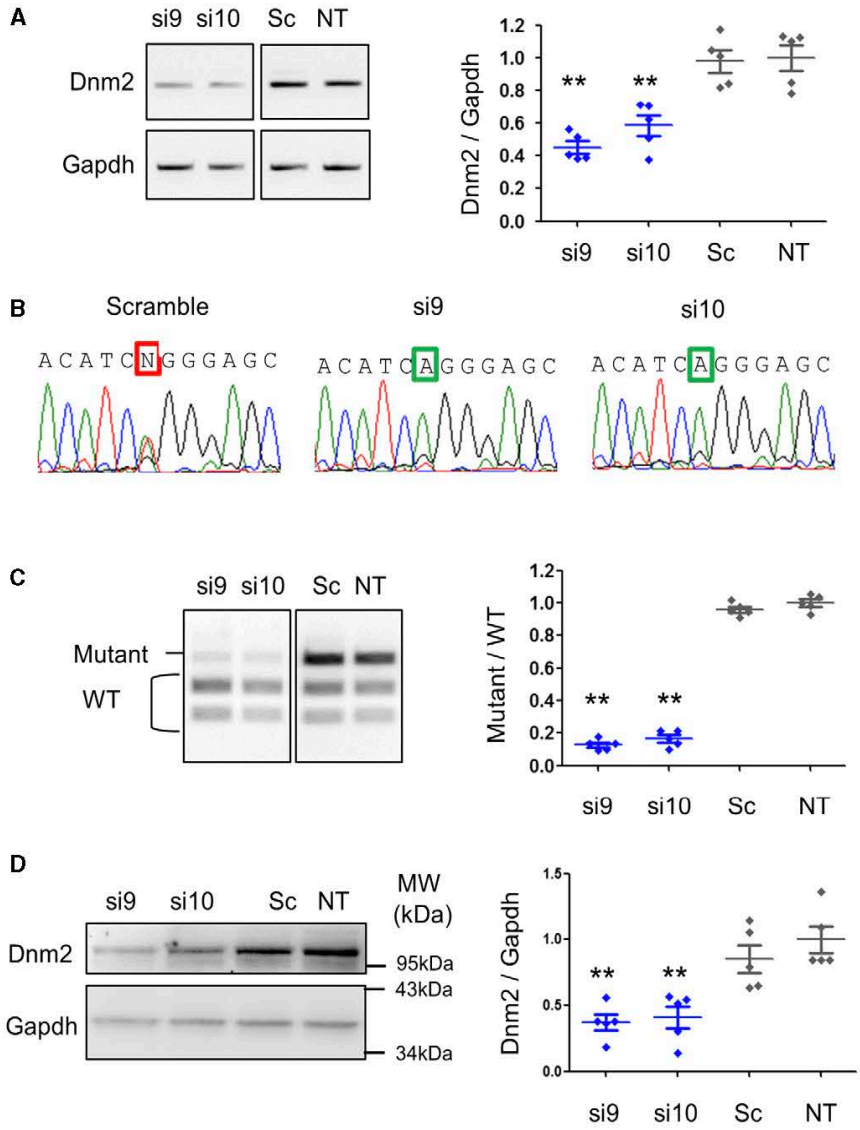


Figure 2. Si9 and si10 are potent allele-specific siRNAs in MEFs.

A Semi-quantitative *Dnm2* and *Gapdh* RT–PCR products and quantification of *Dnm2* expression normalized to *Gapdh*.

B Sequence of *Dnm2* amplicons from cells transfected with si9, si10 and scramble siRNAs. Squares indicate the mutant nucleotide (N = T and A).

C EcoNI digestion profile *Dnm2* PCR and quantification of the mutant/WT ratio.

D Dnm2 Western blot and quantification of signal by densitometry. Gapdh was used as loading control.

Data information: In scatter plots (A, C and D), the bars are mean values and error bars indicate SEM. $^{**}P < 0.01$, one-tailed using a Mann–Whitney *U*-test compared to scramble ($n = 5$). In (A–D), the siRNAs were transfected at 100 nM for 48 h. Sc: scramble siRNA. NT: non-transfected.

sequence in scramble-transfected cells but only the WT sequence in si9- and si10-transfected cells (Fig 2B). Allele specificity of the two siRNAs against the mutant allele was demonstrated by the mutant/WT ratio reduction (Fig 2C) and confirmed by quantification of mutant and WT mRNA expression relative to the housekeeping Gapdh (Appendix Fig S2A). Both si9 and si10 also reduced Dnm2 protein content around 50% as established by Western blot (Fig 2D) without modifying Dnm2 subcellular localization (Appendix Fig S2B). Under these conditions, expression of Dnm1 and Dnm3 transcripts which exhibit 4 and 5 mismatches with the two siRNAs, respectively, was not modified by si9 and si10 (Appendix Fig S2C–F). Altogether, these data validate si9 and si10 as efficient allele-specific siRNA sequences as both specifically knock down the mutant *Dnm2* transcript and reduce *Dnm2* transcript and protein

© 2017 The Authors

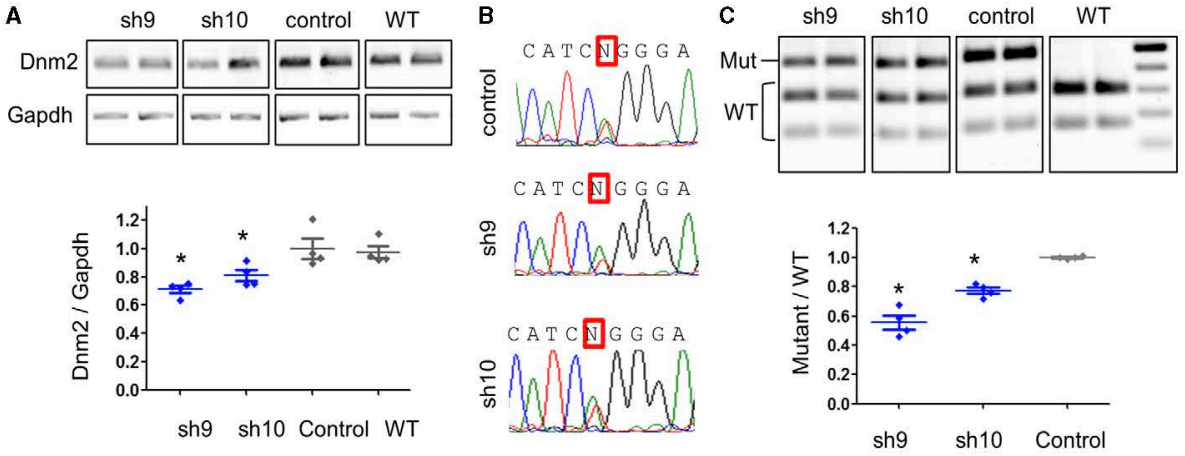


Figure 3. Sh9 is efficient to specifically reduce the mutant allele in 3-month-treated muscle from young mice.

A *Dnm2* and *Gapdh* RT–PCR products from AAV-shRNA-transduced muscles and quantification of *Dnm2* expression normalized to *Gapdh*. WT muscles were included as control.

B Sequence of *Dnm2* amplicons from transduced TA muscles. Squares indicate the mutant nucleotide (N = T and A).

C EcoNI digestion profile of the *Dnm2* amplicons and quantification of the mutant/WT ratio.

Data information: In scatter plots (A, C), the bars are mean values and error bars indicate SEM. $^*P < 0.05$, one-tailed using a Mann–Whitney *U*-test compared to AAV-control ($n = 4$).

levels by half in HTZ MEFs. The ability of 100 nM of si9 and si10 to specifically silence the mutant allele was confirmed by RT–PCR in immortalized mouse myoblasts derived from heterozygous (HTZ) KI-*Dnm2* (Appendix Fig S3).

Early treatment of muscle phenotype in KI-*Dnm2* mice

At 3 weeks of age, HTZ mice exhibit a robust decrease in contractile properties in Tibialis anterior (TA) muscle whereas muscle mass and histology are still normal compared to WT animals. After 2 months of age, contractile properties, muscle mass and histology are affected (Durieux *et al*, 2010b). Adeno-associated virus (AAV) serotype 1 vectors containing small hairpin (sh) RNA corresponding to si9 and si10 (AAV-sh9 and AAV-sh10, respectively) and a control AAV without shRNA sequence (AAV-control) were designed for *in vivo* evaluation. We first assessed efficacy of early treatment relative to the disease's time-course. AAVs were injected intramuscularly at 10^{11} viral genomes (vg)/TA muscle of HTZ KI-*Dnm2* mice at 1 month of age, and muscle phenotype was investigated 1 and 3 months later (groups 1M-1M and 1M-3M, respectively).

At the end point of the 3-month treatment period, expression of *Dnm2* transcript was quantified by RT–PCR showing a significant decrease in the *Dnm2* content in sh9- and sh10-expressing muscle compared to AAV-control values (−30 and −20%, respectively) (Fig 3A). Sequencing *Dnm2* amplicons showed a HTZ sequence at the mutant nucleotide position in AAV-transduced muscles with a reduction in the peak corresponding to the mutant nucleotide with sh9 and to a lesser extent with sh10 (Fig 3B). Allele-specific silencing was demonstrated by reduced mutant/WT ratio using RT–PCR and EcoNI digestion profile (Fig 3C). Specific silencing of the mutant transcript was also shown by the quantification of the digested products corresponding to mutant and WT mRNAs relative to Gapdh expression (Appendix Fig S4A) and for sh9 by a second RT–PCR assay using primers designed for specific amplification of either WT or mutant alleles (Appendix Fig S4B and C). These data confirmed that sh9, and to a lesser extent sh10, maintained allele-specific silencing properties *in vivo*.

We evaluated capacity of 3-month sh9 and sh10 treatments to alleviate muscle atrophy, morphological abnormalities and contractile properties. When compared to WT muscle, HTZ TA muscles showed a significant 28% decrease in mass (Fig 4A). In AAV-sh9-injected mice, muscle mass was restored close to WT values while AAV-sh10 treatment led to partial intermediate improvement of muscle atrophy (Fig 4A). Quantification of fibre diameter frequency (Fig 4B) showed total rescue of fibre size only in muscles transduced with AAV-sh9. Under these conditions, the disease-specific histopathological abnormalities, that is central accumulation of oxidative cell compartments on DPNH oxidative staining, were almost absent in sh9-expressing muscles but were still present with sh10 (Fig 4C and D). Decrease in absolute maximal force (−40%) and in specific maximal force (−15%), present in HTZ muscles compared to WT, was almost circumvented by sh9 expression (Fig 4E and F). As noticed for the muscle mass, functional benefit was incomplete for sh10.

Results were more moderate for HTZ KI-*Dnm2* mice injected with AAV-sh9 and 10 for a shorter period (1-month treatment) (Appendix Fig S5). Changes in the total *Dnm2* transcript levels were undetectable, and the mutant transcript was only slightly reduced in treated mice (Appendix Fig S5A and B). Functionally, partial but significant improvements of the absolute and specific maximal forces are observed at this stage only with the sh9 treatment (Appendix Fig S5C and D). However, none of the treatment is sufficient after 1 month to alleviate muscle atrophy and morphological abnormalities (Appendix Fig S5E–G). Altogether, these data

 © 2017 The Authors

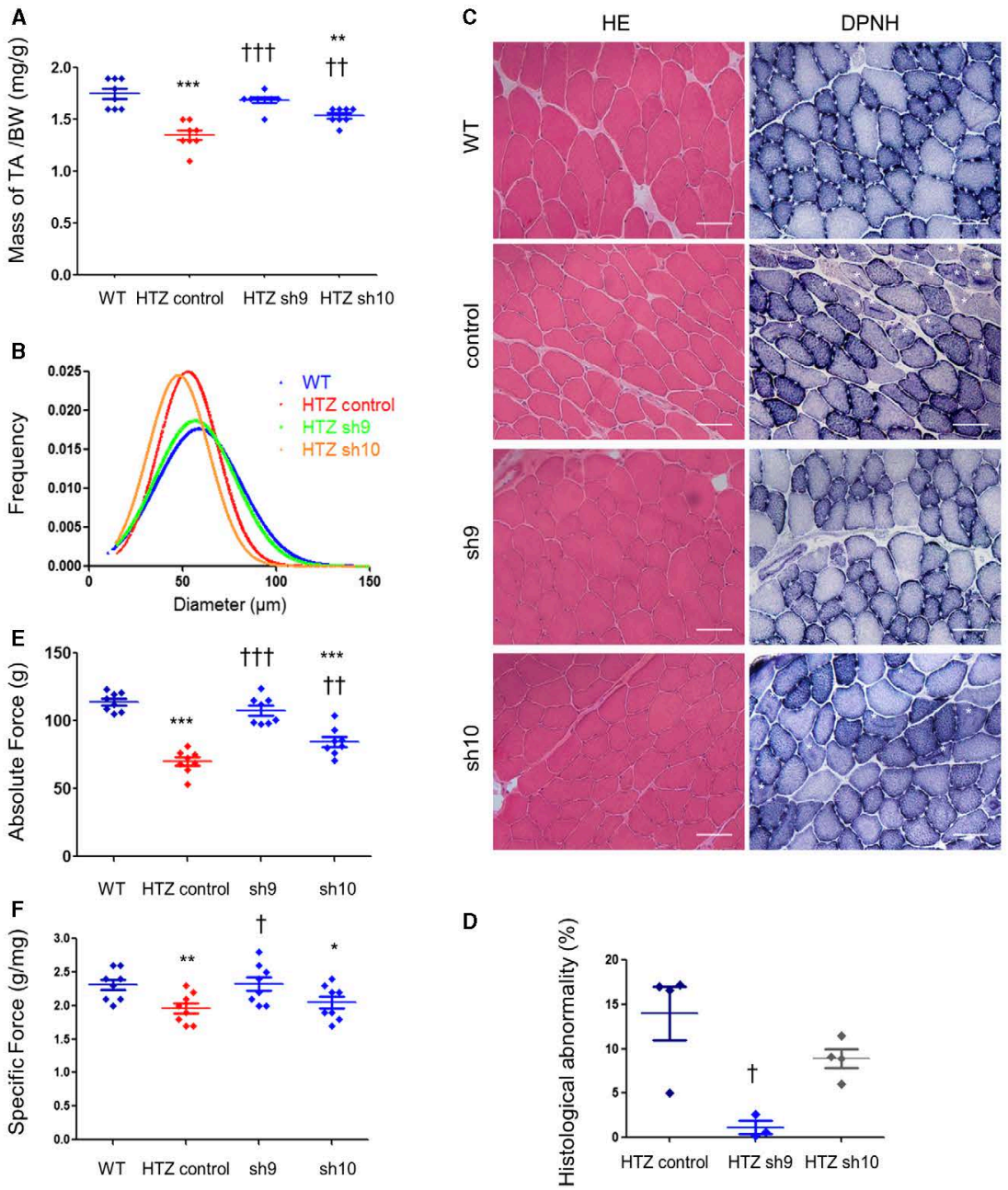


Figure 4. Sh9 3-month treatment abolishes muscle defects in young mice.

A Muscle mass in AAV-shRNA-injected mice (n = 8). The TA weights were normalized by the total body weight (mg/g). BW: body weight.

B Frequency of fibre size in TA muscles (n = 3 for WT and 4 for the AAV-injected HTZ muscles).

C Histochemical staining of TA sections from WT and AAV-injected HTZ mice. HE: haematoxylin–eosin staining. DPNH: reduced diphosphopyridine nucleotide diaphorase staining. Asterisks indicate fibres with abnormal central accumulations. Scale bars = 50 µm.

D Quantification of histological abnormality. Scatter plot represents individual percentages of histological abnormality from heterozygous control or treated mice ($n \geq 3$).

E, F Absolute maximal force (E) and specific maximal force (F) developed by TA muscles (n = 8).

Data information: In scatters blot (A, D–F), bars represent mean ± SEM. Statistical analysis was performed using a one-tailed Mann–Whitney U-test. *$P < 0.05$, **$P < 0.01$ and ***$P < 0.001$ compared to WT. †$P < 0.05$, ††$P < 0.01$ and †††$P < 0.001$ compared to AAV-control.

© 2017 The Authors

demonstrate the efficiency of 3-month treatment with the sh9 sequence to abolish the phenotype in young CNM mice.

Late KI-*Dnm2* mice muscle phenotype treatment

We next evaluated therapeutic properties of sh9 in older mice after a similar 3-month treatment started at 6 months of age when muscle phenotype consists of impaired force, muscle atrophy and morphological abnormalities (Group 6M-3M) (Durieux *et al*, 2010b). We did not show significant variation in the total *Dnm2* transcript levels in older AAV-sh9-treated mice (Fig 5A), and the mutant transcript was only slightly reduced (Fig 5B). In agreement, morphological abnormalities were still present (Fig 5C and D) and muscle mass was unchanged (Fig 5E) in these mice. A significant improvement of contractile properties occurred in older mice too but still far from the WT values (Fig 5F and G). Overall, our data showed that a late treatment was less efficient to restore a healthy phenotype compared to a similar treatment in young animals.

Interferon response and AAV transduction efficiency in early and late treatments

In order to identify mechanisms underlying different impact of sh9 in young and older mice, we first looked for potential induction of interferon response in mice treated for 3 months. Expression of two interferon-induced genes (*Oas1* and *Stat1*) was determined by RT–PCR. Similar expression of both genes was observed in non-injected WT muscles and in all HTZ mice irrespectively of whether the AAVs were injected in young and old mice (Fig 6A). This result along with absence of fibrosis and signs of muscle necrosis–regeneration in routine haematoxylin and eosin staining (Figs 4C and 5C) indicated that the weaker functional benefit in older mice was not due to a higher muscle toxicity. Next, we evaluated transduction efficiency through quantification of the amount of viral genomes per nanogram of DNA. At 1 month of age, a similar transduction efficacy was reached 3 months later in muscles injected with AAV-control, AAV-sh10 and AAV-sh9, ranging from 800 to 4,000 vg/ng (Fig 6B) and comparable results were obtained in the 1M-1M group (Appendix Fig S6). In contrast, values dropped to 90 vg/ng for AAV-control and 200 for AAV-sh9 when AAV was injected at 6 months of age. In order to confirm these results and to see the AAV distribution in muscle tissue sections at these different ages, we have injected the same dose of an AAV serotype 1 encoding the murine secreted embryonic alkaline phosphatase (muSEAP) reporter gene in the tibialis anterior of heterozygous mice at 1 and 6 months old. One month after the injection, the number of viral particles detected in tibialis anterior was around 10-fold higher in muscle injected at 1 month old than in muscle injected at 6 months old (12,600 vg/ng vs. 1,370 vg/ng, $n \geq 6$; Fig 6C). Consistently, the phosphatase activity is detected in all muscle fibres at 1 month while muSEAP was not detected in large area of muscle section in tibialis injected at 6 months old (Fig 6D). In the same time, the effect of a 10-fold increase in the virus titre on the transduction in old mice was evaluated. The transduction efficiency was greatly improved in 6-month-old mice by increasing the viral dose, since the number of vg/ng (8,300 vg/ng) was comparable to the young mice and the large majority of fibres expressed the phosphatase (Fig 6C and D).

Overall, our data demonstrate that moderate efficacy of treatment, when started at 6 months of age, was linked to a weaker capability to transduce muscle with AAV vectors at this age.

Allele-specific silencing in patient-derived cells

The target sequence for si9 and si10 shares 84% identity (16 out of 19 base pairs) between mouse and human sequences (Appendix Fig S7A). Corresponding human-specific si9 and si10 were synthetized and evaluated in one patient-derived fibroblast cell line expressing the c.1393 C>T, p.R465W mutation. *DNM2* mRNA content was reduced around 50% in cells transfected with si9 at 50 nM after 48 h, whereas si10 appears ineffective (Fig 7A). Amplicon sequencing confirmed disappearance of the mutant mRNA in si9-transfected fibroblasts, while si10-transfected cells still expressed a mix of WT and mutant *DNM2* (Fig 7B). We developed a semi-quantitative RT–PCR assay in order to discriminate WT and mutant alleles after restriction enzyme digestion of the amplicon (Appendix Fig S7B and C). Using this assay, mutant/WT ratio was equal to 1 for non-transfected and scramble-transfected cells and significantly reduced to 0.8 by si10 and 0.2 by si9 (Fig 7C). After transfection of si9 and si10 for 48 h, the reduction in the DNM2 protein contents was demonstrated by Western blot (Fig 7D). Given that si9 exhibited all the expected properties of allele-specific siRNA in human cells, si9 was further investigated at higher dose (100 nM). At this dose, expression of *DNM2* transcript was still reduced around 50% (Appendix Fig S8A) and allele specificity against the mutant *DNM2* mRNA was maintained (Appendix Fig S8B) without observation of cell toxicity (Appendix Fig 7C). Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) used to identify potential off-targets for si9 (sense and anti-sense strands) showed SLC9A8 among the nearest mRNA sequences with 68% identity corresponding to complete identity on 13 consecutive nucleotides (Appendix Fig S9A). We checked for potential si9-induced silencing of SLC9A8 mRNA by RT–PCR 48 h after transfection of siRNA at 100 nM. Compared to scramble siRNA, si9 did not affect expression of the SLC9A8 transcript (Fig 7E).

We further pursued evaluation of si9 properties by investigating functional rescue in patient-derived cells. Since clathrin-mediated endocytosis is impaired in CNM patient fibroblasts (Bitoun *et al*, 2009), we used a fluorescent transferrin uptake assay to evaluate the capability of si9 to restore normal endocytosis. Compared to two healthy control cell lines, 15-min transferrin uptake was reduced in scramble-transfected cells from the CNM patient but achieved normal value in cells transfected with si9 for 48 h before assay (Fig 7F). Transfection of si9 in control cell lines did not impact clathrin-mediated endocytosis.

Discussion

During the past decade, AS-RNAi has emerged as a powerful therapeutic strategy for dominant inherited diseases (Trochet *et al*, 2015). This strategy benefits from outstanding specificity of siRNAs capable to discriminate two sequences, even when differing by only a single nucleotide. This property qualified allele-specific RNAi to target single nucleotide substitutions representing the majority of the 26 *DNM2* mutations identified in AD-CNM, especially for the

 © 2017 The Authors

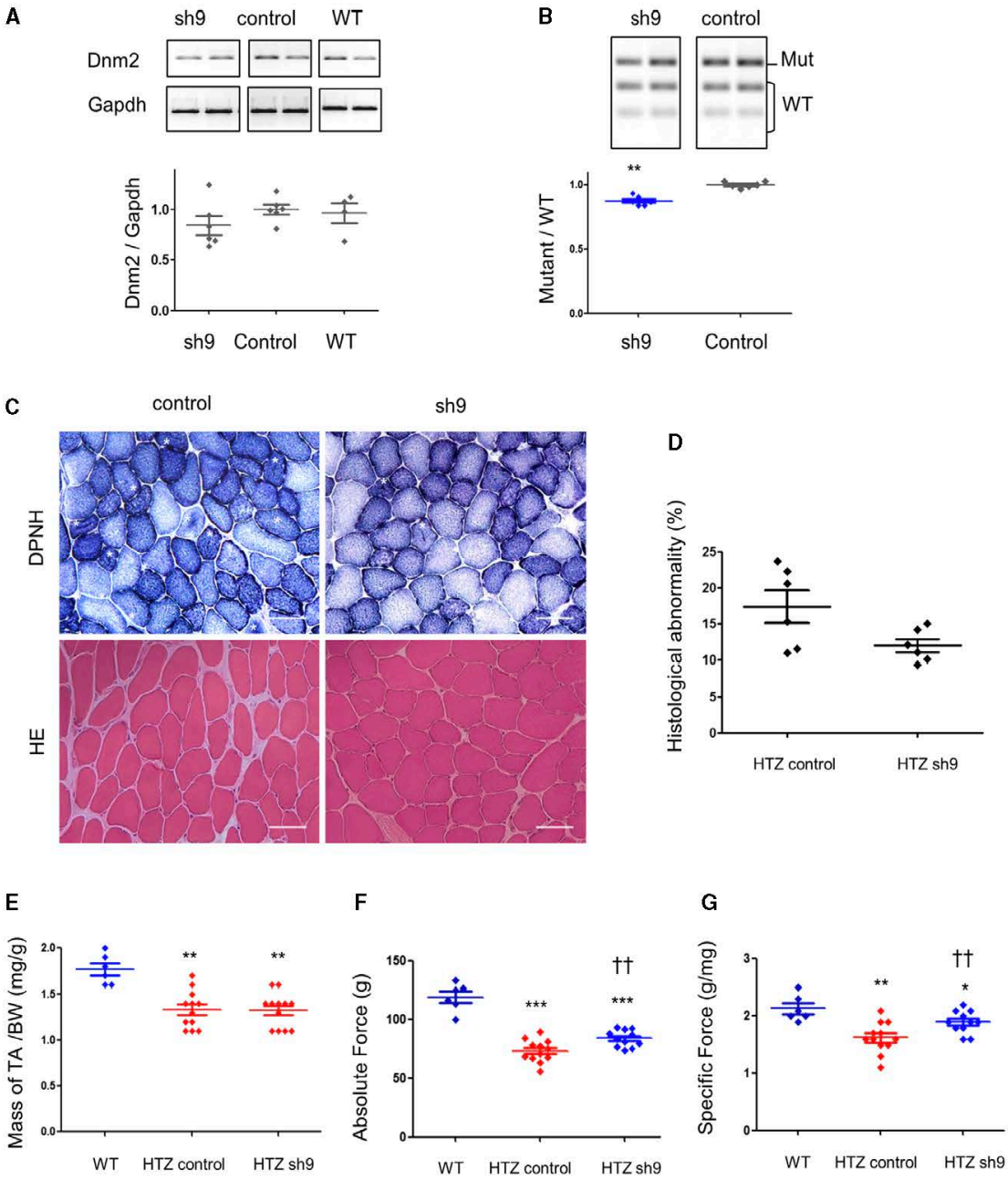


Figure 5. Sh9 is less efficient in old mice.

A *Dnm2* and *Gapdh* RT–PCR products from TA muscles and quantification of *Dnm2* expression normalized to *Gapdh*. WT muscles were included as control.

B EcoNI digestion profile of the *Dnm2* amplicons and quantification of the mutant/WT ratio ($n = 6$).

C Histochemical staining of TA sections from HTZ mice injected with AAV-sh9 or AAV-control. DPNH: reduced diphosphopyridine nucleotide diaphorase staining. Asterisks indicate fibres with abnormal central accumulations. Scale bars = 50 μm.

D Quantification of histological abnormality. Scatter plot represents individual percentages of histological abnormality from heterozygous control or treated mice ($n = 6$).

E Muscle mass normalized by the total body weight (mg/g) in AAV-injected mice ($n = 6$ for WT and $n = 12$ for HTZ).

F, G Absolute maximal force (F) and specific maximal force (G) developed by TA muscles ($n = 6$ for WT and $n \geq 11$ for HTZ).

Data information: In (A, B, D–G), the bars in scatter plots represent the mean ± SEM. Statistical analysis was performed using a one-tailed Mann–Whitney *U*-test. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ and $^{***}P < 0.001$ compared to WT. $^{\dagger\dagger}P < 0.001$ compared to HTZ-control.

© 2017 The Authors

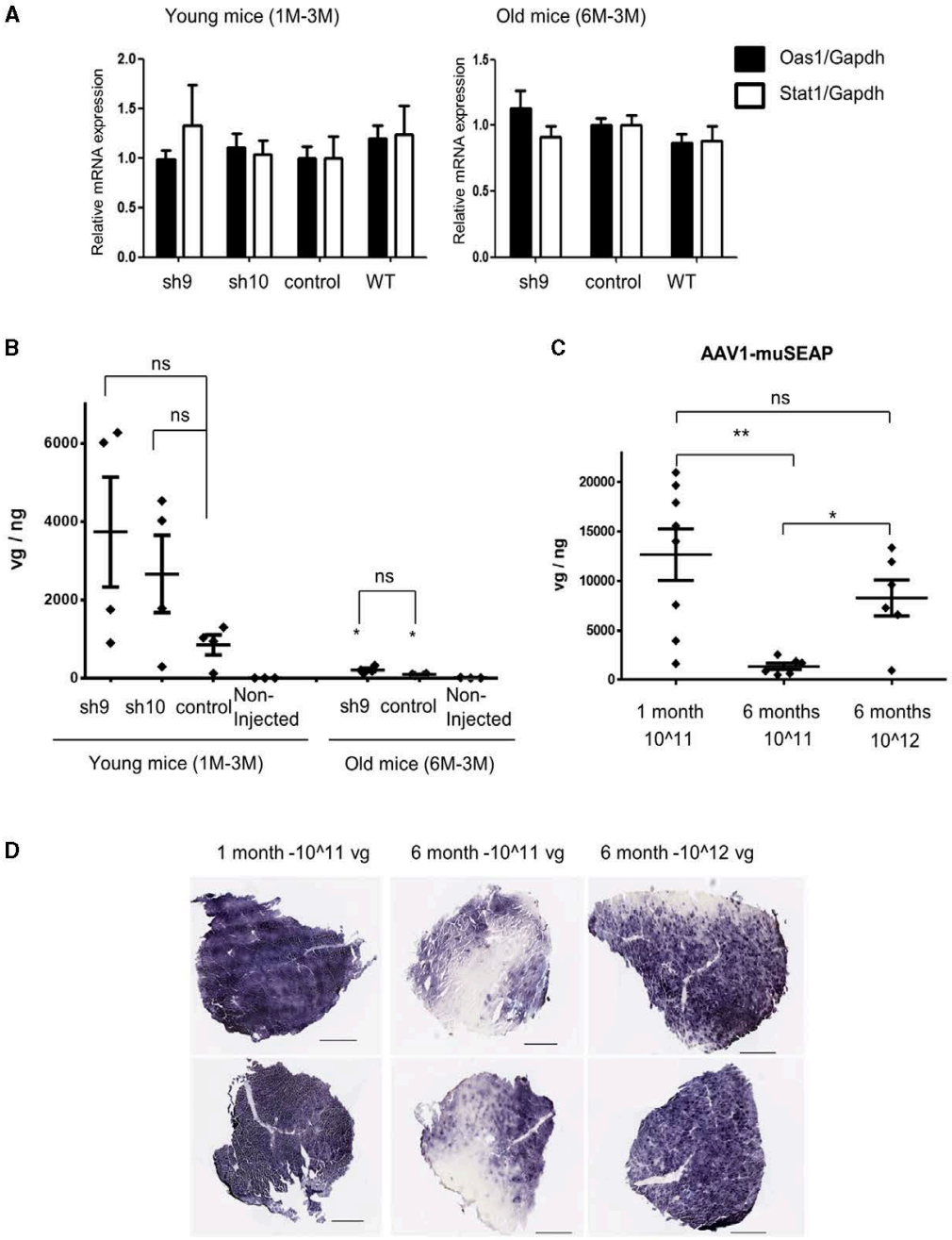


Figure 6. Expression of interferon-induced genes and AAV transduction efficiency in young and old mice.

A Quantification of expression of the interferon-induced genes *Oas1* and *Stat1* mRNA relative to *Gapdh* mRNA by RT–PCR in muscle from mice treated for 3 months at 1 (young) and 6 (old) months of age. Left panel: young mice. Right panel: old mice. Histograms represent mean ± SEM. Statistical analysis was performed using a two-tailed Mann–Whitney *U*-test compared to non-injected WT values (young mice $n = 4$, old mice HTZ $n = 6$, WT $n = 3$).

B Quantification of the viral genomes (vg) in mice injected with AAV-sh or control ($n = 4$). Non-injected WT muscles were included as negative control. $^*P < 0.05$, two-tailed vs similar treatment at 1 month of age using a Mann–Whitney *U*-test. ns: non-significant.

C Quantification of the viral genomes (vg) in mice injected with AAV-muSEAP ($n \geq 6$). $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, two-tailed Mann–Whitney *U*-test. ns: non-significant.

D Histochemical detection of muSEAP performed in mice tibialis anterior (TA) section one month after the injection. Representative staining is shown. Scale bars = 500 μm.

Data information: Scatter plot bars represent mean ± SEM.

 © 2017 The Authors

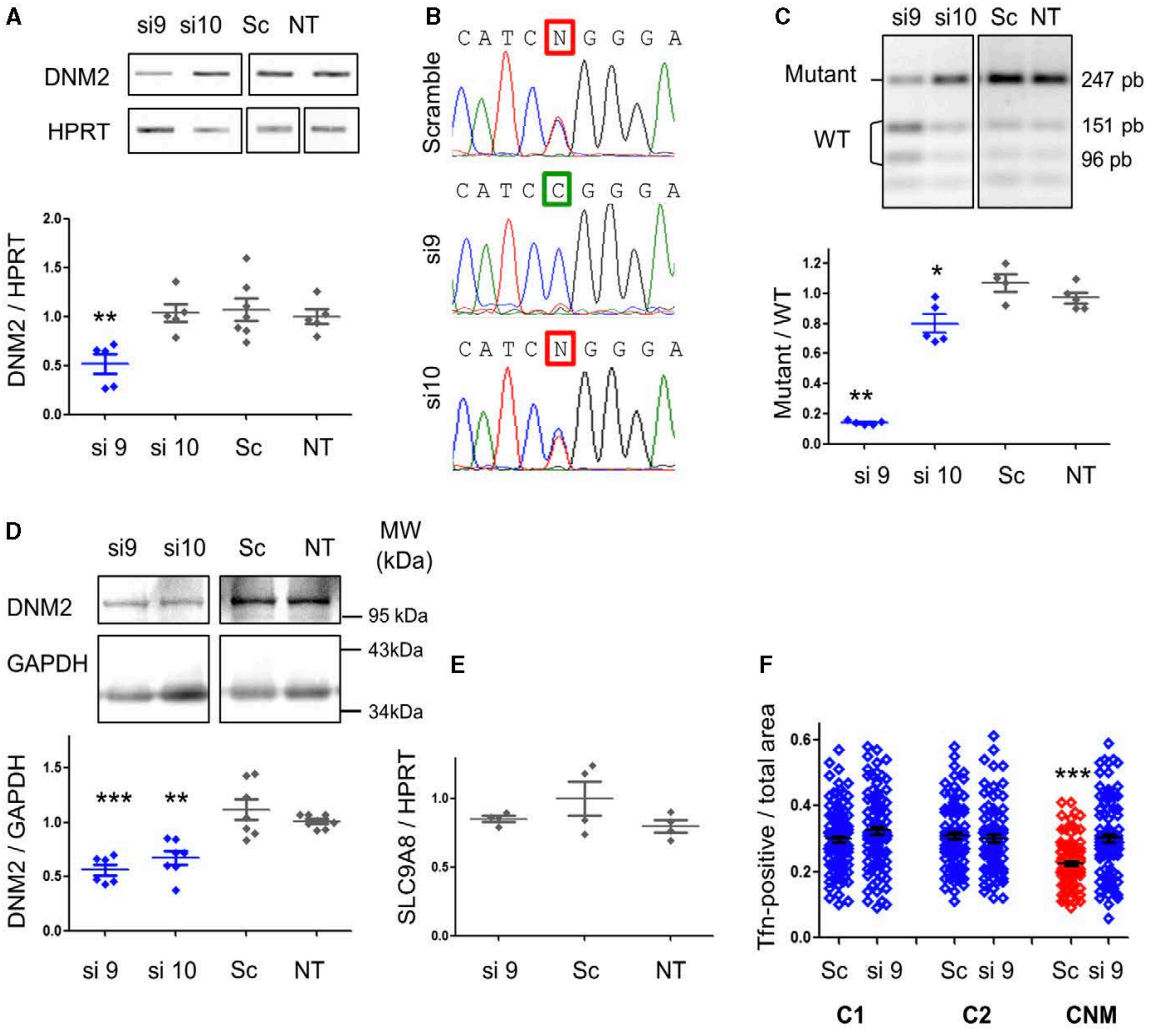


Figure 7. Si9 exhibits allele-specific silencing and functional rescue in patient-derived fibroblasts.

A *DNM2* and *HPRT* RT–PCR products and quantification of *DNM2* expression normalized to *HPRT* ($n \geq 5$).

B Sequence of *DNM2* amplicons from siRNA-transfected cells. Squares indicate the mutant nucleotide (N = T and C).

C PfoI digestion profile of the *DNM2* amplicons and quantification of the mutant/WT ratio ($n = 5$).

D DNM2 Western blot and quantification of signal by densitometry. GAPDH was used as loading control ($n = 7$).

E Effect of si9 on SLC9A8 expression. Bars on scatter plot represent mean ± SEM of SLC9A8 expression normalized to HPRT. Statistical analysis was performed using a two-tailed Mann–Whitney *U*-test compared to scramble ($n = 4$).

F 15-min transferrin uptake in patient-derived fibroblasts ($n = 100$ cells for each cell line). Statistical analysis was performed using a Mann–Whitney *U*-test (***$P < 0.001$ versus the two control cell lines (C1 and C2) transfected with the same siRNA).

Data information: Scatter plot bars represent mean ± SEM. In (A, C and D), *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$ using a one-tailed Mann–Whitney *U*-test compared to scramble. In (A–F), siRNAs were transfected at 50 nM for 48 h.

most frequent of them, that is the p.R465W mutation (30% of patients). We show here the proof of concept for AS-RNAi therapy for *DNM2*-related CNM in murine model and CNM patient-derived cells.

One remarkable facet of this approach, stemming from animal models, is the low therapeutic threshold which meant that total silencing of mutant mRNA is not absolutely required to reach therapeutic benefit *in vivo* (Xia *et al*, 2006; Loy *et al*, 2012; Jiang *et al*, 2013). In a knock-in mouse model of hypertrophic cardiomyopathy resulting from a dominant single nucleotide substitution in the *Myh6* gene, the disease was prevented by silencing only 30% of the mutant transcript (Jiang *et al*, 2013). Similarly, 3 months after the injection, sh9 normalizes muscle structure and function with a reduction of around 40–50% of the mutant *Dnm2* transcripts *in vivo*. Moreover, after 1 month, force improvement already takes place while the reduction in the *Dnm2* mutant is barely detectable.

© 2017 The Authors

Noteworthy, AAV1 exhibits a rapid onset but moderate level of transgene expression (Zincarelli *et al*, 2008). Thus, the incomplete restoration of muscle function observed after 1 month may result from submaximal level of transgene expression reached at this time or can reflect that the molecular and cellular processes necessary to achieve functional rescue require a longer time. However, these findings support a low therapeutic threshold and are of particular interest for future development of a similar strategy to target all CNM-associated *DNM2* mutations. Indeed, the siRNA-targeted sequences, fixed by the location of the mutation, may be located in regions not ideal for RNAi leading to difficulties to design optimal siRNA. A low therapeutic threshold will be a valuable asset in this context.

Previous *in vivo* studies in animal models also demonstrated essential features of AS-RNAi therapy including rapidity of therapeutic effects (Nobrega *et al*, 2013, 2014) and safety (Shukla *et al*, 2007; Rodriguez-Lebron *et al*, 2009; Jiang *et al*, 2013). Interestingly, this strategy is not only enabled to prevent the appearance and disease progression (reviewed in Trochet *et al*, 2015), but was also able to rescue a phenotype when applied to symptomatic animals (Nobrega *et al*, 2013). However, this last point may be a potential limitation for therapy since we and others (Jiang *et al*, 2013) have shown that allele-specific silencing was less efficient in reversing established disease. If the cause was not identified in the mouse model of cardiomyopathy (Jiang *et al*, 2013), our results point towards a decrease in AAV-mediated transduction capacity in heterozygous muscle when treated at 6 months of age which probably impedes therapeutic benefit. Given that there is no observed necrosis–regeneration cycle in the KI-*Dnm2* mice, the loss of viral genomes cannot be exclusively linked to muscle fibre loss as reported in dystrophic models or in wild-type mice after injury-induced regeneration (Le Hir *et al*, 2013). AAVs reach the nucleus by multiple intracellular trafficking events including binding to the cell's membrane, receptor-mediated endocytosis, trafficking through the endosomal system and endomembrane escape before nucleus entry (Nonnenmacher & Weber, 2012). Regarding known functions of DNM2, one can hypothesize that, when injected in a more severely affected muscle, defective endocytosis and/or trafficking over time leads to transduction inefficiency through decreased entry into the cell and/or abnormal targeting of the virion into degradative pathways. Improvement of AAV-mediated transduction, as already achieved in skeletal muscle by insulin treatment (Carrig *et al*, 2016) or removal of capsid phosphorylation sites (Qiao *et al*, 2010), may overcome this problem as well as an increase of the viral titre. Alternatively, despite several mechanisms shared with AAV for trafficking from the extracellular medium to the nucleus, non-viral delivery methods using cationic lipids (David *et al*, 2013) or nanoparticles (Davis *et al*, 2010) can be developed.

A suitable allele-specific siRNA for treatment of dominant inherited diseases, where WT and mutant alleles are similarly expressed, should reduce expression of target mRNA and protein around 50% resulting from silencing of the mutant allele without affecting the WT. The si9 identified in this study fulfils these criteria in patient-derived cells and in an animal model for CNM and represents a promising molecule for clinical perspectives. Behaviour of si10 is also of particular interest for a better understanding of AS-RNAi therapy. Compared to si9, si10 exhibits similar efficiency for allele-specific silencing *in vitro* in mouse cells but loses this property in human cells and *in vivo* in mice. In addition, in human cells, si10 does not induce mRNA degradation but leads to protein content reduction in agreement with a possible shift towards a "microRNA effect" only affecting translation of the target as already shown for siRNA (Saxena *et al*, 2003). Overall, these features highlight absence of definitive rules for development of allele-specific molecules which remains largely dependent of empirical testing. In addition, our data argue for requirement of validation of allele-specific candidates in different models ideally including animal model of the disease and patient-derived cells.

Among other possible therapeutic strategies ongoing for CNM, a treatment with acetylcholinesterase inhibitor has been reported to lead to improvement of muscle strength in few DNM2-CNM patients (Gibbs *et al*, 2013). We have also previously succeeded to correct the *DNM2* mRNA by trans-splicing, while with a very low efficiency (Trochet *et al*, 2016). Targeting DNM2 expression is also of interest beyond the CNM due to *DNM2* mutations. Indeed, Tasfaout and collaborators succeeded to revert the phenotype of MTM1-myotubular myopathy mouse model by knock-down Dnm2 using anti-sense oligonucleotide (Tasfaout *et al*, 2017).

AS-RNAi is promising as a future therapy for AD-CNM patients, while identification and understanding of potentials off-target activities such as induction of inflammatory response and undesired gene silencing are an important consideration (Jackson & Linsley, 2010). In this study, we rule out interferon response in treated mice, undesired silencing on few off-target candidate genes exhibiting highest similarities with the targeted sequence in murine and human cells and toxicity in mouse muscle and human cells. However, extensive investigation of the potential off-targets of si9 in human and murine cells, especially by high-throughput screening, will be required in order to clarify the side-effects of this therapeutic strategy. The next steps of preclinical evaluation will also include assessment of long-term maintenance of therapeutic benefit over time in the KI-*Dnm2* mice, toxicity studies and impact of treatment in other tissues after systemic delivery. With these remarks, our pioneer proof of concept of allele-specific silencing for the most frequent *DNM2* mutation responsible for AD-CNM allows us to envision a treatment for this neuromuscular disorder and paves the way for the other CNM mutations as well as the other *DNM2*-linked inherited diseases.

Materials and Methods

Data analysis and statistics

Graphics and statistical analyses were performed with GraphPad Prism software version 5.00. Values were expressed as means ± SEM. The number of samples (n), representing the number of independent biological replicates, was indicated in the figure legends. For molecular analysis, the experiments were repeated at least three times per biological replicate and averaged. We used non-parametric statistical tests to analyse our data since the normality could not be assumed or tested (n too small) or the variance was not equal between groups. Statistical comparisons between two groups were performed using unpaired one- or two-tailed Mann–Whitney U-test as specified. Statistical tests applied are indicated in the figure legends. $P < 0.05$ were considered as statistically significant. Individual P-values are available in Appendix Tables S3 and S4.

 © 2017 The Authors

In most of the figures, the gels are cropped for more conciseness but samples presented were run on a same gel. Uncropped gels are shown in Appendix Figs S10 and S11.

Cell cultures

Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were prepared from 13.5-day-old embryos. Cells were cultured at 37°C (5% CO_2) in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Life Technologies, France) containing 10% foetal calf serum (FCS) supplemented with penicillin, streptomycin, L-glutamate and sodium pyruvate. Experiments were performed on MEFs in primary cultures, that is 2 or 3 passages after embryo dissection. Human skin fibroblasts from healthy control subjects (C1 and C2) and from one *DNM2*-linked CNM patient harbouring the p.R465W mutation were cultured using the same medium. CNM and control fibroblasts were immortalized using a lentiviral vector containing the sequence encoding the catalytic subunit of human telomerase (hTERT) as previously described (Aure *et al*, 2007). Mouse myoblast was immortalized using a lentiviral vector containing the sequence encoding CDK4. Mouse myoblast was plated on 1% matrigel-coated dishes and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Life Technologies, France) containing 20% FCS supplemented with penicillin, streptomycin and 1% chicken embryo extracts.

For transfection, cells were grown to 70% confluency and transfected with siRNAs using JetPrime transfection reagent according to the manufacturer's protocol (Polyplus Transfection, France). Concentration of siRNAs for each experiment was indicated in corresponding figure legends. The mismatch position for the 12 siRNAs used in the *in vitro* screening was chosen based on previous studies (Trochet *et al*, 2015). Sequences of the siRNAs were indicated in Fig 1 and Appendix Table S1, and scramble siRNA (Eurogentec, Belgium) was used as control. Cells were harvested 48 h later for RNA and protein extraction or immunohistochemistry.

Total RNA extraction and cDNA analysis

Total RNA was isolated from cells using RNA easy kit (Qiagen, France) according to the manufacturer's protocol. Cells were passed through a 22-G syringe several times for disruption in lysis buffer. Total RNA from muscle was isolated by TRIZOL reagent (Life Technologies, France) following standard protocol after disruption using Fastprep Lysing Matrix D and Fastprep apparatus (MP Biomedical, France). Total RNA (1 μg) was submitted to reverse transcription using the Superscript III reverse transcriptase kit (Life Technologies) and hexamer primers. The cDNAs were amplified by PCR under the following conditions: 96°C for 5 min, cycles of 30 s at 96°C, 30 s at the appropriate temperature (58–62°C), 30 s at 72°C and a final step of 7 min at 72°C. Semi-quantitative RT–PCR was used to determine the total *Dnm2* expression level, and the appropriate number of PCR cycles has been selected in order to have the amplification in the exponential range (i.e. 23 cycles to amplify Gapdh, 27 cycles for HPRT and 28 cycles for *Dnm2*). Sequences of the primers are indicated in Appendix Table S2. To quantify allele-specific silencing, an assay was developed using restriction enzymes allowing discrimination between wild-type and mutant cDNAs after digestion of the amplicons. The digestion of the human and murine *Dnm2* amplicons was performed after 32 cycles at the end of the exponential phase of amplification.

EcoNI was used in mouse (Appendix Fig S1) and PfoI (Appendix Fig S7) in human cells. For these assays, half of the PCR products was digested using 2 U of EcoNI (New England Biolabs, France) or PfoI (ThermoFisher Scientific, France) for 2 h at 37°C. Image acquisition of PCR products after agarose gel electrophoresis was performed using a Geni2 gel imaging system (Ozyme, France), and associated signal was quantified using ImageJ Software (NIH; http://rsbweb.nih.gov/ij). DNA sequencing was performed on 20 ng DNA/100 base pairs with 5 pmol of primers (Eurofins, France).

Protein extraction and Western blot

Cell pellets and frozen TA muscles were homogenized in lysis buffer containing 50 mM of Tris–HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, NP-40 1% supplemented with protease inhibitor cocktail 1% (Sigma-Aldrich, France). In addition, TA muscles were mechanically homogenized on ice in lysis buffer using a Potter-Elvehjem. After centrifugation (14,000 *g*, 4°C, 15 min), protein concentration in the supernatant was determined with the BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific Pierce, France). Twenty micrograms of proteins was mixed with loading buffer (50 mM Tris–HCl, SDS 2%, glycerol 10%, β-mercaptoethanol 1% and bromophenol blue) and denaturated at 90°C for 5 min. Protein samples were separated on SDS–PAGE 10% and transferred onto PVDF membranes (0.45 μm pore size, Life Technologies) overnight at 100 mA at 4°C. Page ruler prestained protein ladder (ThermoFisher Scientific, France) was used as molecular weight marker. Membranes were blocked for 1 h at room temperature in PBS containing non-fat dry milk 5% and Tween-20 0.1% and then exposed to rabbit polyclonal anti-Dynamin 2 antibody (1:400, Abcam ab3457, United Kingdom) or rabbit polyclonal anti-GAPDH antibody (1:2,000, Santa Cruz, France) in PBS–Tween-20 0.1%, milk 1% overnight at 4°C. Membranes were rinsed in PBS–Tween-20 0.1% and incubated 1 h with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:20,000, anti-rabbit from Jackson ImmunoResearch, United Kingdom) in PBS–Tween-20 0.1%. Chemiluminescence was detected using ECL detection Kit (Merck-Millipore, Germany) in a G-Box imaging system (Ozyme, France), and signal quantification was performed using ImageJ software.

AAV production

A cassette containing the small hairpin (sh) RNA under the control of H1 RNA polymerase III promoter or the muSEAP transgene under CMV promoter has been inserted in a pSMD2 expression plasmid. AAV vectors (serotype 1) were produced in HEK293 cells after transfection of the pSMD2-shRNA or -muSeap plasmids or empty pSMD2 plasmid, the pXX6 plasmid coding for viral helper genes essential for AAV production and the pRepCap plasmid (p0001) coding for AAV1 capsid as described previously (Riviere *et al*, 2006). Viral particles were purified on iodixanol gradients and concentrated on Amicon Ultra-15 100K columns (Merck-Millipore). The concentration of viral genomes (vg/ml) was determined by quantitative real-time PCR on a LightCycler480 (Roche diagnostic, France) by using TaqMan probe. A control pSMD2 plasmid was 10-fold serially diluted (from 10^7 to 10^1 copies) and used as a control to establish the standard curve for absolute quantification. Sequences of primers and probes are indicated in Appendix Table S2.

© 2017 The Authors

Mice *and in vivo* transduction

The Dynamin 2 mutant mouse line was established on C57Bl/6 background at the Mouse Clinical Institute (MCI, Illkirch, France; http://www.ics-mci.fr/en/) (Durieux *et al*, 2010b). All mice used in this study were housed on a 12-h light/dark cycle and received standard diet and water *ad libitum* in the animal facility of the University Pierre et Marie Curie, Paris. Injections were performed under isoflurane anaesthesia. We chose male mice for the treatment since the characterization of the model has been done on male, the wild-type (wt) littermates were used as controls (Durieux *et al*, 2010b). Two intramuscular injections of 30 μl within 24-h interval were performed using 29-G needle in TA muscles. AAV-sh9, AAV-sh10 and AAV-control (empty AAV vector) were injected at 5×10^{12} vg/kg at 1 month of age and 3.3×10^{12} vg/kg at 6 months of age in order to achieve 10^{11} vg/muscle. For the 1M-1M series, eight heterozygous KI-*Dnm2*^{R465W} males aged of 1 month were injected (5 TA per condition sh9, sh10 and control) and then analysed for the muscle force, histology and molecular biology. Five age-matched non-injected WT mice were used as control. For the 1M-3M series, 12 heterozygous KI-*Dnm2*^{R465W} males aged of 1 month were injected (8 TA per condition sh9, sh10 and control) and analysed for the muscle force, but then, four were used for histology and four for molecular biology. Four age-matched non-injected WT mice were used as control. For the 6M-3M series, 12 heterozygous KI-*Dnm2*^{R465W} males aged of 6 months were injected (12 TA per condition sh9 and control) and analysed for the muscle force, and then, six were used for histology and six for molecular biology. Three age-matched non-injected WT mice were used as control. For the AAV-muSEAP series, four heterozygous KI-*Dnm2*^{R465W} (one male, three females) were injected at 1 month of age (n – 8 TA) in order to achieve 10^{11} vg/muscle and six heterozygous KI-*Dnm2*^{R465W} (two males, four females) was injected at 6 months of age (n – 12 TA) in order to achieve either 10^{11} vg/muscle (n – 6) or 10^{12} vg/muscle (n – 6).

Muscle contractile properties

The isometric contractile properties of TA muscles were studied *in situ* on mice anaesthetized with 60 mg/kg pentobarbital. The distal tendon of the TA muscle was attached to a lever arm of a servomotor system (305B Dual-Mode Lever, Aurora Scientific). The sciatic nerve was stimulated by a bipolar silver electrode using a supramaximal (10 V) square wave pulse of 0.1-ms duration. Absolute maximal isometric tetanic force was measured during isometric contractions in response to electrical stimulation (frequency of 25–150 Hz; train of stimulation of 500 ms). All isometric contraction measurements were made at optimal muscle length. Force is expressed in grams (1 g – 9.8 mNewton). Mice were sacrificed by cervical dislocation, and TA muscles were weighted. Specific maximal force was calculated by dividing absolute force by muscle weight.

Histomorphological analyses

Tibialis anterior muscles were frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane. Transverse sections of TA muscle (8 μm thick) were stained with haematoxylin and eosin (HE) and reduced diphosphopyridine nucleotide diaphorase staining (DPNH) by standard methods (Dubowitz & Sewry, 2007). The muSeAP detection on muscle sections was performed on slices fixed with 0.5% glutaraldehyde. Slices were washed twice with PBS, and endogenous alkaline phosphatase was heat inactivated for 30 min at 65°C before a 5-h incubation at 37°C in 0.165 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate and 0.33 mg/ml of nitroblue tetrazolium (NBT/BCIP, Promega) in 100 mM Tris–HCl, 100 mM NaCl and 50 mM $MgCl_2$. Sections were then counterstained with nuclear fast red, mounted and analysed by light microscopy. Light microscopy was performed using an upright microscope (DMR, Leica), and images were captured using a monochrome camera (DS-Ri1, Nikon) and NIS-Elements BR software (Nikon, France). Exposure settings were identical between compared samples and viewed at room temperature. For quantification of the frequency of fibre size, the maximum diameter was calculated for each fibre on TA muscle sections labelled with anti-laminin antibody (1:500, ab11575 Abcam, United Kingdom) using ImageJ software and the normal distribution of the values was plotted using Microsoft Excel software. Histomorphological abnormalities were counted on DPNH staining (two sections per animals) using ImageJ software.

Immunocytochemistry

Cells and muscle tissue cryosections (8 μm thick) were fixed in paraformaldehyde 4% (15 min at room temperature). After washing in PBS, cells and cryosections were permeabilized in Triton X-100 0.5% in PBS for 10 min at room temperature and blocked in PBS–Triton X-100 0.1%, BSA 5% and donkey serum 5% for 30 min. Samples were incubated with rabbit anti-Dynamin 2 (1:400 (Abcam ab3457), rabbit anti-laminin (1:500, Abcam ab11575) or rabbit anti-Desmin (1:200, ab15200) overnight at 4°C, in PBS with Triton X-100 0.1% and BSA 1%. After PBS–Triton X-100 0.1% washes, samples were incubated with donkey anti-rabbit AlexaFluor488 secondary antibody (1:1,000, Life Technologies, France) for 60 min at room temperature. The slides were mounted with Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, United Kingdom). Images were acquired using an axiophot microscope (Zeiss, France) or a macroscope (Nikon AZ100).

Viral genome quantification

Transduction efficacy was evaluated through quantification of viral genomes in injected muscles. Genomic DNA was extracted from mouse muscle sections using DNA purification kit (Promega, France) according to the manufacturer's protocol. Copy numbers of AAV genomes were quantified on 100 ng of genomic DNA by quantitative real-time PCR on a LightCycler480 (Roche diagnostic, France) by using TaqMan probe. A control pSMD2 plasmid was 10-fold serially diluted (from 10^7 to 10^1 copies) and used as a control to establish the standard curve for absolute quantification. Sequence of primers also used for viral titration is indicated in Appendix Table S2.

Transferrin uptake assay

Two healthy control cell lines (C1 and C2) and one patient-derived cell line expressing the p.R465W mutation were used 48 h after siRNA transfection. Cells were cultured in DMEM without FCS for 45 min at 37°C. AlexaFluor488-Transferrin (Life Technologies, France) was added at 40 μg/ml, and cells were incubated at 37°C for 15 min. Cells were washed three times with PBS and fixed in paraformaldehyde 4%

 © 2017 The Authors

The paper explained

Problem
Autosomal-dominant centronuclear myopathy (AD-CNM) is a rare congenital myopathy exhibiting a wide clinical spectrum ranging from severe-neonatal to mild-adult forms. The disease is due to heterozygous mutations (mainly missense) in the *DNM2* gene encoding Dynamin 2, a large GTPase involved in endocytosis, intracellular trafficking and cytoskeleton network regulation. There is no curative treatment available for now. Therefore, we have evaluated the therapeutic potential of allele-specific silencing strategy to specifically knock down the mutant allele and alleviate the phenotype in a CNM knock-in mouse model and patient-derived fibroblasts both harbouring the most frequent mutation (p.R465W).

Results
We report the identification of an efficient siRNA able to specifically knock down the R465W *DNM2* mutant allele *in vitro* in mouse and human cells. This specific knockdown leads to functional restoration of the impaired endocytosis in mutant human fibroblasts. We assessed the efficacy of the treatment *in vivo* in the CNM mouse model by intramuscular administration of the corresponding AAV-small hairpin RNA. Early treatment in the disease's time-course restores muscle forces and mass with a moderate decrease of the mutant allele (~40%). More modest results were obtained with a late administration when the phenotype is more pronounced due to a weaker transduction capacity of the muscle.

Impact
Our study establishes the proof of concept of allele-specific silencing to correct the most frequent *DNM2* mutation responsible for AD-CNM. This is also the first evidence of functional rescue obtained both in CNM human cells and in mouse model. Consequently, allele-specific silencing is clearly identified as a promising therapeutic strategy for AD-CNM, allowing envisions of a treatment for this neuromuscular disorder and in extension to other *DNM2*-linked inherited diseases.

at room temperature for 15 min. Stacks of cell images (0.5 μm interval) were obtained using a Leica SP2 confocal microscope. Fluorescent-positive surface was quantified on stack projection using ImageJ software and normalized to the total cell surface.

Study approval

Experiments on human cells were approved by the French Ministry of Higher Education and Scientific Research (approval no. AC-2013-1868) and conformed to the principles set out in the WMA Declaration of Helsinki and the Department of Health and Human Services Belmont Report. Written informed consent was obtained from all individuals and patients, prior to the study.

Animal studies conform to the French laws and regulations concerning the use of animals for research and were approved by an external Ethical committee (approval no. 00351.02 delivered by the French Ministry of Higher Education and Scientific Research).

Expanded View for this article is available online.

Acknowledgments
We thank the Pitié-Salpêtrière Imaging Platform (PICPS) for light microscopy imaging facilities, the Penn Vector Core, Gene Therapy Program (University of Pennsylvania, Philadelphia, USA) for providing pAAV1 plasmid (p0001) and Stéphanie Buart for mouse embryonic fibroblast preparation. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Association Institut de Myologie (AIM), the Université Pierre et Marie Curie (UPMC), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), and the Agence Nationale de la Recherche (grant ANR-14-CE12-0009 to M.B. and Young Researcher grant ANR-14-CE12-0001-01 to S.V.).

Author contributions
DT and MBi conceived and designed the experiments. DT, BP, LJ, SBZ, MBe, CP, SL, KM, AF, SV and MBi performed the experiments. AR and JL generated immortalized myoblast. DT, BP, PG and MBi analysed the data. DT, SV and MBi wrote the paper. DT, BP, SB-Z, MBe, CP, SL, KM, AF, SV, PG and MBi read and approved the final version of the manuscript.

Conflict of interest
The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Aure K, Mamchaoui K, Frachon P, Butler-Browne GS, Lombes A, Mouly V (2007) Impact on oxidative phosphorylation of immortalization with the telomerase gene. *Neuromuscul Disord* 17: 368 – 375

Bitoun M, Maugenre S, Jeannet PY, Lacène E, Ferrer X, Laforêt P, Martin JJ, Laporte J, Lochmuller H, Beggs AH *et al* (2005) Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nature Genet* 37: 1207 – 1209

Bitoun M, Bevilacqua JA, Prudhon B, Maugenre S, Taratuto AL, Monges S, Lubieniecki F, Cances C, Uro-Coste E, Mayer M *et al* (2007) Dynamin 2 mutations cause sporadic centronuclear myopathy with neonatal onset. *Ann Neurol* 62: 666 – 670

Bitoun M, Durieux AC, Prudhon B, Bevilacqua JA, Herledan A, Sakanyan V, Urtizberea A, Cartier L, Romero NB, Guicheney P (2009) Dynamin 2 mutations associated with human diseases impair clathrin-mediated receptor endocytosis. *Hum Mutat* 30: 1419 – 1427

Bohm J, Biancalana V, Dechene ET, Bitoun M, Pierson CR, Schaefer E, Karasoy H, Dempsey MA, Klein F, Dondaine N *et al* (2012) Mutation spectrum in the large GTPase dynamin 2, and genotype-phenotype correlation in autosomal dominant centronuclear myopathy. *Hum Mutat* 33: 949 – 959

Carrig S, Bijjiga E, Wopat MJ, Martino AT (2016) Insulin therapy improves adeno-associated virus transduction of liver and skeletal muscle in mice and cultured cells. *Hum Gene Ther* 27: 892 – 905

Cowling BS, Chevremont T, Prokic I, Kretz C, Ferry A, Coirault C, Koutsopoulos O, Laugel V, Romero NB, Laporte J (2014) Reducing dynamin 2 expression rescues X-linked centronuclear myopathy. *J Clin Invest* 124: 1350 – 1363

David S, Passirani C, Carmoy N, Morille M, Mevel M, Chatin B, Benoit JP, Montier T, Pitard B (2013) DNA nanocarriers for systemic administration: characterization and *in vivo* bioimaging in healthy mice. *Mol Ther Nucleic Acids* 2: e64

Davis ME, Zuckerman JE, Choi CH, Seligson D, Tolcher A, Alabi CA, Yen Y, Heidel JD, Ribas A (2010) Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature* 464: 1067 – 1070

Dubowitz V, Sewry C (2007) *Muscle biopsy. A practical approach*, 3rd edn, pp. 21 – 39. London: W.B. Saunders/Elsevier

Durieux A, Prudhon B, Guicheney P, Bitoun M (2010a) Dynamin 2 and human diseases. *J Mol Med* 88: 339 – 350

© 2017 The Authors

Durieux AC, Vignaud A, Prudhon B, Thao Viou M, Beuvin M, Vassilopoulos S, Fraysse B, Ferry A, Lainé J, Romero NB *et al* (2010b) A centronuclear myopathy-dynamin 2 mutation impairs skeletal muscle structure and function in mice. *Hum Mol Genet* 19: 4820 – 4836

Ferguson S, Raimondi A, Paradise S, Shen H, Mesaki K, Ferguson A, Destaing O, Ko G, Takasaki J, Cremona O *et al* (2009) Coordinated actions of actin and BAR proteins upstream of dynamin at endocytic clathrin-coated pits. *Dev Cell* 17: 811 – 822

Fischer D, Herasse M, Bitoun M, Barragán-Campos HM, Chiras J, Laforêt P, Fardeau M, Eymard B, Guicheney P, Romero NB (2006) Characterization of the muscle involvement in dynamin 2- related centronuclear myopathy. *Brain* 129: 1463 – 1469

Gibbs EM, Clarke NF, Rose K, Oates EC, Webster R, Feldman EL, Dowling JJ (2013) Neuromuscular junction abnormalities in DNM2-related centronuclear myopathy. *J Mol Med (Berl)* 91: 727 – 737

Gonzalez-Jamett AM, Baez-Matus X, Olivares MJ, Hinostroza F, Guerra-Fernandez MJ, Vasquez-Navarrete J, Bui MT, Guicheney P, Romero NB, Bevilacqua JA *et al* (2017) Dynamin-2 mutations linked to centronuclear myopathy impair actin-dependent trafficking in muscle cells. *Sci Rep* 7: 4580

Hanisch F, Muller T, Dietz A, Bitoun M, Kress W, Weis J, Stoltenburg G, Zierz S (2011) Phenotype variability and histopathological findings in centronuclear myopathy due to DNM2 mutations. *J Neurol* 258: 1085 – 1090

Heymann JA, Hinshaw JE (2009) Dynamins at a glance. *J Cell Sci* 122: 3427 – 3431

Jackson AL, Linsley PS (2010) Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nat Rev Drug Discov* 9: 57 – 67

Jiang J, Wakimoto H, Seidman JG, Seidman CE (2013) Allele-specific silencing of mutant Myh6 transcripts in mice suppresses hypertrophic cardiomyopathy. *Science* 342: 111 – 114

Jungbluth H, Cullup T, Lillis S, Zhou H, Abbs S, Sewry C, Muntoni F (2010) Centronuclear myopathy with cataracts due to a novel dynamin 2 (DNM2) mutation. *Neuromuscul Disord* 20: 49 – 52

Kaplan J, Kaplan FS, Shore EM (2012) Restoration of normal BMP signaling levels and osteogenic differentiation in FOP mesenchymal progenitor cells by mutant allele-specific targeting. *Gene Ther* 19: 786 – 790

Kenniston JA, Lemmon MA (2010) Dynamin GTPase regulation is altered by PH domain mutations found in centronuclear myopathy patients. *EMBO J* 29: 3054 – 3067

Klootwijk RD, Savelkoul PJ, Ciccone C, Manoli I, Caplen NJ, Krasnewich DM, Gahl WA, Huizing M (2008) Allele-specific silencing of the dominant disease allele in sialuria by RNA interference. *FASEB J* 22: 3846 – 3852

Le Hir M, Goyenvalle A, Peccate C, Precigout G, Davies KE, Voit T, Garcia L, Lorain S (2013) AAV genome loss from dystrophic mouse muscles during AAV-U7 snRNA-mediated exon-skipping therapy. *Mol Ther* 21: 1551 – 1558

Leachman SA, Hickerson RP, Schwartz ME, Bullough EE, Hutcherson SL, Boucher KM, Hansen CD, Eliason MJ, Srivatsa GS, Kornbrust DJ *et al* (2010) First-in-human mutation-targeted siRNA phase Ib trial of an inherited skin disorder. *Mol Ther* 18: 442 – 446

Loy RE, Lueck JD, Mostajo-Radji MA, Carrell EM, Dirksen RT (2012) Allele-specific gene silencing in two mouse models of autosomal dominant skeletal myopathy. *PLoS One* 7: e49757

Melberg A, Kretz C, Kalimo H, Wallgren-Pettersson C, Toussaint A, Bohm J, Stalberg E, Laporte J (2010) Adult course in dynamin 2 dominant centronuclear myopathy with neonatal onset. *Neuromuscul Disord* 20: 53 – 56

Muller GA, Hansen U, Xu Z, Griswold B, Talan MI, McDonnell NB, Briest W (2012) Allele-specific siRNA knockdown as a personalized treatment strategy for vascular Ehlers-Danlos syndrome in human fibroblasts. *FASEB J* 26: 668 – 677

Nobrega C, Nascimento-Ferreira I, Onofre I, Albuquerque D, Hirai H, Deglon N, de Almeida LP (2013) Silencing mutant ataxin-3 rescues motor deficits and neuropathology in Machado-Joseph disease transgenic mice. *PLoS One* 8: e52396

Nobrega C, Nascimento-Ferreira I, Onofre I, Albuquerque D, Deglon N, Pereira de Almeida L (2014) RNA interference mitigates motor and neuropathological deficits in a cerebellar mouse model of machado-joseph disease. *PLoS One* 9: e100086

Nonnenmacher M, Weber T (2012) Intracellular transport of recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Ther* 19: 649 – 658

Qiao C, Zhang W, Yuan Z, Shin JH, Li J, Jayandharan GR, Zhong L, Srivastava A, Xiao X, Duan D (2010) Adeno-associated virus serotype 6 capsid tyrosine-to-phenylalanine mutations improve gene transfer to skeletal muscle. *Hum Gene Ther* 21: 1343 – 1348

Riviere C, Danos O, Douar AM (2006) Long-term expression and repeated administration of AAV type 1, 2 and 5 vectors in skeletal muscle of immunocompetent adult mice. *Gene Ther* 13: 1300 – 1308

Rodriguez-Lebron E, Gouvion CM, Moore SA, Davidson BL, Paulson HL (2009) Allele-specific RNAi mitigates phenotypic progression in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Mol Ther* 17: 1563 – 1573

Sambuughin N, Goldfarb LG, Sivtseva TM, Davydova TK, Vladimirtsev VA, Osakovskiy VL, Danilova AP, Nikitina RS, Ylakhova AN, Diachkovskaya MP *et al* (2015) Adult-onset autosomal dominant spastic paraplegia linked to a GTPase-effector domain mutation of dynamin 2. *BMC Neurol* 15: 223

Saxena S, Jonsson ZO, Dutta A (2003) Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells. *J Biol Chem* 278: 44312 – 44319

Shukla V, Coumoul X, Wang RH, Kim HS, Deng CX (2007) RNA interference and inhibition of MEK-ERK signaling prevent abnormal skeletal phenotypes in a mouse model of craniosynostosis. *Nat Genet* 39: 1145 – 1150

Sierant M, Paduszynska A, Kazmierczak-Baranska J, Nacmias B, Sorbi S, Bagnoli S, Sochacka E, Nawrot B (2011) Specific silencing of L392V PSEN1 mutant allele by RNA interference. *Int J Alzheimers Dis* 2011: 809218

Susman RD, Quijano-Roy S, Yang N, Webster R, Clarke NF, Dowling J, Kennerson M, Nicholson G, Biancalana V, Ilkovski B *et al* (2010) Expanding the clinical, pathological and MRI phenotype of DNM2-related centronuclear myopathy. *Neuromuscul Disord* 20: 229 – 237

Tasfaout H, Buono S, Guo S, Kretz C, Messaddeq N, Booten S, Greenlee S, Monia BP, Cowling BS, Laporte J (2017) Antisense oligonucleotide-mediated Dnm2 knockdown prevents and reverts myotubular myopathy in mice. *Nat Commun* 8: 15661

Tinelli E, Pereira JA, Suter U (2013) Muscle-specific function of the centronuclear myopathy and Charcot-Marie-Tooth neuropathy-associated dynamin 2 is required for proper lipid metabolism, mitochondria, muscle fibers, neuromuscular junctions and peripheral nerves. *Hum Mol Genet* 22: 4417 – 4429

Trochet D, Prudhon B, Vassilopoulos S, Bitoun M (2015) Therapy for dominant inherited diseases by allele-specific RNA interference: successes and pitfalls. *Curr Gene Ther* 15: 503 – 510

Trochet D, Prudhon B, Jollet A, Lorain S, Bitoun M (2016) Reprogramming the Dynamin 2 mRNA by Spliceosome-mediated RNA Trans-splicing. *Mol Ther Nucleic Acids* 5: e362

Wang L, Barylko B, Byers C, Ross JA, Jameson DM, Albanesi JP (2010) Dynamin 2 mutants linked to centronuclear myopathies form abnormally stable polymers. *J Biol Chem* 285: 22753 – 22757

 © 2017 The Authors

Xia X, Zhou H, Huang Y, Xu Z (2006) Allele-specific RNAi selectively silences mutant SOD1 and achieves significant therapeutic benefit *in vivo*. *Neurobiol Dis* 23: 578 – 586

Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, Rabinowitz JE (2008) Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther* 16: 1073 – 1080

Zuchner S, Noureddine M, Kennerson M, Verhoeven K, Claeys K, De Jonghe P, Merory J, Oliveira SA, Speer MC, Stenger JE *et al* (2005) Mutations in the pleckstrin homology domain of dynamin 2 cause dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Genet* 37: 289 – 294

License: This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

4.3 Participation à l'étude du rôle de BIN1 dans la régulation de DNM2 pour la maturation du muscle.

Publication 3: "**Amphiphysin (BIN1) negatively regulates dynamin 2 for normal muscle maturation**"

4.3.1 Contexte de l'étude

Des mutations au niveau des gènes *BIN1* et *DNM2* causent deux formes de myopathies centronucléaires : autosomique récessive et dominante. DNM2 possède un domaine riche en proline (PRD) qui interagit avec des protéines possédant un domaine de type SH3. Les amphiphysines peuvent ainsi interagir avec DNM2 par leur extrémité C-terminale et courber des membranes par leur domaine BAR. BIN1 (Amphiphysine 2) est impliquée dans la formation des tubules-T et les mutations CNM-BIN1 entraînent un défaut de la formation de ces tubules et de liaison à la DNM2. Plusieurs études *in vitro* et *in cellulo* ont essayé d'élucider le lien entre les amphiphysines et DNM2 (David, McPherson et al.1 996) mais le lien entre ces protéines *in vivo* est mal élucidé. Les souris KO *Bin1*$^{-/-}$ et *Dnm2*$^{+/-}$ ont été développées et caractérisées dans notre laboratoire. Le but de cette étude est de comprendre l'impact de la balance BIN1/DNM2 sur le muscle squelettique.

4.3.2 Résultats

Les souris KO homozygotes *Bin1*$^{-/-}$ meurent à la naissance. Nous avons généré par croisement des souris Bin1$^{-/-}$ qui expriment 50% de DNM2. Ces souris sont viables jusqu'au moins l'âge de 18 mois et sont en bonne santé sans présenter de phénotypes musculaires. La réduction de la DNM2 a corrigé les phénotypes histopathologiques et ultrastructuraux des embryons E18,5. Les tubules T sont bien formés et les triades bien maintenues. Afin de vérifier l'expression d'isoformes tissu-spécifiques de ces deux protéines, les isoformes d'ARN ont été identifiés dans les cellules en culture et durant la maturation du muscle *in vivo*. BIN1 iso8 est

surexprimé dans les myotubes et le muscle mature et un isoforme muscle-spécifique a été identifié : DNM2+12B. BIN1 a inhibé l'activité de DNM2 durant le développement du muscle alors qu'elle n'a pas d'effet sur la DNM2 exprimée dans le muscle adulte. Ces résultats suggèrent que BIN1 et DNM2 interagissent selon une voie commune et que BIN1 agit comme un régulateur négatif de DNM2.

4.3.3 Contributions

Au cours de ce projet, j'ai extrait et mis en culture les myoblastes primaires des embryons E18,5 pour les souris de génotypes Bin1$^{-/-}$, Bin1$^{+/-}$ et WT. J'ai établi des lignées primaires de myoblastes et mesuré le taux de Ca^{2+} basal et après stimulation avec la caféine.

Amphiphysin (BIN1) negatively regulates dynamin 2 for normal muscle maturation

Belinda S. Cowling,[1,2,3,4] Ivana Prokic,[1,2,3,4] Hichem Tasfaout,[1,2,3,4] Aymen Rabai,[1,2,3,4] Frédéric Humbert,[5] Bruno Rinaldi,[6] Anne-Sophie Nicot,[1,2,3,4] Christine Kretz,[1,2,3,4] Sylvie Friant,[6] Aurélien Roux,[5,7] and Jocelyn Laporte[1,2,3,4]

[1]Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France. [2]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U964, Illkirch, France. [3]Centre National de la Recherche Scientifique, UMR7104, Illkirch, France. [4]Université de Strasbourg, Illkirch, France. [5]Biochemistry Department, University of Geneva, Geneva, Switzerland. [6]Department of Molecular and Cellular Genetics, UMR7156, Université de Strasbourg and CNRS, Strasbourg, France. [7]Swiss National Centre of Competence in Research Programme Chemical Biology, Geneva, Switzerland.

Regulation of skeletal muscle development and organization is a complex process that is not fully understood. Here, we focused on amphiphysin 2 (BIN1, also known as bridging integrator-1) and dynamin 2 (DNM2), two ubiquitous proteins implicated in membrane remodeling and mutated in centronuclear myopathies (CNMs). We generated *Bin1*$^{-/-}$ *Dnm2*$^{+/-}$ mice to decipher the physiological interplay between BIN1 and DNM2. While *Bin1*$^{-/-}$ mice die perinatally from a skeletal muscle defect, *Bin1*$^{-/-}$ *Dnm2*$^{+/-}$ mice survived at least 18 months, and had normal muscle force and intracellular organization of muscle fibers, supporting BIN1 as a negative regulator of DNM2. We next characterized muscle-specific isoforms of BIN1 and DNM2. While BIN1 colocalized with and partially inhibited DNM2 activity during muscle maturation, BIN1 had no effect on the isoform of DNM2 found in adult muscle. Together, these results indicate that BIN1 and DNM2 regulate muscle development and organization, function through a common pathway, and define BIN1 as a negative regulator of DNM2 in vitro and in vivo during muscle maturation. Our data suggest that DNM2 modulation has potential as a therapeutic approach for patients with CNM and BIN1 defects. As BIN1 is implicated in cancers, arrhythmia, and late-onset Alzheimer disease, these findings may trigger research directions and therapeutic development for these common diseases.

Introduction

Skeletal muscle requires adequate membrane remodeling to achieve and maintain its normal structure and function (1). It is thus not surprising that several human myopathies are due to mutations in proteins implicated in membrane trafficking and remodeling (2). Amphiphysins and dynamins are recognized hubs in the membrane trafficking pathway and are known to physically interact in cells (3, 4). Amphiphysin 2 (BIN1) and dynamin 2 (DNM2) are mutated in rare congenital myopathies called centronuclear myopathies (CNMs) (5–7), characterized by severe muscle weakness and hypotonia associated with mislocalization of nuclei and other organelles and the abnormal orientation and shape of T-tubules in skeletal muscle fibers (8). Despite numerous studies in vitro or in cell culture, the regulation between amphiphysins and dynamins and their physiological importance are barely understood.

BIN1 contains a BAR domain that can sense and induce membrane curvature and a C-terminal SH3 domain that binds to different effectors containing a proline-rich domain (PRD), such as dynamins (9, 10). Based on its membrane tubulation properties and on the muscle phenotype of the amphiphysin Drosophila mutant, BIN1 was proposed to participate in the biogenesis of T-tubules, plasma membrane invaginations forming along with the sarcoplasmic reticulum calcium stores the structural basis of the excitation-contraction coupling machinery in cardiac and skeletal muscles (3, 11). BIN1 recessive mutations in CNMs either impair its membrane tubulation properties, its binding to dynamin 2, or the inclusion of a muscle-specific exon encoding a phosphoinositide-binding (PI-binding) domain (6, 7, 12). DNM2 is a large GTPase involved in membrane fission and endocytosis (13, 14). Biochemical studies indicated that several DNM2 mutations causing CNMs increase dynamin oligomer stability and GTPase activity (15–17). Moreover, overexpression of WT or a DNM2-CNM mutation leads to CNM-like features in mice and perturbation of muscle and T-tubules in Drosophila (17–19). We hypothesize that CNM mutations in BIN1 are loss-of-function while CNM mutations in DNM2 create a gain of function. Here, to study the genetic and functional links between BIN1 and DNM2 and the physiological impact of the BIN1/DNM2 balance in skeletal muscle, we created a *Bin1*$^{-/-}$ mouse and modulated DNM2 expression in this model, and analyzed the impact of BIN1 on DNM2 activity.

Results

BIN1 is required in skeletal muscle for perinatal survival. To study the interplay between BIN1 and DNM2 during muscle maturation, *Dnm2*$^{+/-}$ and *Bin1*$^{-/-}$ mice were created. The *Dnm2*$^{+/-}$ mice are viable without obvious phenotypes (20). To develop a mouse model for autosomal recessive BIN1-CNM, we floxed exon 20 that is found in all isoforms of BIN1, is frequently mutated in patients, and encodes for the SH3 domain known to bind to DNM2 (7) (Figure 1A). Fol-

Authorship note: B.S. Cowling and I. Prokic contributed equally to this work.
Conflict of interest: H. Tasfaout, J. Laporte, and B.S. Cowling are inventors on a patent (number Ep13306440.2 - 1412 [EP20130306440], filed 10/28/2013, second file international extension [PCT] PCT/EP2014/072466, 10/20/2014) for targeting DNM2 for the treatment of centronuclear myopathies, and cofounders of Dynacure. J. Laporte and B.S. Cowling are scientific advisors for Dynacure.
Submitted: September 6, 2016; **Accepted:** October 3, 2017.
Reference information: *J Clin Invest*. 2017;127(12):4477–4487. https://doi.org/10.1172/JCI90542.

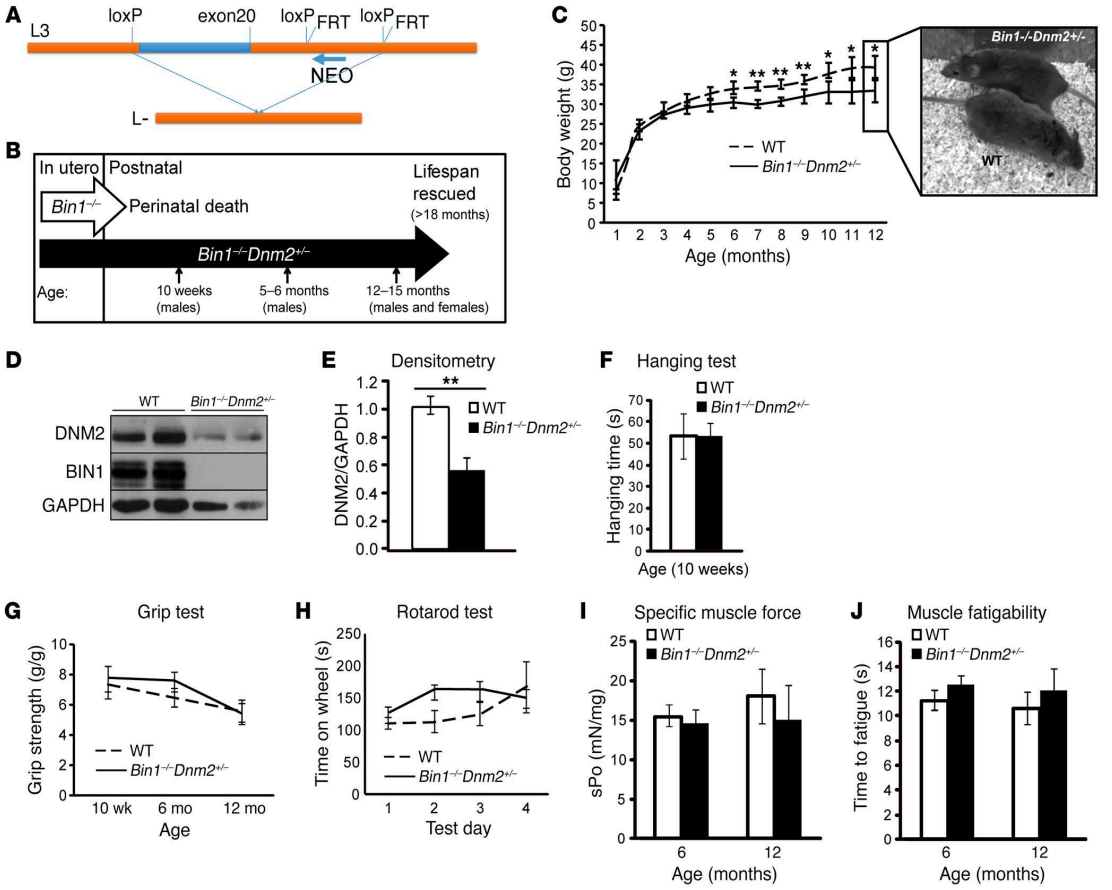


Figure 1. Dnm2 downregulation rescues the neonatal lethality of *Bin1*$^{-/-}$ mice. (**A**) Targeted disruption of mouse Bin1 gene. Exon 20 (blue) and surrounding intronic region (orange). (**B**) Overview of lifespan and time points used to analyze *Bin1*$^{-/-}$ *Dnm2*$^{+/-}$ mice. (**C**) Mice whole-body weight, and representative photo of mice at 12 months of age. Note that all genotyped *Bin1*$^{-/-}$ *Dnm2*$^{+/-}$ mice survived beyond 12 months of age. (**D**) Immunoblot analysis of DNM2 and BIN1 protein expression from muscle lysates. (**E**) Relative level of DNM2 protein expression was determined by densitometry of DNM2 signal standardized to GAPDH. n = 4 mice/genotype. (**F**) Hanging test where 10-week-old mice were required to hang from a cage lid for up to 60 seconds. (**G**) Four-paw grip test. (**H**) Rotarod test performed under acceleration mode (4–40 rpm in 5 minutes). n = 3 trials/mouse/day, 6-month-old mice. (**I**) Specific muscle force (sPo) of the tibialis anterior (TA) muscle (mN force/mg TA muscle). (**J**) Fatigue of the TA muscle, measured as the time taken to reach 50% of the maximum muscle force (seconds). All graphs depict the mean ± SEM. Statistical analysis was performed using an unpaired 2-tailed Student's t test for all graphs except **H**, where a 2-way ANOVA followed by Dunn's multiple comparison test was used. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$. n = minimum 5 mice per group for **C**, **F**–**J**.

lowing either constitutive or skeletal muscle deletion with CMV or human skeletal actin (HSA) promoters driving the Cre recombinase, *Bin1*$^{-/-}$ was neonatally lethal in mice, with no pups surviving the first day of postnatal life (Table 1 and Supplemental Table 1; supplemental material available online with this article; https://doi.org/10.1172/JCI90542DS1). A similar perinatal lethality was previously reported for another constitutive *Bin1*$^{-/-}$ mouse deleted for exon 3 and the phenotype was first attributed to severe ventricular cardiomyopathy (21); however, mice with exon 3 cardiac-specific deletion survived to adulthood (22). At least in our *Bin1*$^{-/-}$ model, the lethality is due to a primary defect of skeletal muscle, as the HSA-driven Cre recombinase is only expressed in skeletal muscle, and not cardiac muscle (23), and this defines an essential role of BIN1 in perinatal muscle maturation. Similarly, most BIN1-CNM patients display neonatal muscle weakness and several died within the first year (7).

Reducing DNM2 expression prevents the neonatal lethality caused by BIN1 defect. Recessive BIN1-CNM is due to BIN1 loss of function and dominant DNM2-CNM is probably due to DNM2 gain of function (5, 7, 15–17). We hypothesize that these 2 proteins are working antagonistically in the same pathway for muscle maturation and that reducing DNM2 expression might rescue the neonatal lethality observed in *Bin1*$^{-/-}$ mice. To test this hypothesis, we produced *Bin1*$^{-/-}$ mice with reduced DNM2 expression (*Bin1*$^{-/-}$ *Dnm2*$^{+/-}$) (Table 1 and Figure 1B). Unlike *Bin1*$^{-/-}$ mice, *Bin1*$^{-/-}$ *Dnm2*$^{+/-}$ mice are viable to at least 18 months (oldest age at sacrifice), with only a slight but significant reduction in body weight from 6 months of age compared with *Bin1*$^{+/+}$ *Dnm2*$^{+/+}$ (hereafter named WT) littermates (Figure 1C). Furthermore, *Bin1*$^{-/-}$ *Dnm2*$^{+/-}$ mice appeared healthy (Figure 1C and Supplemental Videos 1–3). As phenotyping performed on other

Table 1. Breeding strategy and outcome for *Bin1*$^{-/-}$ *Dnm2*$^{+/-}$ mice, with expected and obtained percentage of mice at E18.5

Breeding:	*Bin1*$^{+/-}$ *Dnm2*$^{+/-}$			*Bin1*$^{+/-}$ *Dnm2*$^{+/+}$		
Offspring E18.5:	*Bin1*$^{+/+}$ *Dnm2*$^{+/+}$	*Bin1*$^{+/+}$ *Dnm2*$^{+/-}$	*Bin1*$^{+/-}$ *Dnm2*$^{+/+}$	*Bin1*$^{+/-}$ *Dnm2*$^{+/-}$	*Bin1*$^{-/-}$ *Dnm2*$^{+/+}$	*Bin1*$^{-/-}$ *Dnm2*$^{+/-}$
Expected:	12.5%	12.5%	25%	25%	12.5%	12.5%
Outcome:	30%	8%	33%	15%	6%	8%
Analyzed:	Analyzed WT	S.I.	S.I.	S.I.	Perinatally lethal	Lifespan rescued Analyzed

S.I. refers to data shown only in the supplemental information.

genotypes (namely, *Bin1*$^{+/-}$ mice) produced in this cross indicated no obvious phenotypes (Table 1 and Supplemental Figure 1), this study focused on WT and *Bin1*$^{-/-}$ *Dnm2*$^{+/-}$ mice.

No difference was observed between WT and *Bin1*$^{-/-}$ *Dnm2*$^{+/-}$ mice in blood metabolites, liver function, organ weight, or histology in brain and liver at 12 months (Supplemental Figure 2). No difference in muscle mass or histology of the heart was noted, as ventricle thickness was similar and no increased fibrosis was observed at 12 months (Supplemental Figure 3). Western blot confirmed that BIN1 protein expression was barely detectable in *Bin1*$^{-/-}$ *Dnm2*$^{+/-}$ mice and that DNM2 expression was reduced to approximately 50% of WT levels (Figure 1, D and E), therefore validating that reducing DNM2 expression can rescue the neonatal lethality caused by BIN1 defect.

Bin1-KO mice with Dnm2 haploinsufficiency have normal muscle strength. As *Bin1*$^{-/-}$ *Dnm2*$^{+/-}$ and WT mice appeared clinically similar, we focused on muscle-related functions. No difference was observed in hanging test, grip test, and rotarod performance at all different ages analyzed (10 weeks, 6 months, and 12 months) and for both sexes (Figure 1, F–H, Supplemental Figure 4). No difference in weights of gastrocnemius, soleus, extensor digitorum longus (EDL), or tibialis anterior (TA) skeletal muscles was observed in *Bin1*$^{-/-}$ *Dnm2*$^{+/-}$ mice compared with WT (Supplemental Figure 4). Specific muscle force and fatigability were measured in situ in the TA muscle at 6 and 12 months of age, and no difference between groups was observed (Figure 1, I and J, and Supplemental Figure 4). Overall, these results indicate that *Bin1*$^{-/-}$ *Dnm2*$^{+/-}$ have normal whole-body strength and coordination, and individual

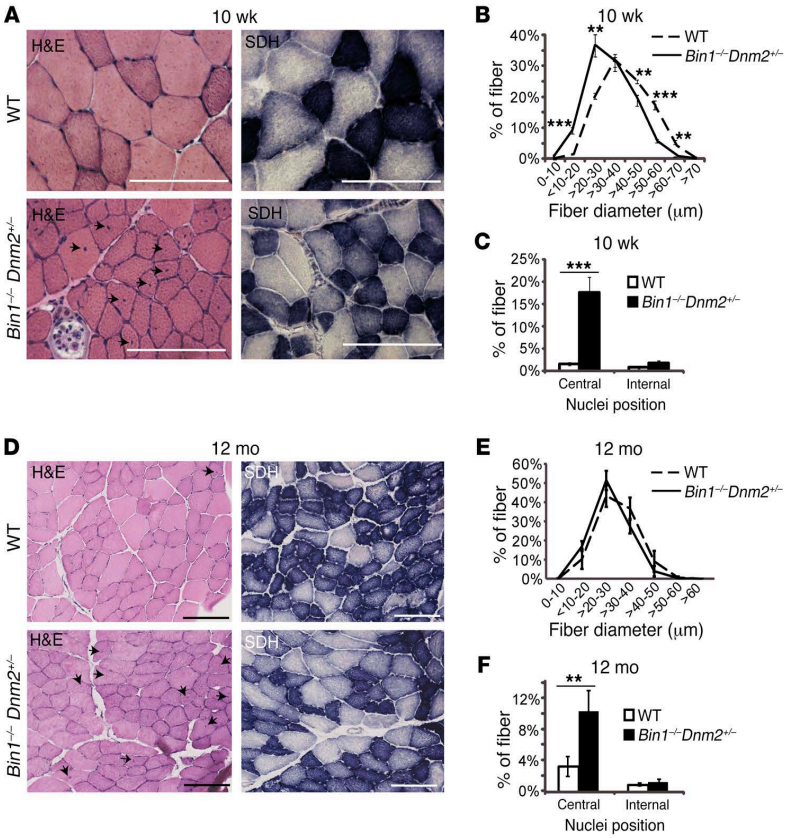


Figure 2. Skeletal muscle histology is mildly affected in surviving *Bin1*$^{-/-}$ mice with reduced DNM2 expression. Transverse TA sections from 10-week-old (10 wk) (**A**) or 12-month-old (12 mo) (**D**) mice were stained with H&E or for SDH. Arrows point to mislocalized nuclei. Scale bars: 100 μm. H&E-stained muscle sections were then analyzed for fiber area for 10 wk (**B**) and 12 mo (**E**). Fiber diameter is grouped into 10-μm intervals, and represented as the percentage of total fibers. (**C** and **F**) The frequency of fibers with central or internal nuclei were scored. Internal nuclei are defined as neither subsarcolemmal nor central. All graphs depict the mean ± SEM. Statistical analysis was performed using an unpaired 2-tailed Student's *t* test. $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, n = minimum 5 mice per group.

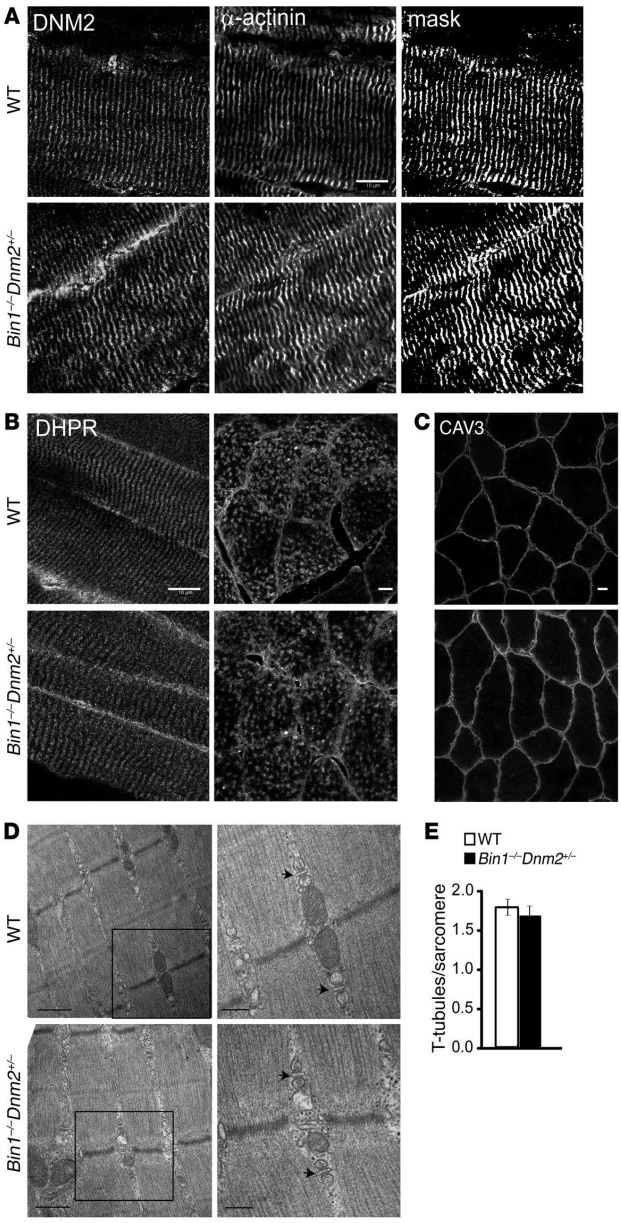


Figure 3. Normal muscle structure and ultrastructure in *Bin1*$^{-/-}$ *Dnm2*$^{+/-}$ mice. (**A**) Longitudinal muscle sections were costained for DNM2 (left panel) and α-actinin (middle panel) and imaged by confocal microscopy. Mask image shows areas of colocalization (right panel). Scale bar: 10 μm. (**B**) Longitudinal (left panel) and transverse (right panel) muscle sections were stained with the T-tubule marker DHPR. Scale bars: 10 μm. (**C**) Transverse muscle sections stained with CAV3 antibody and viewed by confocal microscopy. Scale bar: 10 μm. (**D**) Longitudinal muscle sections viewed by transmission electron microscopy. Low-magnification images are in the left panel (scale bar: 0.5 μm); high magnification images are shown in the right panel (scale bar: 200 nm). Arrows point to the triad. All samples are from 12-month-old mice. (**E**) The number of T-tubules per sarcomere was calculated from TEM images in **D**. Graph depicts the mean ± SEM. Statistical analysis was performed using an unpaired 2-tailed Student's *t* test, n = 3 mice/genotype.

muscle strength. As no *Bin1*$^{-/-}$ mice survived past 24 hours, their strength could not be compared.

Dnm2 reduction rescues CNM histology in Bin1-KO mice. To determine if the skeletal muscle structure was affected in *Bin1*$^{-/-}$ *Dnm2*$^{+/-}$ mice, TA muscle cryosections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and for succinate dehydrogenase (SDH, mitochondrial enzyme) at 10 weeks and 12 months of age. At 10 weeks, muscle fibers were slightly but significantly smaller than WT, while by 12 months this difference was not significant (Figure 2, A, B, D, and E). No difference was observed in SDH staining at either time point. The main sustained difference was a 9-fold increase in centralized nuclei at 10 weeks up to 20% of fibers and to a lesser extent at 12 months (Figure 2, A, C, D, and F). BIN1-CNM histology is characterized by hypotrophic fibers with mislocalized internal nuclei in patient biopsies (24), reminiscent of an important role of BIN1 in nuclear positioning (25). The slight CNM-like histological features in *Bin1*$^{-/-}$ mice with reduced DNM2 level appear compatible with normal muscle strength and coordination.

As *Bin1*$^{-/-}$ mice did not survive past day 1 for comparison of the nuclei position, we next analyzed skeletal muscles from mice at embryonic day 18.5 (E18.5). In WT mice at this age, muscles are not yet fully structured, and several fibers with centralized nuclei can still be observed by H&E staining (Supplemental Figure 5A). In contrast, nearly all fibers from *Bin1*$^{-/-}$ mice had centralized nuclei, a feature that was ameliorated by reducing DNM2. Both *Bin1*$^{-/-}$ and *Bin1*$^{-/-}$ *Dnm2*$^{+/-}$ mice displayed an accumulation of SDH staining towards the center of the fibers (Supplemental Figure 5A); however, no difference was observed in SDH staining in adult mice (Figure 2), indicating that this disease feature is corrected during postnatal development in *Bin1*$^{-/-}$ *Dnm2*$^{+/-}$ muscles. Overall, these results show that reducing DNM2 expression can improve the histological CNM hallmarks observed in *Bin1*$^{-/-}$ mice.

Bin1-KO mice with Dnm2 haploinsufficiency have normal muscle ultrastructure and T-tubules. As BAR proteins can remodel membrane in vitro and as *Bin1* downregulation with shRNA in adult muscle led to swollen T-tubules (3, 26, 27), the sarcomere and triad structures were investigated. In skeletal muscles from E18.5 WT mice, DNM2 and α-actinin were detected predominantly in the transverse orientation, consistent with Z-line orientation (Supplemental Figure 5B). This was also observed in both *Bin1*$^{-/-}$ and *Bin1*$^{-/-}$ *Dnm2*$^{+/-}$ muscles, indicating that BIN1 is not required for the transverse localization of DNM2. In adult *Bin1*$^{-/-}$ *Dnm2*$^{+/-}$ mice, DNM2 localization was unperturbed and colocalized at the Z-line with α-actinin in 10-week- and 12-month-old mice (Figure 3A and Supplemental Figure 6). By electron microscopy, no obvious structural defects were observed, Z-lines appeared well aligned, myofibrils were of a similar size, and no major differences in organelle size or posi-

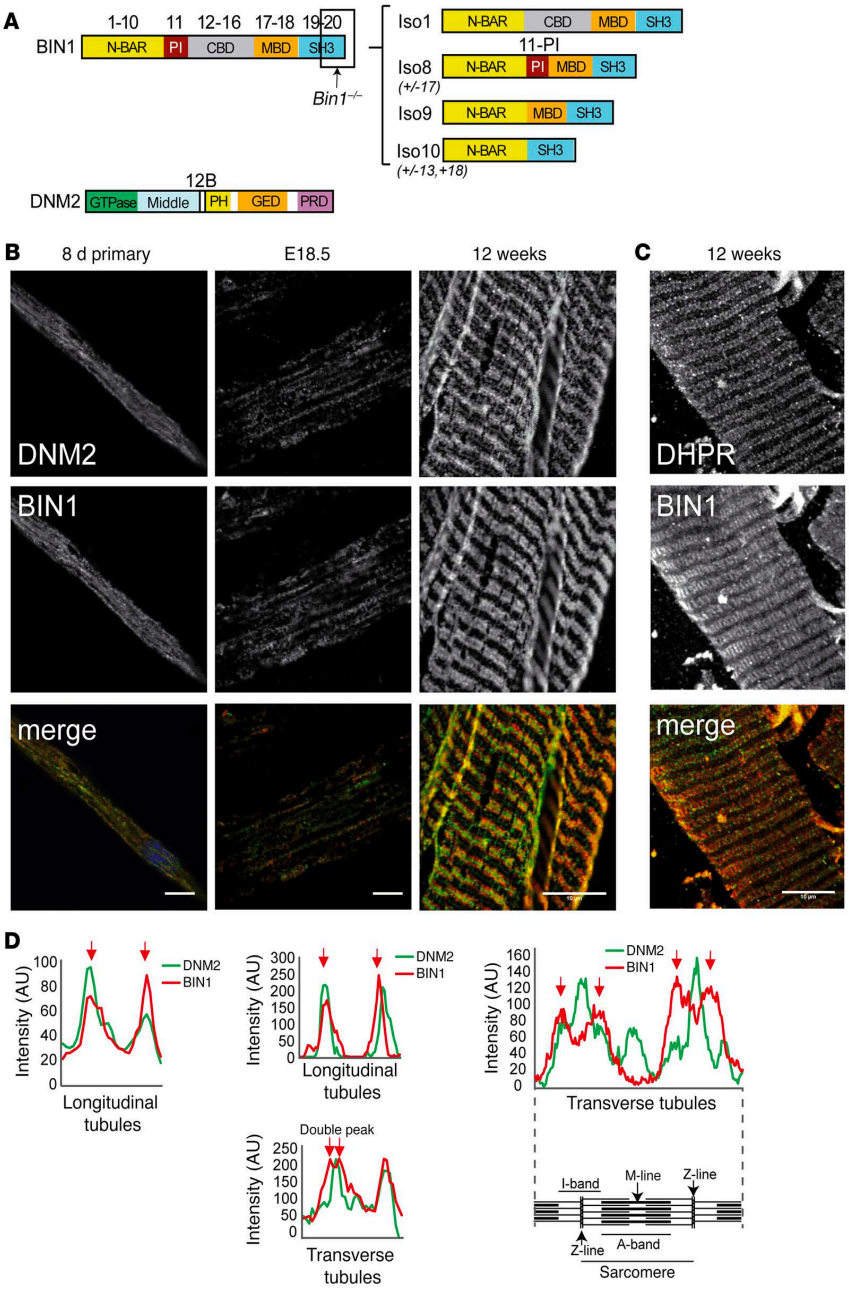


Figure 4. BIN1 and DNM2 in skeletal muscle development. (**A**) BIN1 and DNM2 protein domains; corresponding exons and isoforms are shown. N-BAR, N-terminal amphipathic helix and Bin-amphiphysin-Rvs domain; PI, phosphoinositide-binding domain; CBD, clathrin-binding domain; MBD, MYC-binding domain; SH3, Src homology domain; PH, pleckstrin homology domain; GED, GTPase effector domain. Region targeted by exon 20 *Bin1*$^{-/-}$ mice is indicated. Position of peptides encoded by alternative exons 11 and 12B indicated (not to scale). Predominant BIN1 isoforms are depicted on the right. Iso1 (brain), Iso8 (skeletal muscle), Iso9 (ubiquitous), Iso10 (ubiquitous, cardiac muscle) (adapted from ref. 24). (**B**) Immunofluorescence staining of primary myotubes (differentiated for 8 days [8d]) and murine muscles at embryonic day 18.5 (E18.5) and in adult (12 weeks) from WT mice. E18.5 muscles have longitudinal (predominant in this image) or transversal triads. DNM2 (upper panel, green in merge) and BIN1 (middle panel, red in merge) immunolabeling is shown. Scale bars: 10 μm. (**C**) Immunofluorescence staining of semi-thin (200 μm) sections from WT mice, DHPR (upper panel, red in merge), and BIN1 (middle panel, green in merge). Scale bar: 10 μm. (**D**) Intensity scans spanning 1 complete sarcomere from the above images.

tioning was noted (Figure 3D). In adult *Bin1*$^{-/-}$ *Dnm2*$^{+/-}$ mice, localization of DHPR (T-tubule), RYR1 (junctional sarcoplasmic reticulum), and SERCA (longitudinal sarcoplasmic reticulum) was normal on both longitudinal and transversal sections, indicating no disruption of the triads (Figure 3B and Supplemental Figure 6). Caveolin 3 (CAV3) and dysferlin are localized at the T-tubule during muscle development and regeneration, and at the sarcolemma in nonregenerating mature muscle (28). CAV3 and dysferlin immunolabeling was positive at the sarcolemma in *Bin1*$^{-/-}$ *Dnm2*$^{+/-}$ and WT mice, supporting normal development and maintenance of the T-tubules (Figure 3C and Supplemental Figure 6). Triads were well formed, with normal membrane shape, and the number of detectable T-tubules per sarcomere was equivalent to WT (Figure 3, D and E). As triad structures support calcium flux within muscle fibers, we determined if intracellular calcium levels are altered in the absence of BIN1. As *Bin1*$^{-/-}$ mice did not survive past day 1, we analyzed primary myoblasts derived from E18.5 *Bin1*$^{-/-}$ mice. At this immature stage of muscle development, no defects in resting

Table 2. Expression of *Bin1* and *Dnm2* isoforms detected at various stages of muscle differentiation

Gene	Exon	Myoblasts	Myotubes (day 8)	E18.5	Adult muscle
Bin1	11	n.d.	96%	86%	100%
Dnm2	12B	35%	44%	23%	71%

Isoforms were identified by RT-PCR followed by cDNA cloning and sequencing. The percentage of clones for each isoform is indicated (n > 30 clones per muscle sample). n.d., not determined.

cytoplasmic calcium were detected in myoblasts from *Bin1*$^{-/-}$ mice (Supplemental Figure 5C). In addition, caffeine-stimulated calcium release from the sarcoplasmic reticulum (mediated by RYR1) was not altered (Supplemental Figure 5D), indicating no defect in calcium storage or handling in myoblasts lacking BIN1. Overall, these results show that while BIN1 defect leads to neonatal lethality from a primary skeletal muscle alteration, decreased expression of DNM2 rescues the lifespan of the animals and associates with normal T-tubule maturation and maintenance compatible with normal muscle force and animal behavior.

BIN1 and DNM2 achieve tissue-specific isoforms during muscle maturation. *BIN1* and *DNM2* are ubiquitously expressed. To tackle the molecular basis of their muscle specificity, their RNA isoforms were identified by RT-PCR, cDNA cloning, and sequencing during muscle cell maturation in culture, at late embryogenesis (E18.5) and in adult muscle. It was shown previously that *BIN1* has at least 10 different splicing isoforms, with iso8 containing the PI-binding domain (exon 11, iso8, Figure 4A) that is highly expressed in skeletal muscle (3, 7, 12, 29, 30). BIN1-iso8 is highly expressed in myotubes differentiated for 8 days, and mouse E18.5 and adult muscles (80%–100% of isoforms detected) (Table 2), while it was barely present in undifferentiated myoblasts (7), identifying BIN1-iso8 as the main isoform expressed throughout muscle development. Moreover, mining GTEx human expression data found that BIN1-iso8 was skeletal muscle–specific where it represents 99.6% of isoforms found in adult (Table 3) (31).

Four transcripts of *DNM2* have been previously characterized (32). In addition, we detected the presence of an in-frame exon located between exons 12 and 13, consisting of 30 nucleotides coding for the predicted murine protein sequence CFYTEELVTG, which we named exon 12B (Figure 4A). Inclusion of exon 12B (DNM2+12B) increased from 35% in myoblasts to 44% in differentiated myotubes, and throughout muscle development from 23% (E18.5) to 71% in adult muscle (Table 2). *DNM2* exon 12B is specific for skeletal muscle among 43 human tissues (Table 3) (31). Altogether, the data show that while *BIN1* and *DNM2* are ubiquitously expressed, they achieve specific muscle isoforms during muscle maturation and in adulthood, through alternative splicing.

DNM2 localization correlates with T-tubule maturation. Inclusion of the PI-binding domain in BIN1 increases its membrane tubulation properties (3), while BIN1 alteration or skipping of this muscle-specific PI-binding domain correlates with T-tubule defects, supporting the notion that BIN1 participates in T-tubule biogenesis (11, 12, 24, 27, 33). During muscle development, forming T-tubules initially have a longitudinal orientation and are then reoriented to their final transverse orientation during the first 3 weeks postnatally in mice (34). To correlate the appearance of BIN1 and DNM2 muscle-specific isoforms with muscle maturation, localization experiments were performed. At E18.5, tubules appear mixed in localization with some fibers exhibiting longitudinal or immature localization (represented in Figure 4B) and others exhibiting transversal or mature orientation (representative image in Supplemental Figure 5). In myotubes and some E18.5 muscle fibers, BIN1 and DNM2 colocalized extensively on longitudinal tubules (Figure 4, B and D). In adult muscle, BIN1 localized on transversal T-tubules with the voltage-dependent calcium channel DHPR (Figure 4C), while DNM2 staining was more intense at the Z-line with α-actinin (Figure 3A) and only partially overlapped with BIN1 at the edge of the I-band (Figure 4, B–D). In the absence of BIN1, DNM2 transversal localization was not perturbed, as a transverse staining pattern was also observed in both *Bin1*$^{-/-}$ and *Bin1*$^{-/-}$ *Dnm2*$^{+/-}$ muscles (Figure 3A and Supplemental Figure 5B), indicating that DNM2 localization at the I-band does not require BIN1. These results indicate that BIN1 and DNM2 may function together in muscle maturation and that increased inclusion of exon 12B in DNM2 correlates with its relocalization away from T-tubules, independent of BIN1 expression.

BIN1 inhibits the GTPase activity of the DNM2 immature muscle isoform. The expression of the DNM2 skeletal muscle exon 12B is increased throughout skeletal muscle development (Figure 4 and Table 2), and its corresponding peptide is predicted to localize between the pleckstrin homology (PH) lipid-binding domain and the stalk in the dynamin structure (Figure 5A). We first determined if lipid binding was affected by the inclusion of this exon. Full-length purified recombinant DNM2 proteins with or without the exon 12B peptide were produced (Supplemental Figure 7). Cosedimentation assays were performed in the presence of liposomes and confirmed that the ubiquitous isoform of DNM2 (–12B)

Table 3. Number of exon bridging reads over total sequence reads identified in GTEx for BIN1 and DNM2 muscle-specific exons represented in Figure 4A

	Exon	Muscle			Brain		Nerve
RPKM total (%)		Skeletal	Cardiac	Spinal cord	Cerebellum	Cortex	Tibial
BIN1	11	3,326/3,339 (99%)	5/34 (15%)	1/519 (0%)	1/266 (0%)	2/344 (0%)	6/300 (2%)
DNM2	12B	27/111 (24%)	3/151 (2%)	0/200 (0%)	0/84 (0%)	0/83 (0%)	0/176 (0%)

RPKM, reads per kilobase per million mapped reads.

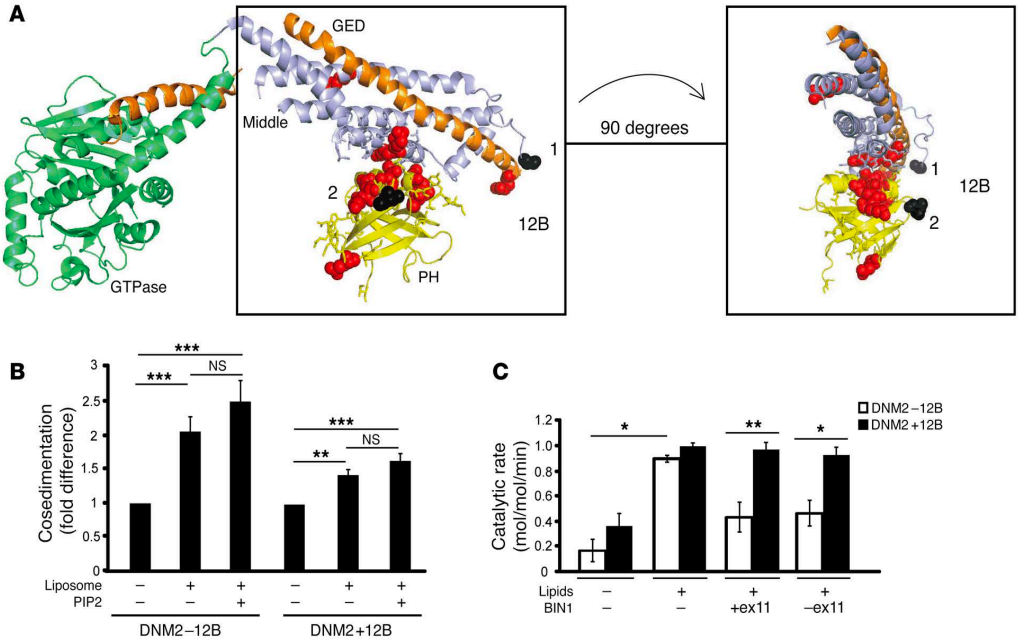


Figure 5. BIN1 inhibits DNM2 in an isoform-dependent manner. (**A**) Crystal structure model of nucleotide-free human dynamin 1 (adapted from Faeber et al., ref. 52) using PyMOL. The GTPase domain (green), middle domain (light blue), and GTPase effector domain (GED, orange) forming the stalk, and the PH domain (yellow), are depicted, with the sites of DNM2 mutations linked to CNM indicated (red). The peptide encoded by 12B in human (CYYTEQLVTC) spans from position 497 (black 1), followed by 18 unresolved amino acids, and then amino acid 518 (black 2). (**B**) Cosedimentation assays were performed with recombinant proteins to determine protein binding (in pellet fraction) relative to total protein (pellet+soluble, see Supplemental Figure 7 for raw data), in the presence of liposomes and PIP2. Results are represented as a fold difference versus DNM2 alone. (**C**) Malachite green assay with DNM2 (±12B) and BIN1 (+exon 11 [Iso8] and –exon 11 [Iso9]) isoforms, with DNM2/BIN1 at a ratio of 1:4. Brain polar lipids with additional 5% PIP2 were used. Results are shown as catalytic rate (mol/mol/min). Results in **B** and **C** are an average of 2 (**C**) or 4 (**B**) independent experiments. Graph represents the mean + SEM. One-way (**B** and **C**) or 2-way (**C**) ANOVA test was used as described in the Methods section. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$.

binds Folch liposomes derived from bovine brain, both in the presence or absence of 5% additional phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) (Figure 5B), as previously shown for DNM2 (35). The skeletal muscle–specific isoform of DNM2 (+12B) can also bind liposomes with or without PIP2 (Figure 5B).

While previous in vitro or in cellulo studies suggested that BIN1 recruits and activates dynamins at membranes for endocytosis, our in vivo rescue data support the hypothesis that BIN1 is rather a negative regulator of DNM2 activity in skeletal muscle. To assess if BIN1 directly inhibits DNM2, we measured GTP hydrolysis by DNM2. Firstly, the GTPase activity of the ubiquitous DNM2-12B was strongly activated by lipids, as previously known (36). Here we show that the DNM2+12B isoform is also activated with lipids (Figure 5C and Supplemental Figure 7). Strikingly, addition of BIN1 with or without exon 11 reduced DNM2-12B activity but did not impact DNM2+12B activity, indicating that BIN1 inhibits GTP hydrolysis by the ubiquitous and predominantly skeletal muscle developmental DNM2 isoform, but not the muscle-specific adult isoform. Thus, muscle maturation correlates with the appearance and predominance of a muscle-specific DNM2 isoform (+12B) with decreased regulation by BIN1. Taken together with the subcellular localization data, it suggests that BIN1 inhibits DNM2 activity during muscle maturation, while the adult DNM2 muscle-specific isoform is uncoupled from BIN1. As BIN1 appears to regulate the embryonic DNM2 isoform but not the adult muscle form, it suggests that adult deletion of *Bin1* may not be lethal. Indeed, we found that contrary to embryonic knockout of *Bin1*, knockout of *Bin1* in adult skeletal muscles, using the inducible Cre recombinase expression system, is not lethal (Supplemental Figure 8), supporting the concept that BIN1 is essential for skeletal muscle development but less for muscle maintenance.

Discussion

The ubiquitous BIN1 and DNM2 proteins are well known to participate in membrane remodeling during endocytosis, and in vitro data suggested that amphiphysin proteins recruit and activate dynamins (37). Conversely, we found in this study an antagonistic balance between BIN1 and DNM2, supporting that BIN1 is a negative regulator of DNM2 in vivo, at least in skeletal muscle. This underlines that studying regulatory mechanisms in vivo in relevant tissues where specific isoforms are expressed gives a detailed and somehow unexpected view of these mechanisms. These data call for further analysis of dynamin regulation by amphiphysins in additional physiological contexts. Whether this is also true for dynamin 1, the brain dynamin implicated in synaptic vesicle replenishment (38, 39), remains to be determined.

During muscle development BIN1 and DNM2 strongly colocalize (Figure 4). At this stage the GTPase activity of the major

DNM2 isoform is inhibited by BIN1 (Figure 5). The appearance and enrichment of muscle-specific BIN1 and DNM2 isoforms correlate with the maturation of T-tubules, and is accompanied by a decreased sensitivity of DNM2 GTPase activity to BIN1 and the relocalization of DNM2 to the actin-rich I-band partly away from the triad. Thus, for normal muscle formation, BIN1 would partially inhibit DNM2 function on nascent T-tubules. BIN1 and DNM2 muscle-specific exons encode amino acids that are located within or close to regions essential for intramolecular regulation; the PI-binding domain binds the SH3 domain in BIN1 (40) and for DNM2 the PH-stalk domain interface mediates assembly of dimers (37). Thus, BIN1 and DNM2 achieve muscle-specific functions during muscle maturation. These findings indicate for the first time to our knowledge a molecular explanation for the muscle specificity of CNMs. As *Bin1*$^{-/-}$ *Dnm2*$^{+/-}$ mice develop normally to adulthood with well-organized triads without BIN1, it is rather the BIN1-DNM2 balance that is important for muscle maturation. Potentially, unregulated DNM2, due either to BIN1 alteration or DNM2 mutations, would compromise this BIN1-DNM2 balance and subsequently muscle maturation/maintenance, leading to CNMs.

Here we show that reducing DNM2 in *Bin1*$^{-/-}$ mice rescues its neonatal lethality, providing a potential therapeutic approach for patients with BIN1 mutation. We recently discovered that reduction of DNM2 can rescue the lifespan and several pathological features of a murine model of myotubular myopathy, which is the X-linked form of CNM due to mutations in the PI phosphatase MTM1 (20, 41). Altogether, these results indicate that both MTM1 and BIN1 act upstream of DNM2. Indeed, BIN1 can bind to MTM1 and also to DNM2, and BIN1-CNM mutations interfere with its ability to interact with MTM1 and DNM2 (7, 42), indicating the importance of this pathway in muscle and disease. Moreover, DNM2 downregulation becomes a potential strategy to rescue several myopathy forms (linked to either MTM1 or BIN1 mutations). This adds credit to the concept of cross-therapy where phenotypes due to loss of a CNM protein (MTM1 or BIN1) are rescued by downregulating another CNM protein (DNM2). As BIN1 was also implicated in several cancers, arrhythmia, and late-onset Alzheimer disease (43), the epistasis and potential therapeutic approach demonstrated here for myopathies may trigger novel research directions and therapeutic developments for these common diseases.

In conclusion, we show here that reduction of DNM2 can rescue the neonatal lethality due to BIN1 alteration in mice and that the balance and specific regulation between muscle-specific isoforms of BIN1 and DNM2 is necessary for perinatal muscle maturation. These findings highlight that BIN1 is a negative regulator of DNM2 in vitro and in vivo, at least in muscle maturation, and support DNM2 downregulation as a therapeutic strategy to rescue several myopathy forms.

Methods

Materials

Primary antibodies used were mouse anti-DHPRα_1 ($Ca_v1.1$) subunit (MA3-920; Affinity Bioreagents), α-actinin (EA-53, Sigma-Aldrich), caveolin-3 (clone 26, BD Biosciences), BIN1 (C99D, Upstate), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, MAB374; Chemicon). Rabbit anti-DNM2 antibodies (R2680 and R2865) (18) and anti-BIN1 (R2405) (7) were made onsite at the polyclonal antibody facility of the IGBMC. Alexa Fluor–conjugated secondary antibodies were purchased from Invitrogen (Alexa Fluor 488 [A11001 and A11008] and Alexa Fluor 594 [A11005 and A11012]). Secondary antibodies against mouse and rabbit IgG, conjugated with horseradish peroxidase (HRP) were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (catalog 115-035-146 and 111-036-045). An ECL kit was purchased from Pierce. Plasmids, Sepharose, and PreScission for in vitro enzymatic assays were purchased from GE Healthcare, and lipids were purchased from Avanti Polar Lipids. Indo-1 calcium indicator was purchased from Thermo Fisher Scientific.

Primary cell culture and differentiation

Primary myoblasts from WT newborn mice were prepared using a protocol adapted from De Palma et al. (44). After hind limb muscle isolation, muscles were minced and digested for 1.5 hours in PBS containing 0.5 mg/ml collagenase (Sigma-Aldrich) and 3.5 mg/ml Dispase (Gibco). Cell suspensions were filtered through a 40-μm cell strainer and preplated in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Gibco) with 10% FCS (Gibco), to discard the majority of fibroblasts and contaminating cells, and then incubated for 3 hours. Nonadherent myogenic cells were collected and plated in IMDM with 20% FCS and 1% Chicken Embryo Extract (MP Biomedical) onto 1:100 Matrigel Reduced Factor (BD) in IMDM-coated fluorodishes. Differentiation was triggered by switching the medium to IMDM with 2% horse serum and 24 hours later a thick layer of matrigel (1:3 in IMDM) was added. For immunofluorescence experiments, myotubes were treated with 80 ng/ml agrin, and the medium was changed every 2 days. Cells in culture were prepared, fixed, and stained with antibodies against BIN1-C99D (1:50) and DNM2-R2680 (1:200).

Primary cell culture and calcium measurements

Primary myoblasts from WT, *Bin1*$^{+/-}$, or *Bin1*$^{-/-}$ mice at E18.5 were prepared using a protocol adapted from De Palma et al. (44) as described above, with minor modifications. Cells were incubated for 1.5 hours. Nonadherent myogenic cells were collected and plated in IMDM with 20% FCS and 1% Chicken Embryo Extract onto 1:100 Matrigel Reduced Factor in IMDM-coated coverslips. Once cells reached 50% confluence, they were incubated for 30 minutes with Indo-1 calcium indicator (5 μM), and then washed and incubated for 30 minutes in medium containing 2 mM calcium. Samples were viewed using a laser scanning confocal microscope (TCS SP2; Leica Microsystems). Baseline measurements were obtained by excitation at 338 nm, and then the ratio of emission wavelengths was measured (405/485 nm, every 2 seconds). Following this, the medium was replaced with calcium-free medium containing EGTA (1 mM) for 5 minutes, and then caffeine was added (25 mM) to activate RYR1-mediated release of calcium from the sarcoplasmic reticulum. The ratio of emission wavelengths was measured (405/485 nm, every 2 seconds).

RT-PCR and isoform detection

Total RNA was extracted from primary myoblasts, differentiated myotubes, and mouse skeletal muscle (E18.5 and adult), using TRIzol (TRI Reagent, Molecular Research Center). Reverse transcription (RT) was performed using Superscript 11 reverse transcriptase (Invitrogen) with 1–2 μg of total RNA, and the presence of BIN1/DNM2 isoforms was detected using our previously described protocol (24). Primers used

for PCR amplification were 5′BIN1, ATGGCAGAGATGGGGAGCAAGG; 3′BIN1, TCACTGCACCCGCTCTGTAAAATT; 5′DNM2, CTAGAGTTGTCTGGTGGAGC; and 3′DNM2, GCTTCATGTCCAACAAGCACG. More than 30 cDNA clones were sequenced for each sample. The GTEx database was analyzed for the presence of BIN1 and DNM2 isoforms in various tissues (www.gtexportal.org; latest version V6 dbGaP Accession phs000424.v6.p1) (31).

Immunofluorescence assays

Primary cells were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 20 minutes, permeabilized with Triton X-100 (0.2% in PBS), and nonspecific sites were blocked with 10% FCS and 0.1% Triton X-100 in PBS. Primary antibodies were added overnight at 4°C in 0.1% Triton X-100 and 3% FCS in PBS. The following antibodies were used: anti-BIN1 (clone C99D, Sigma-Aldrich) and anti-dynamin 2 (R2680, IGBMC). These antibodies were revealed by employing anti-rabbit Alexa Fluor 594–conjugated or anti-mouse Alexa Fluor 488–conjugated secondary antibodies (Invitrogen). Nuclei were stained with Hoechst 33528 (Sigma-Aldrich) and samples were mounted in FluorSave reagent (Calbiochem).

Protein purification and GTPase activity assay

DNM2+12b was generated by primer-directed PCR mutagenesis from the WT construct using primers (hsDNM12B forward, 5′CTGTTACTATACTGAGCAGCTGGTGACCTGTGCCCAGCAGAGGAGCACGC3′; hsDNM12B reverse, 5′CAGGTCACCAGCTGCTCAGTATAGTAACAGTTGGCAAACCCGATGAAGTC3′) and recombinant DNM2 proteins were produced from pVL1392 plasmids in SF9 cells with the baculovirus system as described previously (45). Briefly, a transfection was performed with DNM2(±12B) plasmids to produce viruses. SF9 cells were infected with viruses and then grown for 3 days at 27°C, and then centrifuged at 2,000 *g* for 5 minutes. DNM2 recombinant proteins were purified with amphiphysin-SH3 bound to Glutathione-Sepharose 4B beads (GE Healthcare) as previously described (46). BIN1 recombinant protein was produced from pGEX6P1 plasmid in *E. coli* BL21. *E. coli* producing BIN1 were induced with IPTG (0.5 mM) for 3 hours at 37°C, centrifuged at 7,500 *g*, and then proteins were purified using Glutathione Sepharose 4B beads. The GST tag was cut by PreScission enzyme on the beads and the flow through was recovered. DNM2 and BIN1 recombinant proteins were used at a ratio of 1:1 or 1:4 as described (DNM2/BIN1). A malachite green assay for GTP hydrolysis using lipids (95% Brain Polar Lipid Extract and 5% PIP2, both Avanti Polar Lipids) was performed as described previously (47) with a reaction time of 5 minutes at 37°C. Two controls were used for this experiment: one with GTP, liposomes, and buffer (no dynamin); and one with dynamin, liposomes, and buffer (no GTP). Both controls produced zero values.

Cosedimentation assay

This assay was performed as described previously (48). Briefly, 2 μM DNM2 recombinant proteins were mixed with liposomes with or without PIP2 (PE/PC, 80:20, total 1 mg/ml) for 15 minutes at room temperature. High-speed centrifugation was performed to separate pellet and supernatant. The pellet was resuspended and both pellet and supernatant were run in an SDS-PAGE gel. Protein bands were visualized after staining the gel with 2,2,2-trichloroethanol (TCE, Sigma-Aldrich) following activation by UV, allowing labeling of the Trp residues in the DNM2 protein. The ImageLab software from Bio-Rad was used for image acquisition and quantification.

Generation of mouse lines

Bin1 exon 20–KO mice. The targeting vector was created with LoxP sites flanking exon 20 in a *Bin1* exon 20–KO mouse line (referred to here as *Bin1*$^{-/-}$) (Figure 1 and Figure 4), linearized, and electroporated into embryonic stem (ES) cells. Recombinant ES cells were injected into C57BL/6 blastocysts that were implanted in pseudopregnant females and germline transmission determined. Recombination was triggered using the CMV promoter. The mice were bred on a B6J background.

Dnm2 heterozygous mice. The creation of *Dnm2*$^{+/-}$ mice deleted for exon 8 was described previously (20).

Bin1$^{-/-}$ *Dnm2*$^{+/-}$ *mice*. Female heterozygous *Bin1*$^{+/-}$ mice were bred with male *Dnm2*$^{+/-}$ mice to produce 4 possible genotypes in male offspring: *Bin1*$^{+/+}$ *Dnm2*$^{+/+}$ (WT), *Bin1*$^{+/+}$ *Dnm2*$^{+/-}$, *Bin1*$^{+/-}$ *Dnm2*$^{+/+}$, and *Bin1*$^{+/-}$ *Dnm2*$^{+/-}$. In the next step, male or female *Bin1*$^{+/-}$ *Dnm2*$^{+/-}$ mice were crossed with a female or male *Bin1*$^{+/-}$ *Dnm2*$^{+/+}$. This cross yielded 6 possible genotypes: *Bin1*$^{+/+}$ *Dnm2*$^{+/+}$ (WT), *Bin1*$^{+/+}$ *Dnm2*$^{+/-}$, *Bin1*$^{+/-}$ *Dnm2*$^{+/+}$, *Bin1*$^{+/-}$ *Dnm2*$^{+/-}$, *Bin1*$^{-/-}$ *Dnm2*$^{+/+}$, and *Bin1*$^{-/-}$ *Dnm2*$^{+/-}$ (Figure 1B). We analyzed female and male *Bin1*$^{-/-}$ *Dnm2*$^{+/-}$ mice and compared them to the WT littermates.

Animal experiments

Animals were housed in a temperature-controlled room (19°C–22°C) with a 12-hour light/dark cycle. Mice were weighed weekly until 1 year of age. Mice were humanely killed when required by CO_2 inhalation followed by cervical dislocation, according to national and European legislations on animal experimentation. Muscles and other tissues were dissected and frozen in nitrogen-cooled isopentane and liquid nitrogen for histological and immunoblot assays, respectively. For dissection of E18.5 mice, animals were sacrificed by decapitation and pups were dissected. Hind limbs were snap frozen in liquid nitrogen–cooled isopentane and prepared for histology and immunofluorescence as described below.

Phenotyping of *Bin1*$^{-/-}$ and *Dnm2*$^{+/-}$ mice

Mice aged 10–15 weeks were phenotyped under the EUMODIC phenotyping program (http://www.eumodic.eu/) with results made publicly available (http://www.europhenome.org/). In both cases male and female mutant mice were comparable to the WT littermates. Blood chemistry, ECG measurements, Dexascan, and qNMR presented here for male mice (n = minimum 10 per group) were performed as part of pipelines 1 and 2 of the EUMODIC phenotyping program, at the Institut Clinique de la Souris (ICS, Illkirch, France; www.ics-mci.fr).

Grip (2 and 4 paws), hang, and rotarod tests

Grip strength tests were performed by placing the 2 front paws or all 4 paws on the grid of a dynamometer (Bioseb) and mice were pulled by the tail in the opposite direction. The maximal strength exerted by the mouse before losing grip was recorded. Three trials per mouse were performed, with 30 seconds of rest between trials (2-paws test, n = minimum 5 mice per group; 4-paws test, n = 5–7 mice per group). For the hanging test, mice were suspended from a cage lid for a maximum of 60 seconds. The time when the mouse fell off the cage was recorded for each trial. Three trials per mouse were performed. In the rotarod test, coordination and whole-body muscle strength were tested using an accelerated rotating rod test (Panlab). Mice were placed on the rod, which accelerated from 4 to 40 rpm during 5 minutes. Three trials per day, with 5 minutes of rest between trials were performed for day

1 (training day), and then 4 days which were recorded. Animals were scored for their latency to fall (in seconds). The mean of the 3 trials was calculated for each experiment listed above (n = 5–7 mice per group).

TA muscle contractile properties

Muscle force measurements were evaluated by measuring in situ muscle contraction in response to nerve and muscle stimulation, as described previously with a force transducer (Aurora Scientific) (18, 49). Results from nerve stimulation are shown (n = 5–11 mice per group). Fatigue was measured as time taken to reach 50% of the maximum force produced. After contractile measurements, the animals were killed by cervical dislocation. TA muscles were then dissected and weighed to determine specific maximal force.

Western blotting

Mouse muscles were minced and homogenized on ice for 3 times 30 seconds (Ultra Turrax homogenizer) in 10 times the weight/volume of 1% NP-40 Tris-Cl buffer, pH 8, then extracted for 30 minutes at 4°C. Protein concentration was determined using a DC Protein Assay kit (Bio-Rad), and lysates analyzed by SDS-PAGE and Western blotting on nitrocellulose membranes. Primary antibodies used were DNM2-R2680 (1:500), DNM2-R2865 (1:500), BIN1-R2405 (1:1,000), and GAPDH (1:10,000); secondary antibodies were anti-rabbit HRP or anti-mouse HRP (1:10,000). Western blot films were scanned and band intensities were determined using ImageJ software (NIH, http://rsb.info.nih.gov/ij/, 1997–2009). Densitometry values were standardized to corresponding total GAPDH values and expressed as a fold difference relative to the indicated control (n = 3–5 mice per group).

Histological and immunofluorescence analysis of skeletal muscle

Longitudinal and transverse cryosections (8 μm) of mouse skeletal muscles were prepared, fixed, and stained with antibodies against DHPRα_1 (1:100), α-actinin (1:1,000), caveolin-3 (1:1,000); DNM2-R2680 (1:200), and BIN1-C99D (1:100). Samples were viewed using a laser scanning confocal microscope (TCS SP8; Leica Microsystems). Air-dried transverse sections were fixed and stained with H&E or for SDH, and image acquisition performed with a slide scanner NanoZoomer 2 HT equipped with the fluorescence module L11600-21 (Hamamatsu Photonics) or a DMRXA2 microscope (Leica Microsystems Gmbh). Cross-sectional area (CSA) was analyzed in H&E-stained sections from TA mouse skeletal muscle, using FIJI image analysis software. CSA (μm^2) was calculated (>500 fibers per mouse) from 4–7 mice per group. The percentage of TA muscle fibers with centralized or internalized nuclei was counted in more than 500 fibers from 4–6 mice using the cell counter plugin in ImageJ.

Transmission electron microscopy

TA muscle biopsies were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) and processed as described previously (18, 50). Triad structures were identified on longitudinal sections of muscle and the number of triads per sarcomere was quantified. The ratio of triads/sarcomere was calculated by dividing number of triads clearly identified by the total number of sarcomeres present in the image, as described previously (51). Forty to 80 triads were counted per mouse, 3 mice/genotype.

Microscopy and analysis

All microscopy was performed at the IGBMC Imaging Centre. All samples for microscopy were mounted in Fluorsave reagent (Merck) and viewed at room temperature. Light microscopy was performed using a fluorescence microscope (DM4000; Leica microsystems) fitted with a color CCD camera (CoolSNAP CF color, Photometrics). Confocal microscopy was performed using a confocal laser scanning microscope (TCS SP2 or SP5; Leica Microsystems). ImageJ and FIJI analysis software were used for image analysis.

Statistics

Statistical analysis was performed using the unpaired 2-tailed Student's t test unless stated otherwise. When stated, a 1- or 2-way ANOVA test was used with Bonferroni or Dunn's Multiple Comparison post hoc test. P values less than 0.05 were considered significant.

Study approval

Animal experimentation was approved by the institutional ethical committee Com'Eth IGBMC-ICS (2012-128, 2013-034).

Author contributions

BSC, IP, and JL designed the study and analyzed the data. BSC, IP, HT, ASN, FH, CK, A. Rabai, SF, and BR performed experiments. BSC, JL, and A. Roux supervised the study. BSC, IP, and JL wrote the manuscript.

Acknowledgments

We thank Arnaud Ferry (UMRS974, Paris, France) and Xenia Massana, Catherine Koch, Julien Becker, Jean-Luc Weickert, Nadia Messaddeq, Olivia Wendling, Hugues Jacobs, Marc Koch, and Pascal Kessler from the IGBMC for excellent technical assistance; and the animal house, histology platform and Imaging Centre of the IGBMC for support. This study was supported by INSERM, CNRS, University of Strasbourg, the Agence Nationale de la Recherche (14-CE12-0009), SATT Conectus Alsace (2014), Association Francaise contre les Myopathies (grant 15352), Myotubular Trust and Sparks - The Children's Medical Research Charity, and ANR-10-LABX-0030-INRT, a French State fund managed by the Agence Nationale de la Recherche under the frame program Investissements d'Avenir ANR-10-IDEX-0002-02.

Address correspondence to: Belinda S. Cowling or Jocelyn Laporte, IGBMC, 1 rue Laurent Fries, 67404 Illkirch, France. Phone: 33.0.3.88.65.34.15; Email: belinda@igbmc.fr (B.S. Cowling). Phone: 33.0.3.88.65.34.12; Email: jocelyn@igbmc.fr (J. Laporte).

1. Towler MC, Kaufman SJ, Brodsky FM. Membrane traffic in skeletal muscle. *Traffic*. 2004;5(3):129–139.
2. Cowling BS, Toussaint A, Muller J, Laporte J. Defective membrane remodeling in neuromuscular diseases: insights from animal models. *PLoS Genet*. 2012;8(4):e1002595.
3. Lee E, et al. Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science*. 2002;297(5584):1193–1196.
4. David C, McPherson PS, Mundigl O, de Camilli P. A role of amphiphysin in synaptic vesicle endocytosis suggested by its binding to dynamin in nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(1):331–335.
5. Bitoun M, et al. Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nat Genet*. 2005;37(11):1207–1209.

6. Böhm J, et al. Adult-onset autosomal dominant centronuclear myopathy due to BIN1 mutations. *Brain*. 2014;137(Pt 12):3160–3170.
7. Nicot AS, et al. Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy. *Nat Genet*. 2007;39(9):1134–1139.
8. Ravenscroft G, Laing NG, Bönnemann CG. Pathophysiological concepts in the congenital myopathies: blurring the boundaries, sharpening the focus. *Brain*. 2015;138(Pt 2):246–268.
9. Sakamuro D, Elliott KJ, Wechsler-Reya R, Prendergast GC. BIN1 is a novel MYC-interacting protein with features of a tumour suppressor. *Nat Genet*. 1996;14(1):69–77.
10. Peter BJ, et al. BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science*. 2004;303(5657):495–499.
11. Razzaq A, et al. Amphiphysin is necessary for organization of the excitation-contraction coupling machinery of muscles, but not for synaptic vesicle endocytosis in Drosophila. *Genes Dev*. 2001;15(22):2967–2979.
12. Böhm J, et al. Altered splicing of the BIN1 muscle-specific exon in humans and dogs with highly progressive centronuclear myopathy. *PLoS Genet*. 2013;9(6):e1003430.
13. Faelber K, et al. Oligomerization of dynamin superfamily proteins in health and disease. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2013;117:411–443.
14. Praefcke GJ, McMahon HT. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(2):133–147.
15. Kenniston JA, Lemmon MA. Dynamin GTPase regulation is altered by PH domain mutations found in centronuclear myopathy patients. *EMBO J*. 2010;29(18):3054–3067.
16. Wang L, Barylko B, Byers C, Ross JA, Jameson DM, Albanesi JP. Dynamin 2 mutants linked to centronuclear myopathies form abnormally stable polymers. *J Biol Chem*. 2010;285(30):22753–22757.
17. Chin YH, et al. Dynamin-2 mutations associated with centronuclear myopathy are hypermorphic and lead to T-tubule fragmentation. *Hum Mol Genet*. 2015;24(19):5542–5554.
18. Cowling BS, et al. Increased expression of wild-type or a centronuclear myopathy mutant of dynamin 2 in skeletal muscle of adult mice leads to structural defects and muscle weakness. *Am J Pathol*. 2011;178(5):2224–2235.
19. Liu N, et al. Mice lacking microRNA 133a develop dynamin 2–dependent centronuclear myopathy. *J Clin Invest*. 2011;121(8):3258–3268.
20. Cowling BS, et al. Reducing dynamin 2 expression rescues X-linked centronuclear myopathy. *J Clin Invest*. 2014;124(3):1350–1363.
21. Muller AJ, et al. Targeted disruption of the murine Bin1/Amphiphysin II gene does not disable endocytosis but results in embryonic cardiomyopathy with aberrant myofibril formation. *Mol Cell Biol*. 2003;23(12):4295–4306.
22. Hong T, et al. Cardiac BIN1 folds T-tubule membrane, controlling ion flux and limiting arrhythmia. *Nat Med*. 2014;20(6):624–632.
23. Miniou P, Tiziano D, Frugier T, Roblot N, Le Meur M, Melki J. Gene targeting restricted to mouse striated muscle lineage. *Nucleic Acids Res*. 1999;27(19):e27.
24. Toussaint A, et al. Defects in amphiphysin 2 (BIN1) and triads in several forms of centronuclear myopathies. *Acta Neuropathol*. 2011;121(2):253–266.
25. D'Alessandro M, et al. Amphiphysin 2 orchestrates nucleus positioning and shape by linking the nuclear envelope to the actin and microtubule cytoskeleton. *Dev Cell*. 2015;35(2):186–198.
26. Rao Y, Haucke V. Membrane shaping by the Bin/amphiphysin/Rvs (BAR) domain protein superfamily. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(24):3983–3993.
27. Tjondrokoesoemo A, et al. Disrupted membrane structure and intracellular Ca^{2+} signaling in adult skeletal muscle with acute knockdown of Bin1. *PLoS One*. 2011;6(9):e25740.
28. Klinge L, et al. Dysferlin associates with the developing T-tubule system in rodent and human skeletal muscle. *Muscle Nerve*. 2010;41(2):166–173.
29. Ramjaun AR, McPherson PS. Multiple amphiphysin II splice variants display differential clathrin binding: identification of two distinct clathrin-binding sites. *J Neurochem*. 1998;70(6):2369–2376.
30. Wechsler-Reya RJ, Elliott KJ, Prendergast GC. A role for the putative tumor suppressor Bin1 in muscle cell differentiation. *Mol Cell Biol*. 1998;18(1):566–575.
31. GTEx Consortium. Human genomics. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: multitissue gene regulation in humans. *Science*. 2015;348(6235):648–660.
32. Cao H, Garcia F, McNiven MA. Differential distribution of dynamin isoforms in mammalian cells. *Mol Biol Cell*. 1998;9(9):2595–2609.
33. Fugier C, et al. Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy. *Nat Med*. 2011;17(6):720–725.
34. Takekura H, Flucher BE, Franzini-Armstrong C. Sequential docking, molecular differentiation, and positioning of T-Tubule/SR junctions in developing mouse skeletal muscle. *Dev Biol*. 2001;239(2):204–214.
35. Bagatolli LA, Binns DD, Jameson DM, Albanesi JP. Activation of dynamin II by POPC in giant unilamellar vesicles: a two-photon fluorescence microscopy study. *J Protein Chem*. 2002;21(6):383–391.
36. Lin HC, Barylko B, Achiriloaie M, Albanesi JP. Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate-dependent activation of dynamins I and II lacking the proline/arginine-rich domains. *J Biol Chem*. 1997;272(41):25999–26004.
37. Daumke O, Roux A, Haucke V. BAR domain scaffolds in dynamin-mediated membrane fission. *Cell*. 2014;156(5):882–892.
38. Kokotos AC, Cousin MA. Synaptic vesicle generation from central nerve terminal endosomes. *Traffic*. 2015;16(3):229–240.
39. Farsad K, De Camilli P. Neurotransmission and the synaptic vesicle cycle. *Yale J Biol Med*. 2002;75(5-6):261–284.
40. Kojima C, et al. Regulation of Bin1 SH3 domain binding by phosphoinositides. *EMBO J*. 2004;23(22):4413–4422.
41. Tasfaout H, et al. Antisense oligonucleotide-mediated Dnm2 knockdown prevents and reverts myotubular myopathy in mice. *Nat Commun*. 2017;8:15661.
42. Royer B, Hnia K, Gavriilidis C, Tronchère H, Tosch V, Laporte J. The myotubularin-amphiphysin 2 complex in membrane tubulation and centronuclear myopathies. *EMBO Rep*. 2013;14(10):907–915.
43. Prokic I, Cowling BS, Laporte J. Amphiphysin 2 (BIN1) in physiology and diseases. *J Mol Med*. 2014;92(5):453–463.
44. De Palma C, et al. Nitric oxide inhibition of Drp1-mediated mitochondrial fission is critical for myogenic differentiation. *Cell Death Differ*. 2010;17(11):1684–1696.
45. Quan A, Robinson PJ. Rapid purification of native dynamin I and colorimetric GTPase assay. *Meth Enzymol*. 2005;404:556–569.
46. Kalia R, Talledge N, Frost A. Structural and functional studies of membrane remodeling machines. *Methods Cell Biol*. 2015;128:165–200.
47. Koutsopoulos OS, et al. Dynamin 2 homozygous mutation in humans with a lethal congenital syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2013;21(6):637–642.
48. Itoh T, Erdmann KS, Roux A, Habermann B, Werner H, De Camilli P. Dynamin and the actin cytoskeleton cooperatively regulate plasma membrane invagination by BAR and F-BAR proteins. *Dev Cell*. 2005;9(6):791–804.
49. Vignaud A, Hourde C, Medja F, Agbulut O, Butler-Browne G, Ferry A. Impaired skeletal muscle repair after ischemia-reperfusion injury in mice. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:724914.
50. Buj-Bello A, et al. The lipid phosphatase myotubularin is essential for skeletal muscle maintenance but not for myogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(23):15060–15065.
51. Amoasii L, et al. Phosphatase-dead myotubularin ameliorates X-linked centronuclear myopathy phenotypes in mice. *PLoS Genet*. 2012;8(10):e1002965.
52. Faelber K, et al. Crystal structure of nucleotide-free dynamin. *Nature*. 2011;477(7366):556–560.

4.4 Edition du génome *in vivo* (résultats préliminaires)

Afin d'établir la preuve de concept de l'inactivation ou la correction allèle spécifique de la mutation DNM2 R465W, j'ai croisé la souris KI *Dnm2*$^{R465W/+}$ avec la souris KI Cas9 homozygote (Platt, Chen et al. 2014) qui exprime la Cas9 de manière constitutive. La descendants KI *Dnm2*$^{R465W/+}$ expriment la Cas9. J'ai ensuite injecté en intramusculaire (tibialis antérieur ; TA) des AAV codant pour un guide ARN et la CFP et contenant la matrice de réparation. Malgré que la voie de l'HDR ne soit pas active dans les cellules post-mitotiques notamment les fibres musculaires, la correction des cellules satellites par cette voie reste envisageable. A l'âge de 8 semaines (5 semaines après les injections), j'ai prélevé le TA. Afin de quantifier les modifications de l'allèle muté, j'ai conçu des amorces qui n'amplifient que cet allèle vu qu'il présente un site loxP dans la séquence intronique après l'exon 11. Les produits de PCR ont été migrés sur un gel d'acrylamide 10% natif après formation d'hétéroduplexes avec des cycles de dénaturation-renaturation de l'ADN. La présence d'un mosaïcisme d'indels entraîne la formation d'hétéroduplexes (Figure 13C) qui migrent plus lentement que les homoduplexes à cause de l'angle ouvert formé entre les deux brins mésappariés. Ces produits de PCR ne présentent pas cet aspect de « smear » après migration sur gel d'agarose (Figure 13 A,B). En quantifiant l'intensité de ces bandes par rapport à l'intensité globale et après soustraction du fond non spécifique (souris injectées avec un AAV vide), j'ai pu évaluer de manière semi-quantitative le pourcentage des allèles mutés qui ont été modifiés par le système CRISPR/Cas9 (Tableau 2). Les résultats préliminaires montrent une efficacité des guides allèle-spécifiques variant de 13% à 46%. Celle du guide pan-allélique est de 18%.

Afin de déterminer la spécificité de ces guides, j'ai conçu des amorces qui sont perturbés par le site loxP (voir la publication 1 Figure supplémentaire S2) et qui n'amplifient que l'allèle WT. En utilisant la même technique de quantification des hétéroduplexes, j'ai pu évaluer les modifications de l'allèle WT (Figure 13 B,D). Les guides allèle-spécifiques ont entraîné des

modifications variant de 0,5% à 3,3%. Le ratio entre le taux de modification de l'allèle muté divisé sur celui de l'allèle WT reflète l'allèle spécificité du guide utilisé. Ce ratio est de 31 et 89 pour le guide C19 et de 6,5 et 9,21 pour le guide C20.

Ce ratio est de 1 pour le guide pan-allélique ce qui montre que ce guide cible de manière équivalente les 2 allèles.

Afin d'évaluer l'impact des indels sur l'expression de la DNM2, le taux de cette protéine a été quantifié par Western-blot (Figure 13E). En considérant la moyenne du taux de la DNM2 des TA injectés par des AAV vides comme référence, l'expression de DNM2 a été réduite de presque la moitié (43% à 69%) (Tableau 2) dans les TA injectés par les différents guides ARN.

5 Discussion et perspectives

5.1 Les myoblastes immortalisés comme modèle cellulaire pour étudier l'impact des mutations CNM-DNM2

Un des objectifs de mon projet est de décrire des phénotypes liés à la mutation DNM2 R465W et de tester l'efficacité et l'allèle-spécificité de l'outil CRISPR/Cas9 dans un contexte de mutation hétérozygote. J'ai ainsi immortalisé des myoblastes de souris WT et KI *Dnm2*$^{R465W/+}$ et établi des lignées stables. Ces lignées proviennent de clones isolés et donc présentent des caractéristiques homogènes. Ces lignées ont permis d'étudier l'impact de la mutation DNM2 R465W sur plusieurs processus cellulaires dans un contexte qui se rapproche du muscle, qui représente le tissu affecté dans la myopathie centronucléaire. Ces myoblastes se différentient en myotubes après 7 jours de différentiation et expriment les facteurs myogéniques ce qui suggère que l'immortalisation n'a pas affecté leur potentiel myogénique et leur capacité à fusionner en myotubes. L'immortalisation de cellules implique l'insertion de gènes dit oncogènes qui perturbent le cycle cellulaire et induisent le non-arrêt de la prolifération. Parmi ces gènes il y a le large antigène T du virus SV40 (T-Ag), Bmi et l'association du CDK4 (Cyclin-Dependent Kinase 4) et la télomérase (TERT). Le T-Ag est le gène d'immortalisation le plus utilisé. Le facteur T-Ag agit en se fixant au pRb et p53. Cependant, souvent les myoblastes immortalisés par ce gène perdent leur potentiel myogénique. Bmi inhibe l'expression des suppresseurs de tumeur p16 et p19Arf. La cycline D1 active la prolifération cellulaire en activant les kinases CDK4 et CDK6. En les phosphorylant, elle inactive la protéine Rb et active ainsi le facteur de transcription E2F qui active à son tour l'expression de gènes de la phase S. Dans les myoblastes primaires humains en culture, il faut associer le gène CDK4 au gène hTERT afin de neutraliser le raccourcissement des télomères. Cependant plusieurs études ont rapporté que les myoblastes de souris de laboratoire montrent de longs télomères avec une activité télomérase (TERT)

spontanée (Kipling 1997). Après les conseils du Dr. Anne Bigot (Institut de Myologie), j'ai opté pour une immortalisation par le gène CDK4 sans le TERT. La quantification de la DNM2 dans les lignées WT et KI a montré un niveau comparable de DNM2 dans les différentes lignées. Ainsi la mutation R465W n'a pas d'impact sur l'expression de la protéine. Durieux *et al*. n'ont pas observé de différence au niveau de l'ARN et la protéine DNM2 dans le muscle des souris nouveau-nées à P0 ni dans les fibroblastes embryonnaires de souris (Durieux, Vassilopoulos et al. 2012). Cela suggère que la physiopathologie de la maladie n'implique pas de surexpression de la DNM2.

L'immortalisation de myoblastes offre plusieurs avantages. Comparé à l'extraction de myoblastes primaires, les lignées stables proviennent de l'expansion de clones isolés et présentent des caractéristiques plus reproductibles et plus homogènes relatives à la variabilité due à l'extraction, la confluence et le passage des cellules. Elle permet aussi d'éviter de sacrifier des souris ce qui est en cohérence avec les recommandations de l'expérimentation animale et notamment la règle des 3 R (Réduire, Raffiner, Remplacer).

D'autres études ont évalué l'impact des mutations CNM-DNM2 sur plusieurs processus cellulaires en utilisant des fibroblastes murins ou de patients ou en surexprimant les mutants DNM2 dans des cellules de type Cos et HeLa (Bitoun, Durieux et al. 2009, Koutsopoulos, Koch et al. 2011). Les myoblastes immortalisés expriment des niveaux endogènes de DNM2 dans un contexte qui se rapproche plus du tissu atteint : le muscle squelettique.

Ces lignées pourraient être utilisées pour élucider les mécanismes pathologiques cellulaires de la myopathie centronucléaire à transmission dominante et le développement de thérapies tel que le criblage d'inhibiteurs pharmacologiques de la DNM2.

5.2 Mécanismes pathologiques cellulaires de la myopathie centronucléaire à transmission autosomique dominante

La génération de lignées de myoblastes stables m'a permis d'étudier les mécanismes pathologiques liés à la mutation DNM2 R465W au niveau cellulaire. La DNM2 ayant un rôle pléiotrope dans la cellule, j'ai exploré plusieurs voies cellulaires : endocytose, autophagie, polymérisation de l'actine, fusion des myoblastes et la fonction mitochondriale.

5.2.1 Endocytose

DNM2 est une GTPase impliquée dans la fission des vésicules durant l'endocytose dépendante de la clathrine. Pour mon projet, j'ai choisi un cargo bien caractérisé : la transferrine et son récepteur. J'ai d'abord quantifié l'internalisation de la transferrine marquée par CY3 dans les myoblastes murins immortalisés après une étape de lavage acide qui permet de s'affranchir de la transferrine membranaire. Ainsi le signal mesuré correspond à l'internalisation de la transferrine. Les myoblastes KI *Dnm2*$^{R465W/+}$ montrent une augmentation de l'internalisation de la transferrine à 10 et 20 min. Afin d'étudier la contribution de la DNM2 à ce phénotype, les cellules ont été ensuite traitée par le dynole 34-2, un inhibiteur allostérique de DNM2 (inhibe aussi les autres dynamines). L'inhibition de la DNM2 par le dynole 34-2 entraîne une réduction de l'internalisation de la transferrine. Cela prouve que le phénotype observé est lié à DNM2. Avec une concentration de 50 µM, le phénotype observé dans le clone KI1 a été normalisé au niveau du WT, ce qui ouvre la voie vers un potentiel criblage de molécules chimiques qui normalisent ce phénotype en vue d'un traitement pharmacologique.

J'ai ensuite quantifié l'internalisation de la transferrine dans les myoblastes de patients portant les mutations DNM2 R369Q et R465W. Comparé à trois lignées saines provenant de trois personnes d'âges différents, les myoblastes mutés montrent une augmentation de l'internalisation de la transferrine. J'ai ainsi observé le même phénotype dans des myoblastes

provenant de deux espèces différentes exprimant une DNM2 mutée. Ces résultats renforcent l'hypothèse de gain-de-fonction des mutations CNM-DNM2. Plusieurs études ont caractérisé les mutants DNM2 *in vitro*, en purifiant des protéines recombinantes. Le mutant R465W montre une activité GTPasique augmentée et une dissociation dépendante du GTP diminuée comparées à DNM2 WT (Wang, Barylko et al. 2010). Chin *et al*. ont mesuré la capacité de ce mutant à catalyser la fission des membranes (Chin, Lee et al. 2015). Ils ont observé une activité augmentée de la protéine mutée et que cette fission est encore plus augmentée en présence du domaine N-BAR de l'endophiline. Ils ont aussi trouvé que contrairement à DNM2 WT, le mutant pouvait tubuler des membranes même en absence du GTP. Ils ont aussi observé des effets comparables dans d'autres mutations CNM-DNM2 (E368K, E560K, A618T, S619L, E650K). Les auteurs ont expliqué cette hyperactivité par un auto-assemblage plus marqué dans les mutants CNM-DNM2 et que la dissociation de DNM2 des membranes après ajout de GTP était diminuée chez ces mutants. Ces résultats obtenus *in vitro* montrent une hyperactivité des mutations CNM-DNM2 et donc un mécanisme gain-de-fonction de ces mutations. Mes résultats obtenus dans les myoblastes murins et de patients sont en cohérence avec ces observations. Il s'agit de la première fois où une augmentation de l'internalisation de la transferrine imputable à des mutations CNM-DNM2 a été rapportée. Plusieurs études précédentes ont décrit l'impact de ces mutations soit en surexprimant le mutant dans des lignées utilisées en routine soit en utilisant d'autres modèles cellulaires.

Bitoun *et al.* ont transfecté des cellules COS7 avec des constructions DNM2 marquée par la GFP et ont observé que les mutations R465W, K562E, E625del et E650K diminuaient l'internalisation de la transferrine (Bitoun, Durieux et al. 2009). Dr. Koutsopoulos, une chercheuse post-doctorante a pu reproduire ces résultats dans notre laboratoire en utilisant des cellules COS1 (Koutsopoulos, Koch et al. 2011). Brown *et al*. ont utilisé des cellules HEK293 et n'ont pas observé de défaut d'endocytose de transferrine causé par la mutation R465W

(Brown, Collett et al. 2017). Ces résultats ont été donc déduits après surexpression transitoire de la protéine mutée, et le niveau d'expression était variable entre les cellules au sein de la même expérience, ce qui ne reflète ni les conditions physiopathologiques de la maladie ni les effets des allèles autosomiques dominants. En effet, mes résultats et ceux de Durieux *et al.* n'ont pas montré de surexpression de la DNM2 mutée. Les phénotypes observés seraient dus à des effets non spécifiques causés par la cytotoxicité de la surexpression de DNM2. Dans notre laboratoire, nous avons démontré que l'injection d'AAV codant pour la DNM2 WT dans les muscles de souris WT entraînait une surexpression de la DNM2 et des phénotypes de myopathie centronucléaire, d'où la nécessité d'avoir un modèle cellulaire avec un environnement plus fidèle au contexte physiopathologique.

D'autres études se sont intéressées aux biopsies de patients et notamment aux fibroblastes. Bitoun et *al.* ont observé un défaut d'endocytose dans une lignée de fibroblastes de patient portant la mutation R465W (Bitoun, Durieux et al. 2009) alors que Koutsopoulos *et al.* (notre laboratoire) ont comparé plusieurs lignées de patients (R465W et S619L) et n'ont pas observé de défaut d'internalisation de la transferrine (Koutsopoulos, Koch et al. 2011). Durieux *et al.* ont aussi quantifié l'internalisation de la transferrine dans les fibroblastes de souris KI *Dnm2*$^{R456W/+}$ (hétérozygotes), *Dnm2*$^{R456W/R465W}$ (homozygotes) et WT et n'ont observé de défaut d'endocytose quand dans les fibroblastes homozygotes ce qui conforte l'hypothèse d'effets non spécifiques d'un taux élevé de la protéine mutée comparée à la protéine WT (Durieux, Vignaud et al. 2010).

L'équipe du Dr. Sandra L. Schmid étudie aussi les fonctions de DNM2 au cours de l'endocytose. Ils ont généré une lignée de fibroblastes de souris KO hétérozygote pour la DNM2 (*Dnm2*$^{+/-}$). Afin de créer des lignées stables des mutants CNM-DNM2, ces fibroblastes ont été infectés par des rétrovirus qui codent pour des mutants DNM2 et WT

marqués par la GFP. En comparant plusieurs mutants au WT, ils n'ont pas observé de défaut d'internalisation de la transferrine (Liu, Lukiyanchuk et al. 2011).

L'effet dominant négatif des mutations CNM-DNM2 a été observé au cours d'expériences basées sur la surexpression transitoire des mutants CNM-DNM2. Cet effet est controversé chez les fibroblastes de patients et absent dans les lignées de fibroblastes stables générées par l'équipe du Dr. Sandra L. Schmid. Il faut noter que c'est la première fois que l'endocytose a été quantifiée dans des myoblastes, qui proviennent du tissu affecté dans les myopathies. Mes résultats sont déduits de lignées qui expriment la DNM2 à un niveau endogène sans perturber l'équilibre entre les allèles WT et muté. Cette étude a permis de clarifier une controverse. L'effet gain-de-fonction suggéré par les précédentes études *in vitro* a été confirmé dans les myoblastes humains et murins et ainsi dans un environnement cellulaire qui se rapproche plus de la pathologie. L'inactivation ou la correction allèle spécifique par CRISPR/Cas9 a corrigé ce phénotype ce qui renforce l'hypothèse gain-de-fonction.

5.2.2 Autophagie

DNM2 est impliquée dans le processus de reformation des autolysosomes (ALR) (Chen and Yu 2018). La lipidation de LC3 représente un marqueur majeur de l'autophagie. A l'état basal, les myoblastes KI *Dnm2*$^{R465W/+}$ présentent une augmentation du taux de LC3-II. Après traitement avec la bafylomicine A1 (BafA1), un inhibiteur de la dégradation du contenu des lysosomes, le ratio LC3-II cellules traitées/non traitées est diminué de moitié chez les myoblastes KI comparés aux WT. Cela suggère que l'augmentation du niveau de LC3-II dans ces myoblastes était due à une accumulation et non pas à une augmentation de l'expression de LC3-II. Cette accumulation suggère ainsi un ralentissement partiel de la dégradation des autolysosomes. Par la suite, afin de vérifier la présence de défaut d'induction de l'autophagie, les cellules ont été cultivées dans un milieu pauvre en nutriments pour activer l'autophagie.

Le niveau de LC3-II était comparable entre les lignées KI et WT, ce qui ne suggère pas de défaut de la phase d'induction de l'autophagie (résultat non publié).

L'impact des mutations CNM-DNM2 sur l'endocytose a été étudié en détails dans plusieurs types et modèles cellulaires mais leur impact sur l'autophagie a été rarement testé dans la littérature. Durieux *et al*. se sont intéressés à l'effet de la mutation DNM2 R465W dans les fibroblastes embryonnaires de la souris KI *Dnm2*$^{R465W/R465W}$ à l'état homozygote (les souris homozygotes ne sont pas viables) (Durieux, Vassilopoulos et al. 2012). A l'état basal, l'augmentation de LC3-II induite par le traitement à la BafA1 était moins importante dans les fibroblastes homozygotes que WT. Ce phénotype est comparable à celui que j'ai observé dans les myoblastes hétérozygotes. En cultivant les cellules dans un milieu pauvre en nutriments, les auteurs ont observé le même défaut de LC3-II après traitement à la BafA1 alors que mes résultats suggèrent une tendance à la diminution sans être statistiquement significatifs. A l'instar de ces résultats, le défaut d'autophagie que j'ai observé dans les myoblastes hétérozygotes est partiellement comparable à celui des fibroblastes homozygotes. La différence que Durieux *et al*. ont observée pourrait être expliquée par la présence de deux allèles mutés. Leur hypothèse était que la mutation DNM2 R465W entraînait un défaut d'autophagie au niveau de la maturation des autophagosomes vu qu'ils ont observé une diminution de l'acidification des autophagosomes alors que mes résultats convergent vers un défaut de dégradation et d'un ralentissement du flux de l'autophagie.

Afin de confirmer le phénotype observé, j'ai quantifié la variation d'un autre marqueur de l'autophagie en Western-blot : p62. Ni la privation des nutriments, ni le traitement par le BafA1 n'a induit de changement du niveau de p62 au sein de la même lignée de myoblastes (résultats non publiés). Durieux *et al.* ont observé une différence entre WT et HMZ en utilisant une technique d'immunofluorescence. Le fait que je n'ai pas observé de différence pourrait s'expliquer par une compensation transcriptionnelle de p62. La quantification d'un

autre marqueur d'autophagie, comme l'ubiquitinylation, pourrait apporter une explication à ces observations.

Afin d'évaluer l'autophagie dans un contexte hétérozygote, Durieux *et al.* ont quantifié le niveau de LC3-II dans le muscle de la souris KI *Dnm2*$^{R465W/+}$ après une période de jeûne. Le niveau de LC3-II était augmenté dans le muscle des souris KI ce qui suggère l'implication de DNM2 dans la régulation de l'autophagie.

Chez cette souris, les mêmes auteurs ont déjà décrit une augmentation de l'expression du gène FOXO3a et une augmentation de la translocation nucléaire de sa forme active déphosphorylée (Durieux, Vignaud et al. 2010). Ce facteur de transcription contrôle l'autophagie et la voie du protéasome. L'expression de l'ubiquitine ligase Murf1 et Gabarapl1 est aussi augmentée, ce qui suggère un dérèglement de l'autophagie.

Shulze et *al.* ont étudié le rôle de DNM2 au cours de l'autophagie (Schulze, Weller et al. 2013). En inhibant l'expression de la DNM2 par des siARN et son activité par le dynasore et dynole 34-2, ils ont observé dans des hépatocytes (Hep3B) une augmentation du niveau de LC3-II. Les cellules traitées ont montré un aspect de larges lysosomes, organisés en clusters juxta-nucléaires. Ces structures suggéraient un blocage de l'autophagie au stade d'autolysosomes. Le traitement par un inhibiteur de la dégradation des autolysosomes n'a pas modifié le niveau de LC3-II des cellules DNM2 knock-down ce qui indique un dérèglement du compartiment autolysosomal. Cette hypothèse a été renforcée par l'aspect de larges autolysosomes en microscopie électronique. L'inhibition de la DNM2 a aussi entraîné la formation de tubules plus longs qui émergent des autolysosomes (LAMP1+) suggérant une constriction de la membrane autolysosomale sans fission efficace.

Chen *et al*. ont décrit le rôle de DNM2 comme mécano-enzyme qui libère les proto-lysosomes qui sont LAMP1+ et LC3- lors de l'ALR (Chen and Yu 2018). Durant l'ALR, la clathrine forme des bourgeons à la surface des autolysosomes où PIP5K1B catalyse la réaction pour

former du PI(4,5)P_2. La moto-protéine KIF5B entraîne l'élongation et la formation de tubules au niveau des bourgeons de clathrine *via* son interaction avec le microtubule. La fission de vésicules formées *de novo* serait médiée par la DNM2 (Figure 5).

Mes résultats apportent une preuve supplémentaire du rôle de la DNM2 dans la dynamique de l'autophagie et montre que la mutation DNM2 R465W perturbe ce processus.

5.2.3 Impact de la mutation DNM2 sur la polymérisation de l'actine et l'état redox mitochondrial

Afin d'évaluer l'effet de la mutation DNM2 sur la dynamique de l'actine dans les myoblastes murins, j'ai mesuré la formation de nouveaux filaments d'actine après une courte perméabilisation avec la digitonine en présence de l'actine G monomérique marquée par l'Alexa 488. La quantification de l'intensité globale reflète la polymérisation *de novo* de l'actine. En comparant une lignée WT et KI, cette différence n'était pas statistiquement significative. Gonzalez *et al.* ont observé un défaut de polymérisation de l'actine dans les myoblastes humains (RCMH) transfectés par les mutants DNM2 (R369W, R465W) (Gonzalez-Jamett, Baez-Matus et al. 2017). Contrairement à mes résultats, leurs conclusions ont été basées sur la surexpression des mutants DNM2. D'autres expériences comme la quantification du ratio de l'actine F/G dans les lignées de myoblastes murins permettraient de clarifier l'impact de la mutation R465W sur la dynamique de l'actine.

La DNM2 est aussi impliquée dans la fission mitochondriale. J'ai mesuré la production des anions superoxides à l'état basal dans les myoblastes murins par une sonde fluorescente. Les résultats n'ont pas montré de différence entre les myoblastes KI et WT. D'autres études ont montré que la réduction du taux de DNM2 par des siARN a induit une élongation des mitochondries avec la présence de sites de constriction ce qui prouve le rôle de DNM2 dans la phase finale de scission mitochondriale (Lee, Westrate et al. 2016). D'autres expériences qui permettraient de visualiser la forme, la taille, et la densité du réseau des mitochondries

pourraient apporter des informations supplémentaires sur l'impact des mutations CNM-DNM2 sur la dynamique mitochondriale.

Pour résumer, cette partie de mon projet de thèse a permis de caractériser deux phénotypes cellulaires de la myopathie centronucléaire à transmission AD. L'intérêt d'utiliser des myoblastes consiste à étudier l'impact des mutations dans des lignées qui proviennent du tissu affecté, le muscle et qui expriment un ratio protéine mutée/WT endogène. Le phénotype d'augmentation de l'internalisation de la transferrine a été observé dans les myoblastes humains et murins affectés. Cette augmentation serait en cohérence avec une hypothèse gain-de-fonction des mutations CNM-DNM2 qui entraîneraient une protéine mutée suractive. Il s'agit de la première fois qu'une augmentation de l'internalisation de la transferrine est rapportée dans la littérature. Il s'agit aussi de la première fois où des myoblastes ont été utilisés pour décrire ce phénotype. Cette augmentation de l'internalisation de la transferrine pourrait être expliquée par plusieurs hypothèses : Soit la protéine mutée est plus active donc elle libère plus de vésicules d'endocytose, soit il y a plus de récepteurs membranaires de transferrine en termes de densité, qui serait dû à un recyclage excessif de ce récepteur. La deuxième hypothèse pourrait être vérifiée en quantifiant les récepteurs de transferrine dans la fraction membranaire et en quantifiant la voie de recyclage de la transferrine.

Le deuxième phénotype est le défaut de l'autophagie qui a été rapporté dans la littérature dans les fibroblastes embryonnaires de souris homozygotes. Mes résultats suggèrent un ralentissement partiel du flux d'autophagie à l'étape de dégradation du contenu autolysosomal. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en quantifiant l'ubiquitinylation par Western-blot et en vérifiant la dégradation des autophagosomes par microscopie électronique.

D'autres processus cellulaires pourraient être explorés comme la dynamique mitochondriale et l'exocytose. J'ai commencé à mettre au point un protocole de quantification de l'exocytose

de GLUT4 en microscopie TIRF en utilisant une construction GLUT4 marquée par la GFP. Gonzalez *et al*. ont observé un défaut d'exocytose du GLUT4 lié aux mutations CNM-DNM2 dans les myoblastes RCMH transfectés par ces mutants (Gonzalez-Jamett, Baez-Matus et al. 2017).

5.3 Inactivation et correction allèle-spécifique de la mutation DNM2 R465W

5.3.1 Dans les cellules humaines

Afin de tester l'efficacité et la spécificité de l'outil CRSIPR-Cas9 dans les cellules humaines, nous disposons d'une lignée de fibroblastes immortalisés provenant d'un patient portant la mutation DNM2 R465W et de cellules HeLa. Nous avons conçu trois guides ARN : deux sont allèle-spécifiques et un pan-allélique. Le guide ARN allèle-spécifique reconnaît la séquence mutée en 5' du PAM (la mutation est en amont par rapport au PAM) alors que pour le guide pan-allélique la mutation correspond au « N » du PAM NGG et donc ce guide reconnaît la séquence WT et mutée. Les cellules HeLa ont permis de valider les différents composants de CRISPR/Cas9 : la nucléase Cas9, le guide ARN (pan-allélique) et la matrice de réparation sous forme d'oligonucléotides simple-brin. Des clones NHEJ (13,5%) et HDR (9%) ont été isolés. Dans les clones HDR plusieurs mutations silencieuses ont été insérées afin de créer ou supprimer des sites de restrictions. Il est à noter que dans certains clones, la recombinaison homologue était partielle et que certaines mutations n'ont pas été intégrées. Plus on s'éloigne du site de coupure de Cas9 moins les mutations silencieuses sont insérées.

Pour les fibroblastes de patient, j'ai testé les trois guides ARN. Un seul guide a été efficace et a généré des clones édités. Ces clones ne présentaient que des indels (NHEJ) et pas d'HDR. L'efficacité du guide C20 était de 60%. Dans tous les clones, seul l'allèle muté a été ciblé et inactivé de manière spécifique.

5.3.2 Dans les cellules murines

En suivant la même stratégie des fibroblastes de patient, nous avons conçu 2 guides allèle-spécifiques et un pan-allélique. L'analyse des clones de myoblastes de souris montre une modification de l'ADN de 94 et 96% avec les 2 guides ARN allèle-spécifiques et que seul l'allèle muté a été modifié ce qui confirme l'efficacité et la spécificité des guides utilisés. Seul le guide C20 a généré des clones HDR (6%). Ni l'utilisation d'un inhibiteur de la voie du NHEJ par le SCR7, ni d'un stimulateur de la voie de l'HDR, le RS-1, n'a augmenté le taux de cellules corrigées. Cela peut s'expliquer par l'action de ces composants qui dépend du type cellulaire et de la concentration adéquate pour chaque type cellulaire.

Certaines études ont développé des stratégies d'édition du génome pour cibler des allèles dominants. Montey *et al.* ont inactivé l'allèle muté dans des fibroblastes de patients atteints de la maladie de Huntington. Ils ont recherché les polymorphismes d'un seul nucléotide (SNP) sur l'allèle muté au niveau de l'exon 1 du gène *HTT* et qui correspondaient au PAM de la Cas9 ou Cpf1 (Monteys, Ebanks et al. 2017). Leur but était de couper de part et d'autre de l'exon 1 muté (répétitions CAG) en utilisant la voie NHEJ. L'allèle spécificité est assurée par les SNPs qui constituent les PAM. Cette stratégie ne peut pas être appliquée à la séquence d'intérêt DNM2.

Yamamoto *et al*. ont se sont intéressés au syndrome de long QT causé par des mutations hétérozygotes au niveau du gène codant pour la calmoduline (*CALM*). Ils ont inactivé la mutation CALM2-N98S dans des cellules souches pluripotentes induites de patient en utilisant une Cas9 nickase couplée à deux guides ARN (Yamamoto, Makiyama et al. 2017). Dans l'un des deux guides, la mutation est incluse juste avant le PAM. A l'instar de cette stratégie, nous avons conçu les guides allèle-spécifiques de manière à inclure la mutation dans la région critique « seed » nécessaire à l'activité de la Cas9. L'utilisation de guides ARN tronqués (18 nucléotides) qui ne sont pas tolérants envers les mésappariements augmente la

spécificité de ces guides. Mon projet décrit une correction allèle-spécifique d'une mutation ponctuelle *via* la voie HDR dans des myoblastes.

Du point de vue de la stratégie de l'allèle spécificité, placer la mutation sur le PAM serait plus spécifique que le mésappariement avec le guide ARN. En effet, si la Cas9 ne reconnaît pas le PAM, son action s'arrête à cette étape et il n'y aurait pas de coupure, alors que le système CRISPR/Cas9 peut tolérer quelques mésappariements du guide ARN avec la séquence hors-cible, et dans ce cas l'allèle WT.

5.3.3 Effet de l'inactivation ou la correction allèle spécifique de la mutation DNM2 R465W

Plusieurs clones de myoblastes murins ont été isolés et séquencés. Dans les clones présentant des indels avec décalage de phase, le niveau de DNM2 a été diminué autour de 50% ce qui suggère l'introduction d'un codon stop au niveau de l'allèle muté et la production d'une protéine tronquée qui n'est pas stable. Dans les clones corrigés ou présentant une délétion sans décalage de phase, le niveau de DNM2 était inchangé. L'inactivation ou la correction allèle-spécifique de la mutation DNM2 R465W a normalisé les deux phénotypes cellulaires que j'ai décrits dans les myoblastes murins : l'augmentation de l'internalisation de la transferrine et le défaut de l'autophagie. Concernant l'endocytose, cette inactivation ou correction de l'allèle muté a diminué l'internalisation excessive de la transferrine. De plus en utilisant un guide ARN pan-allélique, j'ai isolé un clone où l'allèle WT a été inactivé. Pour ce clone le niveau de transferrine internalisée était comparable à celui des myoblastes non édités. Cela apporte une preuve supplémentaire à l'hypothèse gain-de-fonction des mutations CNM-DNM2.

5.4 Edition du génome *in vivo*

Après avoir testé les guides ARN *in cellulo*, j'ai transféré l'outil CRISPR/Cas9 *in vivo* et évalué son potentiel à cibler de manière allèle spécifique la mutation ponctuelle DNM2 R465W. La génération de la souris KI *Dnm2*$^{R465W/+}$ qui exprime la Cas9 de manière constitutive a permis une expression stable de la Cas9. Le système CRISPR/Cas9 a été activé par l'introduction du guide ARN par des injections intramusculaires d'AAV qui codent pour ce guide. Cette stratégie a permis une relative facilité d'utilisation du système CRISPR/Cas9 *in vivo* car un seul AAV est nécessaire pour son activation et de fournir la preuve de concept de l'allèle spécificité du système CRISPR/Cas9 dans le muscle. Le ratio entre le pourcentage des modifications de l'allèle muté divisé par celui de l'allèle WT reflète l'allèle-spécificité du guide ARN. Ce ratio était de 1 pour le guide pan-allélique ce qui prouve qu'il cible les deux allèles de manière équivalente. Pour les guides allèle-spécifiques, ce ratio est plus élevé pour le guide C19 ce qui peut être expliqué par une meilleure efficacité et une meilleure spécificité de ce guide ARN. De manière générale, les guides ARN allèle-spécifiques ont démontré une faible activité « off-target » sur l'allèle WT (0,5% à 3,3%) *in vivo* même après une expression prolongée de l'AAV (5 semaines).

Afin d'évaluer l'impact des indels induits par CRISPR/Cas9 sur l'expression de la DNM2, j'ai quantifié le niveau protéique de DNM2. Dans les muscles injectés par les différents guides le niveau de DNM2 a été réduit d'environ 50%. Cette réduction est plus importante que celle prédite par les modifications génomiques. En effet le taux d'indels induits par CRISPR/Cas9 sur les deux allèles n'a pas dépassé 25%. Cette différence observée entre l'inactivation génomique de *Dnm2* et la réduction du taux protéique pourrait être expliquée par la sensibilité de la technique de quantification des modifications au niveau de l'ADN. La technique de détection et de quantification des hétéroduplexes est un technique semi-quantitative basée sur la migration différentielle des hétéroduplexes. Cette technique ne fournit pas d'indications sur la nature des indels, notamment l'indel d'un nucléotide qui

représente l'indel le plus fréquent induit par le système CRISPR/Cas9. De plus, sans séquencer ces hétéroduplexes, il est difficile de vérifier si ce type d'indel peut être résolu et séparé des homoduplexes sur gel d'acrylamide vu le mésappariement que d'un seul nucléotide. Cela pourrait donc conduire à une sous-estimation de l'efficacité de l'édition du génome par le système CRISPR/Cas9. En utilisant la même approche et la même souris qui exprime la Cas9, Platt *et al*. ont obtenu un taux d'indels de 85% après une injection locale d'AAV dans le cerveau (Platt, Chen et al. 2014). D'autres techniques permettant de quantifier la formation d'hétéroduplexes pourraient apporter plus de précision à l'estimation de l'efficacité des différents guides utilisés. Au cours de mon projet, j'ai tenté d'optimiser le système Surveyor(R) qui comporte une nucléase qui coupe les hétéroduplexes au niveau du mésappariement. En utilisant cette technique, je n'ai pas pu obtenir des résultats reproductibles avec mes conditions expérimentales. Le « gold standard » pour quantifier et déterminer la nature des modifications génomiques reste le séquençage haut débit. Cette technique permettrait de détecter des évènements très rares tels que la correction de l'ADN par la voie de l'HDR. Bengtsson *et al*. ont détecté de l'HDR dans le muscle de souris à un taux de 0,8% en utilisant le séquençage haut débit (Bengtsson, Hall et al. 2017).

Mes résultats préliminaires ont montré aussi une réduction de la DNM2 d'environ 50%. En supposant que cette réduction soit due majoritairement à l'inactivation spécifique de l'allèle muté, l'objectif thérapeutique serait atteint. En effet Cowling et al. ont démontré que les souris exprimant 50% de DNM2 étaient viables et ne présentaient aucun phénotype.

Mes résultats préliminaires devraient être confirmés par un nombre suffisant de souris (n=5 pour chaque guide ARN). Ensuite, l'impact de cette modification du génome sur les phénotypes histopathologiques et musculaires devrait être évalué.

5.5 Moduler le système CRISPR/Cas9

En théorie, la correction des mutations serait l'approche thérapeutique la plus radicale pour guérir les maladies monogéniques. Cette modification est permanente. A la différence des approches ciblant l'ARN, il suffit que la Cas9 modifie la séquence ciblée une seule fois pour avoir un effet permanent. Or dans le cas où le système CRISPR/Cas9 est délivré par des AAV, l'expression est assurée par des épisomes et donc durable dans le temps, ce qui peut entraîner des effets hors-cibles. Dans ce cas, une sécurisation de ce système est nécessaire. Le couplage de la Cas9 à des prometteurs tissu-spécifiques et des AAV ayant un tropisme envers un tissu bien défini réduirait la toxicité dans les tissus non atteints. L'utilisation du système CRISPR/Cas9 sous forme d'ARNm ou complexe ribonucléoprotéique serait plus sure vu que la cellule dispose d'ARNases et protéases qui dégradent ces deux formes. D'autres équipes ont essayé de développer des anti-Cas9, une sorte d'antidote afin de stopper son action (Pawluk, Davidson et al. 2018). La dynamique co-évolutionnaire entre les bactéries et les phages a doté ces derniers par des système de défense contre CRISPR. Quatre protéines virales anti-CRISPR de type II-A (AcrIIA1-4) et trois anti CRISPR de type II-C (AcrIIC1-3) ont été identifiées. AcrA1-4 mimeraient un ADN double-brin et occuperaient le site de liaison au PAM empêchant ainsi la liaison de Cas9 à l'ADN cible. Les AcrC1-3 bloqueraient la liaison de Cas9 à l'ADN et entraîneraient la dimérisation de Cas9. Ces protéines pourraient être utilisées comme un système de modulation de la Cas9 qui bloquerait son action et inhiberait les effets hors-cibles.

Une autre équipe a développé un système auto-inhibable : KamiCas9. Cette Cas9 serait exprimée de manière transitoire afin d'augmenter sa bio-sécurité (Merienne, Vachey et al. 2017). L'idée était de bloquer l'expression de la Cas9 en ajourant un deuxième guide ARN sous le contrôle d'un promoteur faible 7SK et qui ciblerait l'ATG de Cas9 afin de bloquer la translation. Dans les souris traitées par le système KamiCas9, les auteurs ont observé une

réduction drastique du niveau protéique de la Cas9 sans affecter le taux de l'édition du génome du gène d'intérêt muté (*HTT)*.

6 Conclusion générale

Durant mon projet de thèse, j'ai établi des lignées stables de myoblastes murins afin d'étudier l'impact de la mutation la plus fréquente DNM2 R465W (27%) causant la forme autosomique dominante de la myopathie centronucléaire. Ce modèle cellulaire exprime la DNM2 à un niveau endogène. Parmi les processus cellulaires impliquant la DNM2 étudiés, deux étaient dérégulées par la mutation ; l'endocytose et l'autophagie. Ces phénotypes ont été corrigés par l'inactivation ou la correction allèle spécifique de la mutation. J'ai pu aussi valider les guides ARN sur ces myoblastes et transférer l'outil CRISPR/Cas9 *in vivo* dans le modèle murin de la pathologie. Les résultats préliminaires ont montré une grande spécificité des guides ARN utilisés malgré une seule différence d'un nucléotide comparé à la séquence WT. La réduction de la DNM2 a atteint l'objectif thérapeutique de 50% dans les muscles injectés. Cette inactivation allèle-spécifique de *Dnm2* pourrait améliorer les phénotypes histopathologiques et musculaires de la souris KI *Dnm2*$^{R465W/+}$. Les effets hors-cibles de ces guides ARN sur des séquences prédites bio-informatiquement devraient être évalués afin de s'assurer de la biosécurité du système CRISPR/Cas9 et des guides ARN utilisés. La capacité de cet outil moléculaire de cibler spécifiquement l'allèle muté dans un contexte de maladie autosomique dominante pourrait ouvrir la voie pour les approches thérapeutiques pour ce type de maladies souvent réfractaires aux thérapies géniques classiques par remplacement de gènes.

7 Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Principales caractéristiques cliniques et histologiques des patients atteints de myopathie centronucléaire AD

Figure 2 : Représentation schématiques des différents domaines composant la dynamine 2 avec les différentes mutations causant la myopathie centronucléaire AD

Figure 3 : Mécanisme de fission membranaire par la dynamine 2

Figure 4 : Représentation schématique de l'endocytose dépendante de la clathrine

Figure 5 : Représentation schématique du processus de reformation de lysosome autophagique (ALR)

Figure 6 : Illustration du fonctionnement du système CRISPR/Cas9 comme immunité adaptative chez les bactéries

Figure 7 : Illustration du clivage de l'ADN double-brin par le système CRISPR/Cas9 comme immunité adaptative chez les bactéries

Figure 8 : Réparation de l'ADN par la voie du NHEJ

Figure 9 : Réparation de l'ADN par la voie de la recombinaison homologue

Figure 10 : Représentation schématiques des mécanismes majeurs de réparation de l'ADN suite à une cassure double-brin (DSB) induite par le système CRISPR/Cas9

Figure 11 : Quantification de la production des ROS dans les myoblastes murins

Figure 12 : Quantification de la polymérisation de l'actine G *de novo* dans les myoblastes murins

Figure 13 : Détection des modifications de l'allèle muté et WT médiées par CRISPR/Cas9 *in vivo* et leurs impacts sur le taux de DNM2

Tableau 1 : Classification des mutations CNM-DNM2 selon la sévérité

Tableau 2 : Quantification de des modifications de l'allèle muté et WT médiées par CRISPR/Cas9 *in vivo* et leurs impacts sur le taux de DNM2 à partir de la figure 13

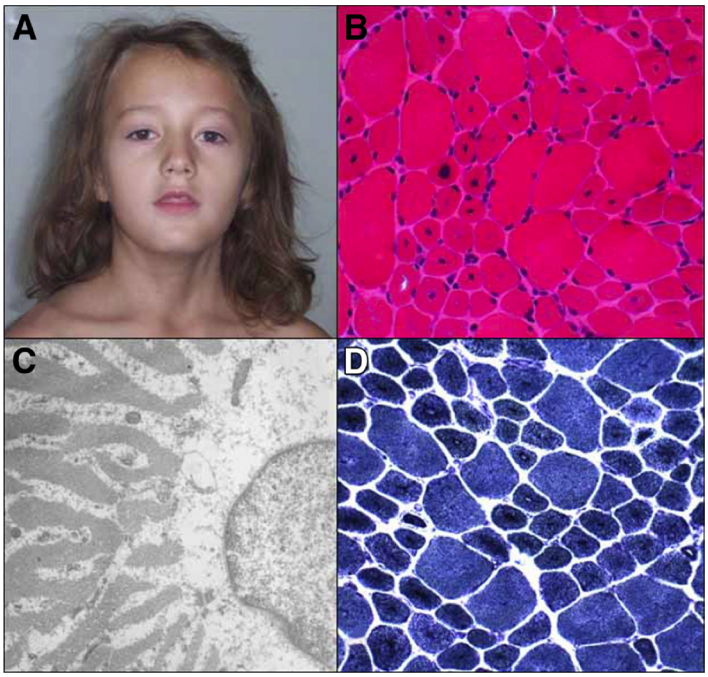


Figure 1: Principales caractéristiques cliniques et histologiques des patients atteints de myopathie centronucléaire AD. (A) Photo d'une patiente de 7 ans atteinte de myopathie centronucléaire AD présentant une faiblesse faciale modérée, ptosis et une « bouche ouverte ». (B) Coupe transversale du muscle de la patiente après coloration l'hématoxyline et à l'éosine (HE). Plusieurs noyaux sont localisés au centre des fibres musculaires. (D) Coupe transversale du muscle de la patiente après coloration NADH-TR montrant l'aspect caractéristique du réarrangement sarcoplasmique radial sous forme de « rayons de roue ». (C) Ultrastructure d'un noyau situé au centre d'une fibre musculaire montrant le réarrangement sarcoplasmique radial. Adapté de (Romero and Bitoun 2011)

Figure 2: Représentation schématiques des différents domaines composant la dynamine 2 avec les différentes mutations causant la myopathie centronucléaire AD. Domaine GTPase, intermédiaire (middle), d'homologie à la Pleckstrine (PH), GTPase effector (GED), riche en proline (PRD)

Mutation	Exon	Domaine	Sévérité	Apparition
E368K	8	Intermédiaire	Sévère	Néonatale / enfance
E368Q	8	Intermédiaire	Variable	Variable
R369W	8	Intermédiaire	Modérée	Adolescence / adulte
R369Q	8	Intermédiaire	Modérée	Variable
F372C	8	Intermédiaire	Sévère	Enfance
V375G	8	Intermédiaire	Sévère	Néonatale
R465W	11	Intermédiaire	Modérée	Variable
R522C	15	PH	Modérée	Variable
R522H	15	PH	Modérée	Variable
R523G	15	PH	Modérée	Adulte
E540K	15	PH	Sévère	Adulte
E560K	16	PH	Sévère	Enfance
D614N	17	PH	Modérée	Adulte
A618D	17	PH	Modérée	Néonatale
A618T	17	PH	Sévère	Néonatale
S619L	17	PH	Sévère	Néonatale
S619W	17	PH	Sévère	Néonatale
L621P	17	PH	Sévère	Néonatale
V625del	17	PH	Sévère	Néonatale
P627R	17	PH	Intermédiaire	Néonatale / enfance
P627H	17	PH	Sévère	Enfance
E650K	18	GED	Modérée	Enfance

Tableau 1: Classification des mutations CNM-DNM2 selon la sévérité (Hohendah, Roux et al. 2016).

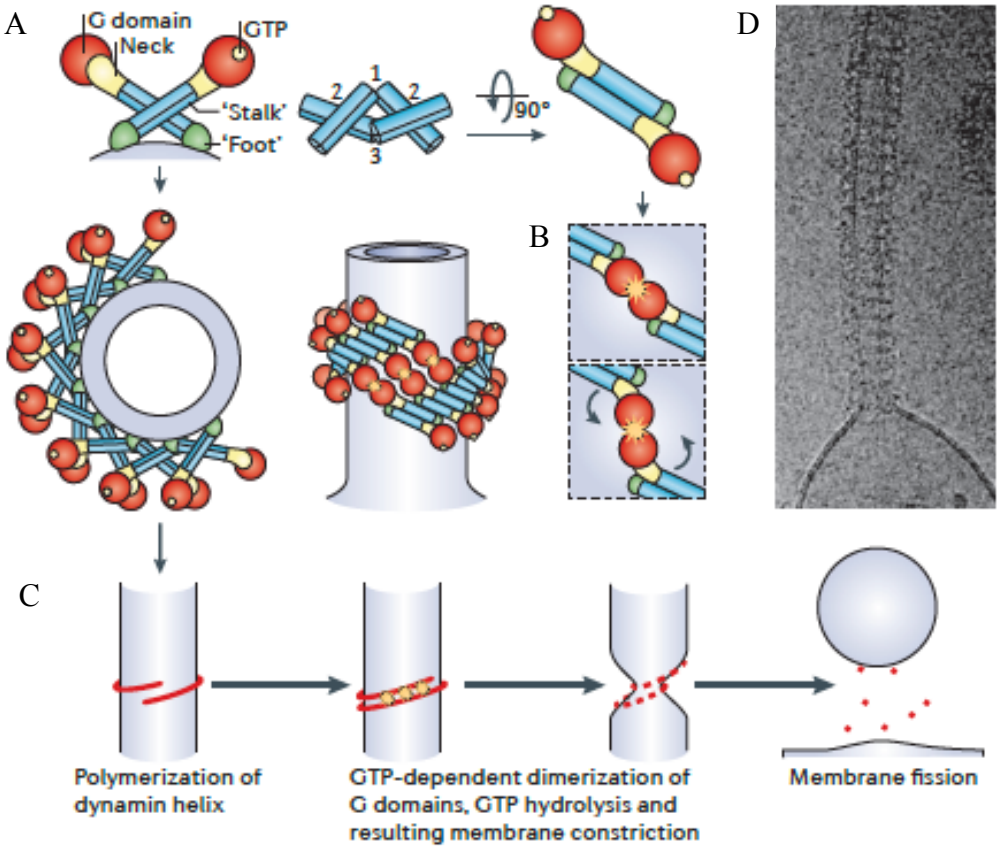


Figure 3: Mécanisme de fission membranaire par la dynamine 2. (A) Représentation schématique des dimères de DNM et de polymères d'hélices de DNM autour d'une matrice tubulaire. L'interaction des domaines intermédiaires des monomères de DNM entraîne la polymérisation de la DNM. Les polymères DNM s'enroulent autour de la membrane. L'hydrolyse du GTP entraîne la dimérisation des domaines G (B) ce qui entraîne une constriction et la fission membranaire (C). (D) Photo en microscopie cryo-électronique montrant un polymère de DNM purifiée qui forme un tubule à partir de liposome. Adapté de (Ferguson and De Camilli 2012).

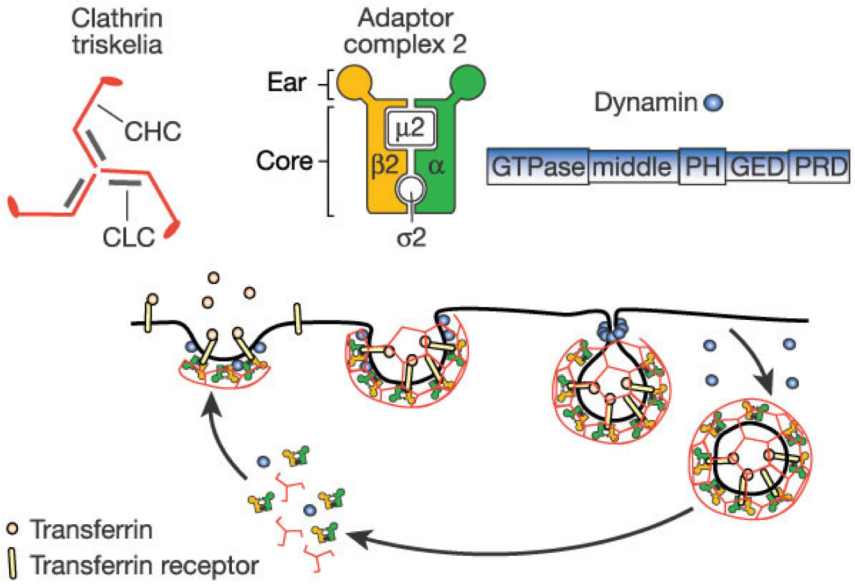


Figure 4: Représentation schématique de l'endocytose dépendante de la clathrine. Le cargo internalisé sont la transferrine et son récepteur. La clathrine est un hexamère constitué de trois chaînes lourdes associées à des chaînes légères formant une structure à trois bras appelée triskèle. Le complexe AP2 joue le rôle d'adaptateur. Lors de l'endocytose, ces triskèles s'assemblent pour constituer des cages creuses. La DNM2 joue un rôle dans le bourgeonnement des vésicules en s'assemblant sous forme d'anneau hélicoïdal et en libérant ces vésicules par constriction mécanique. Adapté de (Conner, Schmid et al. 2003)

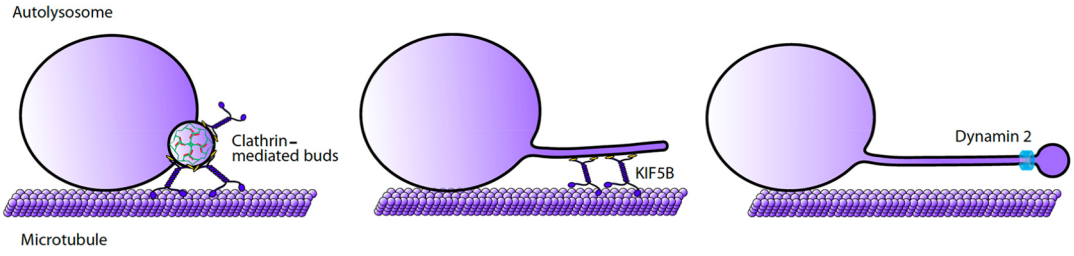


Figure 5: Représentation schématique du processus de reformation de lysosome autophagique (ALR). Une extension membranaire contenant la clathrine est formée à partir des autolysosomes. La moto-protéine KIF5B entraîne l'élongation et la formation de tubules au niveau des bourgeons de clathrine via son interaction avec le microtubule. La fission membranaire médiée par la DNM2 libère les proto-lysosomes. Adapté de (Chen and Yu 2018)

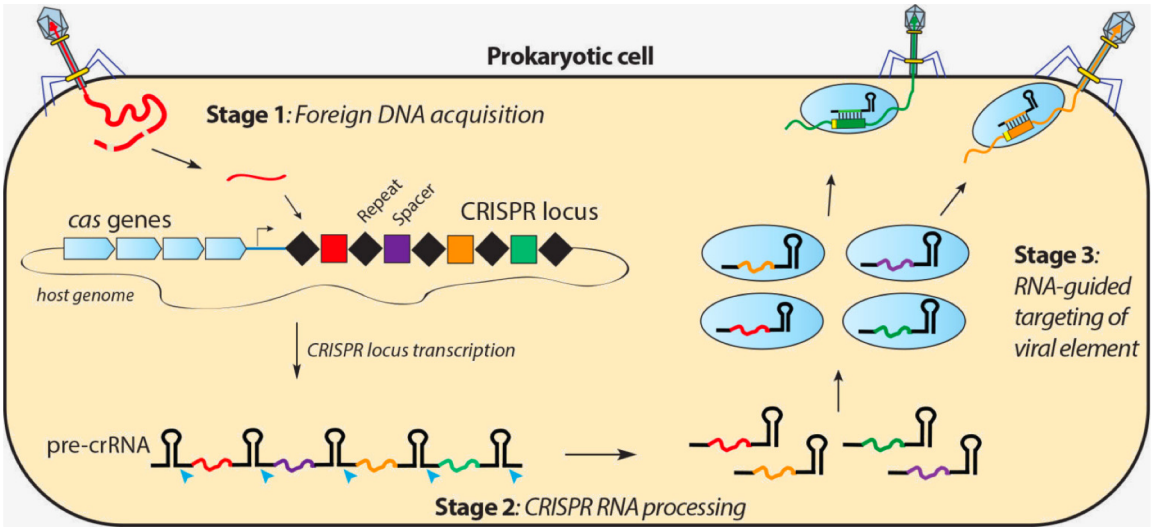


Figure 6: Illustration du fonctionnement du système CRISPR/Cas9 comme immunité adaptative chez les bactéries. La première phase d'adaptation consiste à acquérir et intégrer les « spacers ». La deuxième étape consiste en la maturation du pre-crARN en crARN. La troisième étape est l'interférence avec la séquence cible. (Image disponible: http://doudnalab.org/research_areas/crispr-systems/).

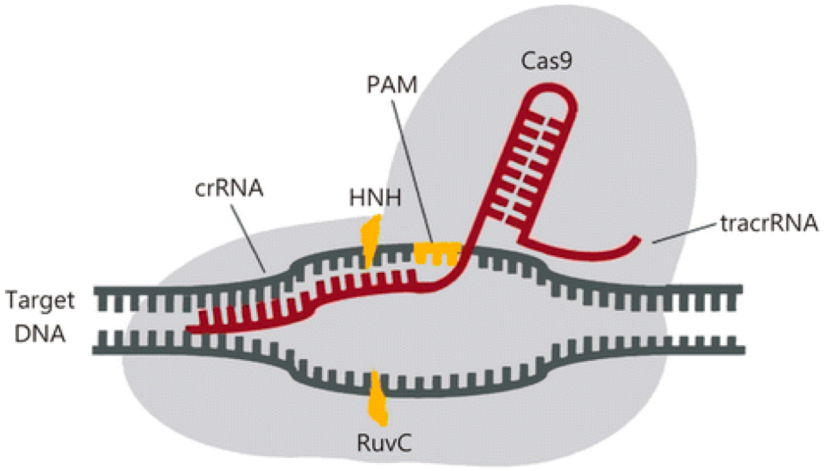


Figure 7: Illustration du clivage de l'ADN double-brin par le système CRISPR/Cas9 comme immunité adaptative chez les bactéries. Après reconnaissance du PAM, Cas9 parcourt l'ADN à la recherche de séquence complémentaire au crARN. Les domaines HNH et RuvC clivent les deux brins d'ADN à un endroit précis : 3 nucléotides en amont de l'extrémité 5' du PAM. Image prise de (Yang 2015).

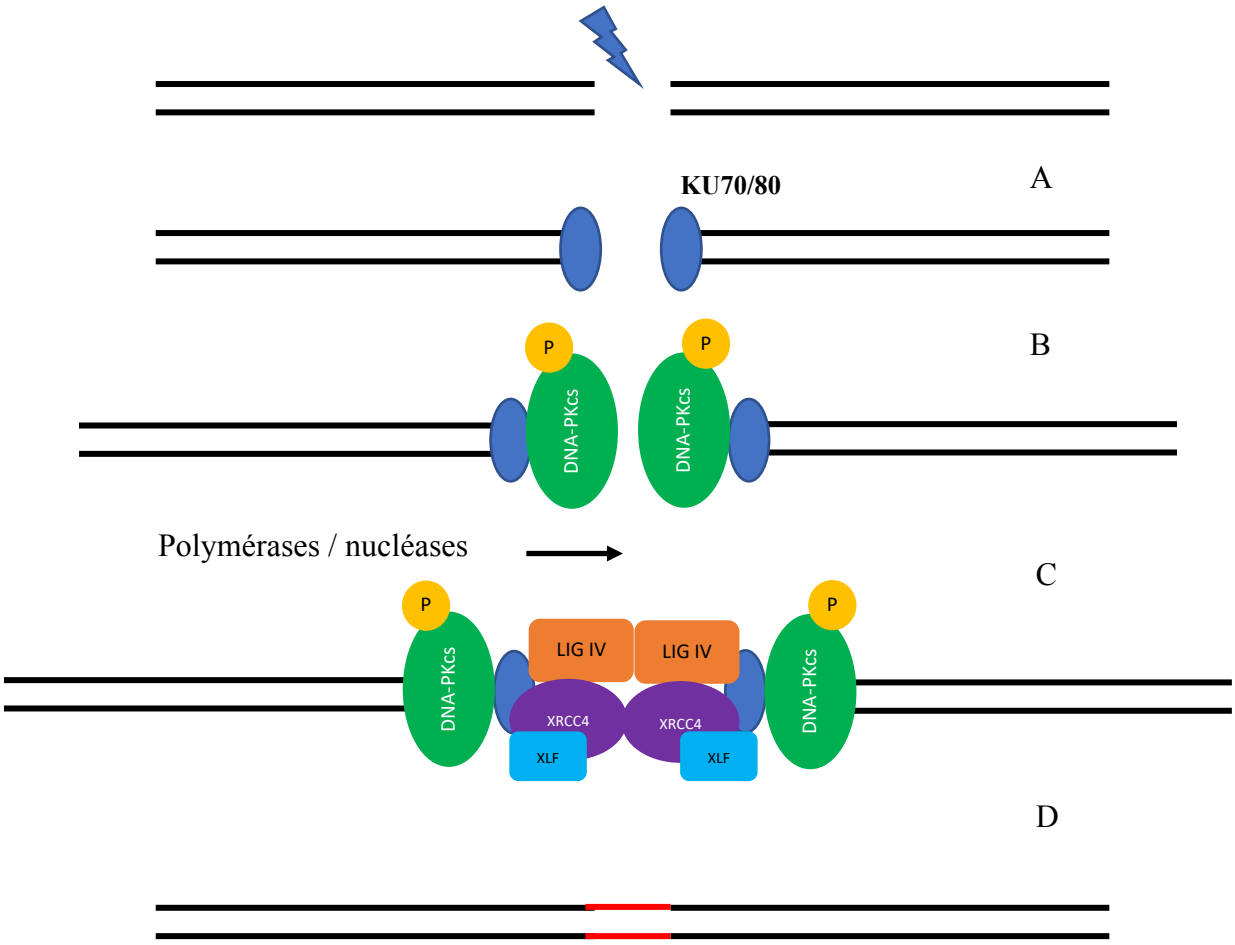


Figure 8: Réparation de l'ADN par la voie du NHEJ. (A) Reconnaissance de la cassure double brin par l'hétérodimère KU70/80 qui recrute la DNA-PKcs. (B) Formation de DNA-PK qui s'autophosphoryle et phosphoryle d'autres protéines de la voie du NHEJ. (C) Les polymérases et/ou nucléases procèdent à la maturation des extrémités clivées. (D) La ligase IV joint les deux extrémités. D'autres facteurs de type XRCC4 et XLF stabilisent le complexe KU.

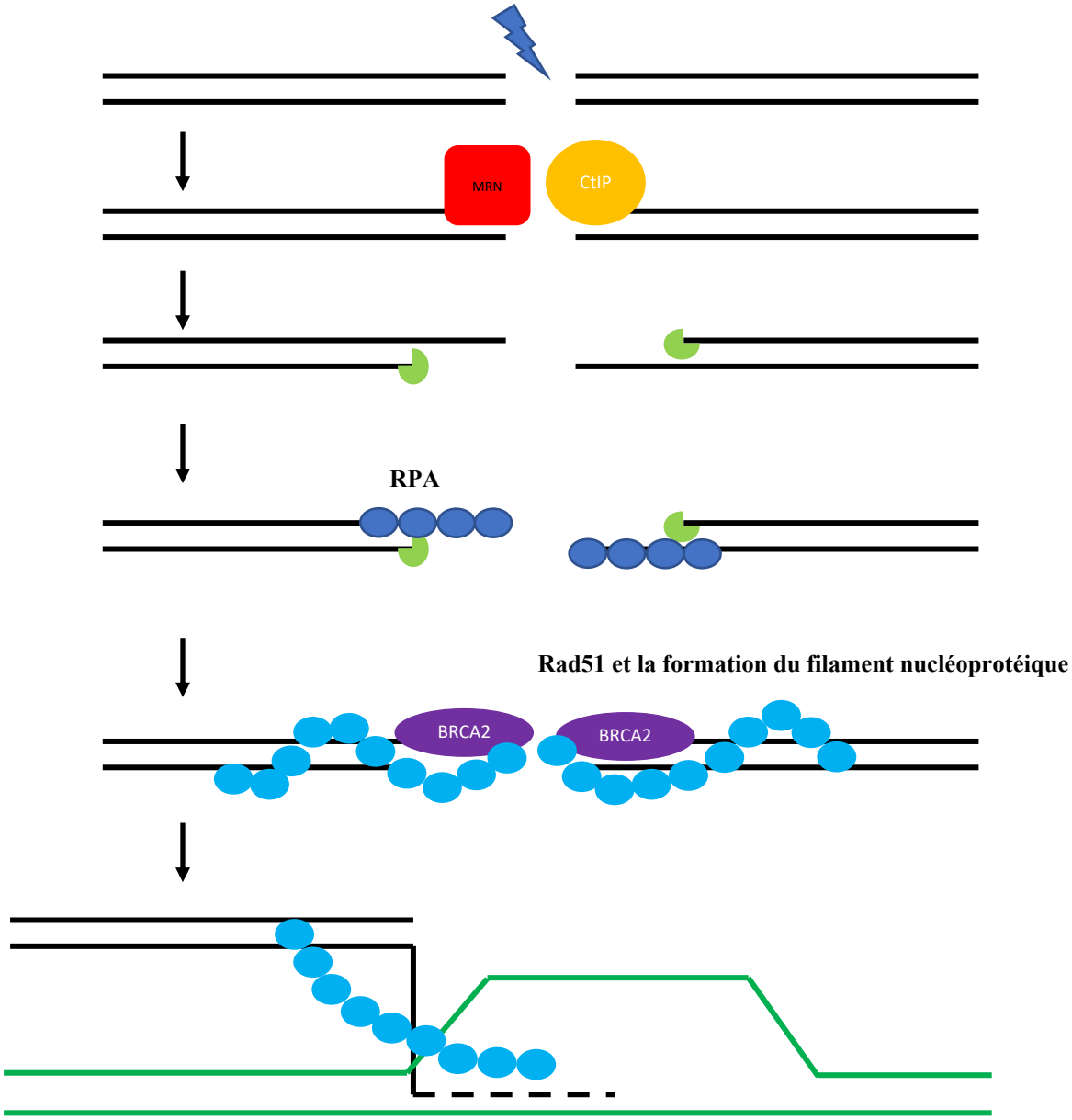


Figure 9: Réparation de l'ADN par la voie de la recombinaison homologue. La première étape consiste en la résection des extrémités des CDB qui implique le complexe MRX/MRN formé par les protéines : MRE11, RAD50 et XRS2/NBS1, et CtIP. L'ADN simple brin est stabilisé par les protéines RPA. En interagissant avec BRCA2 via PALB2, BRCA1 stimule la formation du complexe BRCA2-PALB2 qui recrute un acteur majeur de la recombinaison homologue : l'ATPase Rad51 impliquée dans la recherche d'homologie. Un filament nucléoprotéique est formé et s'enroule sur l'extrémité de l'ADN permettant l'invasion de brin homologue.

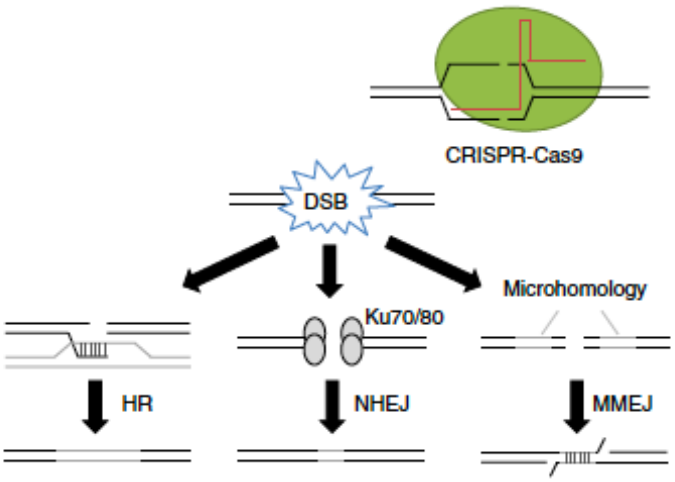


Figure 10: Représentation schématiques des mécanismes majeurs de réparation de l'ADN suite à une cassure double-brin (DSB) induite par le système CRISPR/Cas9. Recombinaison homologue (HR), Non-homologous end joining (NHEJ) et Microhomology-mediated end-joining (MMEJ). Adapté de (Sakuma and Nakade 2016).

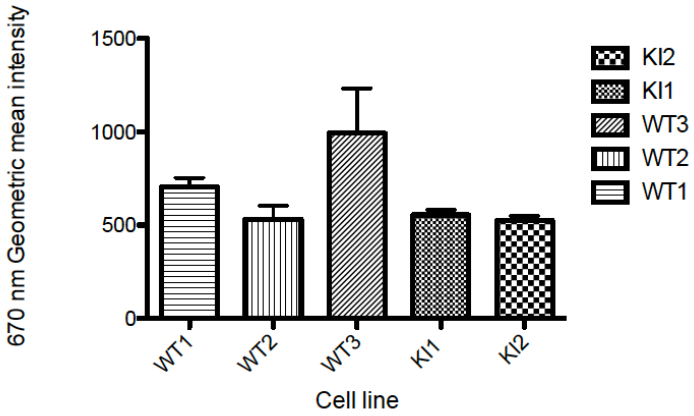


Figure 11: Quantification de la production des ROS dans les myoblastes murins. Les myoblastes ont été cultivés en présence d'une sonde fluorescente (MitoSOX) et analysés par FACS. La moyenne géométrique de l'intensité de fluorescence a été calculée pour chaque expérience indépendante; n=3; L'analyse de variance ANOVA à un facteur n'a pas montré de différence statistiquement significative entre les lignées WT et KI.

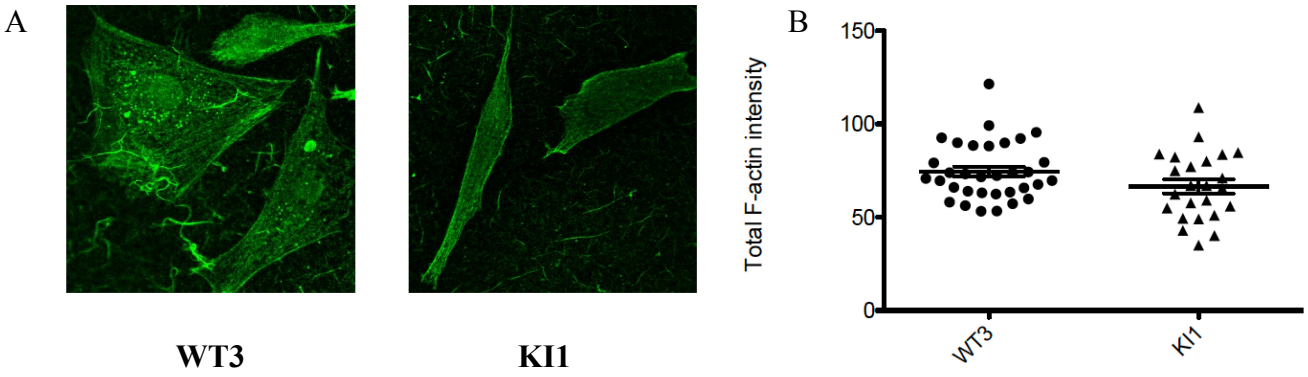


Figure 12: Quantification de la polymérisation de l'actine G *de novo* dans les myoblastes murins. Les myoblastes ont été perméabilisés par la digitonine et cultivés en présence de l'actine G-AF488 puis fixés par la PFA 4%. (A) Images représentatives d'exemples de filaments d'actine prises par un microscope confocal SP8. Le plan équatorial de la cellule a été considéré comme plan de référence. (B) Quantification de la fluorescence totale de chaque cellule (33 cellules pour WT3 et 24 cellules pour KI1); n=1; les résultats sont exprimés en moyenne totale de la fluorescence par cellule +/- SEM; L'analyse par le test de *student* n'a pas montré de différence statistiquement significative entre les lignées WT et KI.

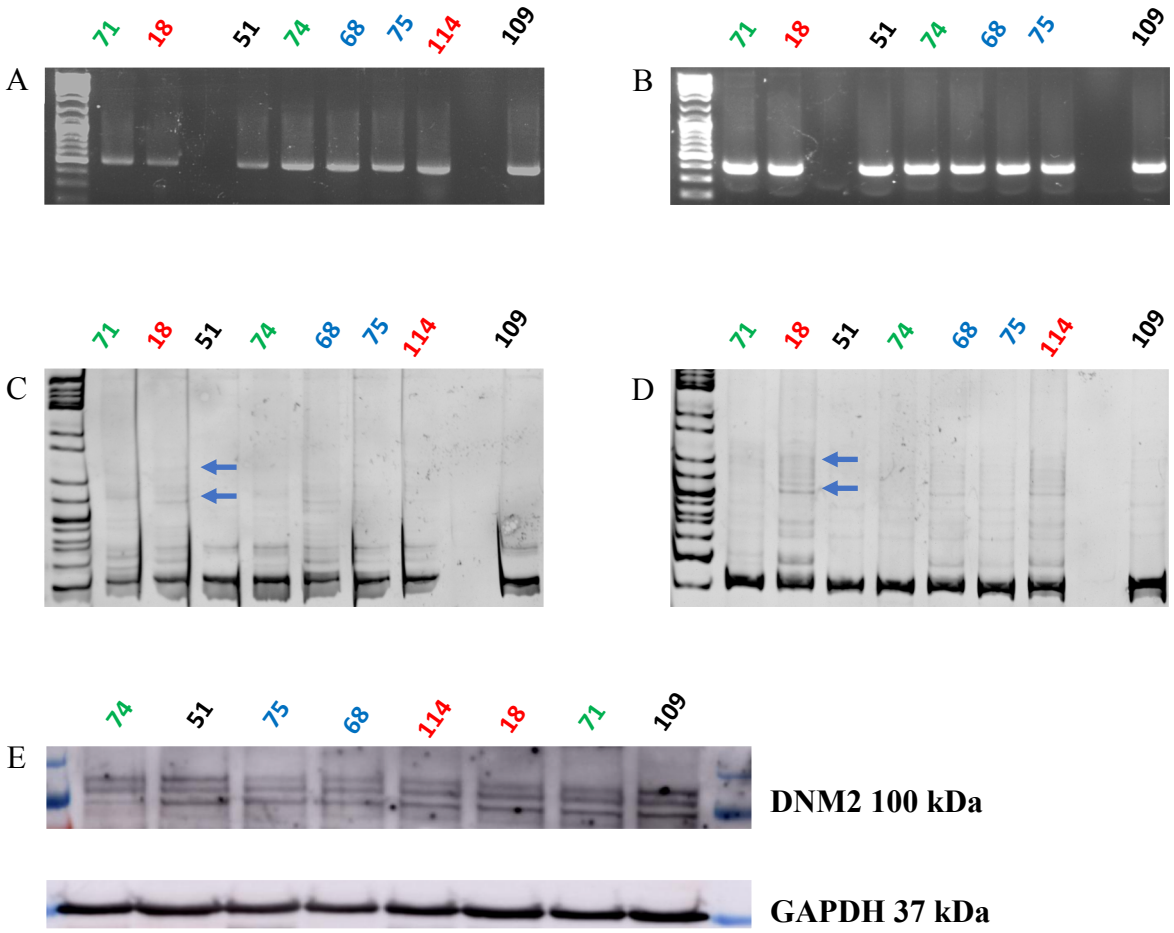


Figure 13: Détection des modifications de l'allèle muté et WT médiées par CRISPR/Cas9 *in vivo* et leurs impacts sur le taux de DNM2. Les TA des souris 51 et 109 ont été injectés par des AAV vides (**noir**), 71 et 74 par le guide C19 (**vert**; allèle-spécifique), 68 et 75 par le guide C20 (**bleu**; allèle spécifique) et 18 et 114 par le guide C22 (**rouge**; pan-allélique), L'allèle muté (A,C) et l'allèle (B,D) ont été amplifiés spécifiquement. Les produits de PCR ont été migrés sur gel d'agarose (A,B) et acrylamide 10% (C,D). Les flèches indiquent des exemples d'hétéroduplexes. (E) Image de Western-blot des différents TA injectés. Les quantifications des hétéroduplexes (C,D) et de la réduction du taux protéique de DNM2 (E) sont résumés dans le tableau 2.

Souris	AAV injecté	% modification de l'allèle muté	% modification de l'allèle WT	Ratio allèle-spécifique	Niveau protéique de DNM2 / moyenne AAV vide
51	Vide	NA	NA	NA	1,072960409
109	Vide	NA	NA	NA	0,927039591
71	C19 allèle-spécifique	46%	0,5%	89,03	0,435930664
74	C19 allèle-spécifique	27,4%	0,9%	31,12	0,613566326
68	C20 allèle-spécifique	21,6%	3,3%	6,51	0,601079297
75	C20 allèle-spécifique	13,3%	1,4%	9,21	0,689313579
18	C22 pan-allélique	19,0%	17,3%	1,10	0,58024118
114	C22 pan-allélique	16,6%	17,9%	0,93	0,534061396

Tableau 2: Quantification de des modifications de l'allèle muté et WT médiées par CRISPR/Cas9 *in vivo* et leurs impacts sur le taux de DNM2 à partir de la figure 13.
NA: non-applicable.

8 Bibliographie

Ame, J. C., C. Spenlehauer and G. de Murcia (2004). "The PARP superfamily." Bioessays **26**(8): 882-893.

Barrangou, R., C. Fremaux, H. Deveau, M. Richards, P. Boyaval, S. Moineau, D. A. Romero and P. Horvath (2007). "CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes." Science **315**(5819): 1709-1712.

Bengtsson, N. E., J. K. Hall, G. L. Odom, M. P. Phelps, C. R. Andrus, R. D. Hawkins, S. D. Hauschka, J. R. Chamberlain and J. S. Chamberlain (2017). "Muscle-specific CRISPR/Cas9 dystrophin gene editing ameliorates pathophysiology in a mouse model for Duchenne muscular dystrophy." Nat Commun **8**: 14454.

Bitoun, M., J. A. Bevilacqua, B. Prudhon, S. Maugenre, A. L. Taratuto, S. Monges, F. Lubieniecki, C. Cances, E. Uro-Coste, M. Mayer, M. Fardeau, N. B. Romero and P. Guicheney (2007). "Dynamin 2 mutations cause sporadic centronuclear myopathy with neonatal onset." Ann Neurol **62**(6): 666-670.

Bitoun, M., A. C. Durieux, B. Prudhon, J. A. Bevilacqua, A. Herledan, V. Sakanyan, A. Urtizberea, L. Cartier, N. B. Romero and P. Guicheney (2009). "Dynamin 2 mutations associated with human diseases impair clathrin-mediated receptor endocytosis." Hum Mutat **30**(10): 1419-1427.

Bitoun, M., S. Maugenre, P. Y. Jeannet, E. Lacene, X. Ferrer, P. Laforet, J. J. Martin, J. Laporte, H. Lochmuller, A. H. Beggs, M. Fardeau, B. Eymard, N. B. Romero and P. Guicheney (2005). "Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy." Nat Genet **37**(11): 1207-1209.

Boboila, C., F. W. Alt and B. Schwer (2012). "Classical and alternative end-joining pathways for repair of lymphocyte-specific and general DNA double-strand breaks." Adv Immunol **116**: 1-49.

Bohm, J., V. Biancalana, E. T. Dechene, M. Bitoun, C. R. Pierson, E. Schaefer, H. Karasoy, M. A. Dempsey, F. Klein, N. Dondaine, C. Kretz, N. Haumesser, C. Poirson, A. Toussaint, R. S. Greenleaf, M. A. Barger, L. J. Mahoney, P. B. Kang, E. Zanoteli, J. Vissing, N. Witting, A. Echaniz-Laguna, C. Wallgren-Pettersson, J. Dowling, L. Merlini, A. Oldfors, L. Bomme Ousager, J. Melki, A. Krause, C. Jern, A. S. Oliveira, F. Petit, A. Jacquette, A. Chaussenot, D. Mowat, B. Leheup, M. Cristofano, J. J. Poza Aldea, F. Michel, A. Furby, J. E. Llona, R. Van Coster, E. Bertini, J. A. Urtizberea, V. Drouin-Garraud, C. Beroud, B. Prudhon, M. Bedford, K. Mathews, L. A. Erby, S. A. Smith, J. Roggenbuck, C. A. Crowe, A. Brennan Spitale, S. C. Johal, A. A. Amato, L. A. Demmer, J. Jonas, B. T. Darras, T. D. Bird, M. Laurino, S. I. Welt, C. Trotter, P. Guicheney, S. Das, J. L. Mandel, A. H. Beggs and J. Laporte (2012). "Mutation spectrum in the large GTPase dynamin 2, and genotype-phenotype correlation in autosomal dominant centronuclear myopathy." Hum Mutat **33**(6): 949-959.

Brouns, S. J., M. M. Jore, M. Lundgren, E. R. Westra, R. J. Slijkhuis, A. P. Snijders, M. J. Dickman, K. S. Makarova, E. V. Koonin and J. van der Oost (2008). "Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes." Science **321**(5891): 960-964.

Burke, B. P., M. P. Boyd, H. Impey, L. R. Breton, J. S. Bartlett, G. P. Symonds and G. Hutter (2013). "CCR5 as a natural and modulated target for inhibition of HIV." Viruses **6**(1): 54-68.

Cao, H., J. Chen, M. Awoniyi, J. R. Henley and M. A. McNiven (2007). "Dynamin 2 mediates fluid-phase micropinocytosis in epithelial cells." J Cell Sci **120**(Pt 23): 4167-4177.

Cao, H., S. Weller, J. D. Orth, J. Chen, B. Huang, J. L. Chen, M. Stamnes and M. A. McNiven (2005). "Actin and Arf1-dependent recruitment of a cortactin-dynamin complex to the Golgi regulates post-Golgi transport." Nat Cell Biol **7**(5): 483-492.
Chen, B., L. A. Gilbert, B. A. Cimini, J. Schnitzbauer, W. Zhang, G. W. Li, J. Park, E. H. Blackburn, J. S. Weissman, L. S. Qi and B. Huang (2013). "Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system." Cell **155**(7): 1479-1491.
Chen, M. S., R. A. Obar, C. C. Schroeder, T. W. Austin, C. A. Poodry, S. C. Wadsworth and R. B. Vallee (1991). "Multiple forms of dynamin are encoded by shibire, a Drosophila gene involved in endocytosis." Nature **351**(6327): 583-586.
Chen, Y. and L. Yu (2018). "Development of Research into Autophagic Lysosome Reformation." Mol Cells **41**(1): 45-49.
Chin, Y. H., A. Lee, H. W. Kan, J. Laiman, M. C. Chuang, S. T. Hsieh and Y. W. Liu (2015). "Dynamin-2 mutations associated with centronuclear myopathy are hypermorphic and lead to T-tubule fragmentation." Hum Mol Genet **24**(19): 5542-5554.
Cho, S. W., S. Kim, Y. Kim, J. Kweon, H. S. Kim, S. Bae and J. S. Kim (2014). "Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases." Genome Res **24**(1): 132-141.
Cong, L., F. A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P. D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L. A. Marraffini and F. Zhang (2013). "Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems." Science **339**(6121): 819-823.
Cyranoski, D. (2016). "Chinese scientists to pioneer first human CRISPR trial." Nature **535**(7613): 476-477.
David, C., P. S. McPherson, O. Mundigl and P. de Camilli (1996). "A role of amphiphysin in synaptic vesicle endocytosis suggested by its binding to dynamin in nerve terminals." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(1): 331-335.
Davis, A. J., B. P. Chen and D. J. Chen (2014). "DNA-PK: a dynamic enzyme in a versatile DSB repair pathway." DNA Repair (Amst) **17**: 21-29.
DeFazio, L. G., R. M. Stansel, J. D. Griffith and G. Chu (2002). "Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase." EMBO J **21**(12): 3192-3200.
Deltcheva, E., K. Chylinski, C. M. Sharma, K. Gonzales, Y. Chao, Z. A. Pirzada, M. R. Eckert, J. Vogel and E. Charpentier (2011). "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III." Nature **471**(7340): 602-607.
Dever, D. P., R. O. Bak, A. Reinisch, J. Camarena, G. Washington, C. E. Nicolas, M. Pavel-Dinu, N. Saxena, A. B. Wilkens, S. Mantri, N. Uchida, A. Hendel, A. Narla, R. Majeti, K. I. Weinberg and M. H. Porteus (2016). "CRISPR/Cas9 beta-globin gene targeting in human haematopoietic stem cells." Nature **539**(7629): 384-389.
Di, A., D. J. Nelson, V. Bindokas, M. E. Brown, F. Libunao and H. C. Palfrey (2003). "Dynamin regulates focal exocytosis in phagocytosing macrophages." Mol Biol Cell **14**(5): 2016-2028.
Doudna, J. A. and E. Charpentier (2014). "Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9." Science **346**(6213): 1258096.
Downs, J. A. and S. P. Jackson (2004). "A means to a DNA end: the many roles of Ku." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(5): 367-378.
Durieux, A. C., A. Vignaud, B. Prudhon, M. T. Viou, M. Beuvin, S. Vassilopoulos, B. Fraysse, A. Ferry, J. Laine, N. B. Romero, P. Guicheney and M. Bitoun (2010). "A centronuclear myopathy-dynamin 2 mutation impairs skeletal muscle structure and function in mice." Hum Mol Genet **19**(24): 4820-4836.

Echaniz-Laguna, A., A. S. Nicot, S. Carre, J. Franques, C. Tranchant, N. Dondaine, V. Biancalana, J. L. Mandel and J. Laporte (2007). "Subtle central and peripheral nervous system abnormalities in a family with centronuclear myopathy and a novel dynamin 2 gene mutation." Neuromuscul Disord **17**(11-12): 955-959.
Ferguson, S. M. and P. De Camilli (2012). "Dynamin, a membrane-remodelling GTPase." Nat Rev Mol Cell Biol **13**(2): 75-88.
Ferguson, S. M., A. Raimondi, S. Paradise, H. Shen, K. Mesaki, A. Ferguson, O. Destaing, G. Ko, J. Takasaki, O. Cremona, O. T. E and P. De Camilli (2009). "Coordinated actions of actin and BAR proteins upstream of dynamin at endocytic clathrin-coated pits." Dev Cell **17**(6): 811-822.
Friedman, J. R., L. L. Lackner, M. West, J. R. DiBenedetto, J. Nunnari and G. K. Voeltz (2011). "ER tubules mark sites of mitochondrial division." Science **334**(6054): 358-362.
Fu, Y., J. D. Sander, D. Reyon, V. M. Cascio and J. K. Joung (2014). "Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs." Nat Biotechnol **32**(3): 279-284.
Galkina, S. I., N. V. Fedorova, M. V. Serebryakova, E. A. Arifulin, V. I. Stadnichuk, T. V. Gaponova, L. A. Baratova and G. F. Sud'ina (2015). "Inhibition of the GTPase dynamin or actin depolymerisation initiates outward plasma membrane tubulation/vesiculation (cytoneme formation) in neutrophils." Biol Cell **107**(5): 144-158.
Garneau, J. E., M. E. Dupuis, M. Villion, D. A. Romero, R. Barrangou, P. Boyaval, C. Fremaux, P. Horvath, A. H. Magadan and S. Moineau (2010). "The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA." Nature **468**(7320): 67-71.
Gasiunas, G., R. Barrangou, P. Horvath and V. Siksnys (2012). "Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(39): E2579-2586.
Gaudelli, N. M., A. C. Komor, H. A. Rees, M. S. Packer, A. H. Badran, D. I. Bryson and D. R. Liu (2017). "Programmable base editing of A*T to G*C in genomic DNA without DNA cleavage." Nature **551**(7681): 464-471.
Gibbs, E. M., N. F. Clarke, K. Rose, E. C. Oates, R. Webster, E. L. Feldman and J. J. Dowling (2013). "Neuromuscular junction abnormalities in DNM2-related centronuclear myopathy." J Mol Med (Berl) **91**(6): 727-737.
Gonzalez-Jamett, A. M., V. Haro-Acuna, F. Momboisse, P. Caviedes, J. A. Bevilacqua and A. M. Cardenas (2014). "Dynamin-2 in nervous system disorders." J Neurochem **128**(2): 210-223.
Haurwitz, R. E., M. Jinek, B. Wiedenheft, K. Zhou and J. A. Doudna (2010). "Sequence- and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease." Science **329**(5997): 1355-1358.
Heler, R., P. Samai, J. W. Modell, C. Weiner, G. W. Goldberg, D. Bikard and L. A. Marraffini (2015). "Cas9 specifies functional viral targets during CRISPR-Cas adaptation." Nature **519**(7542): 199-202.
Hendel, A., E. J. Fine, G. Bao and M. H. Porteus (2015). "Quantifying on- and off-target genome editing." Trends Biotechnol **33**(2): 132-140.
Hilton, I. B., A. M. D'Ippolito, C. M. Vockley, P. I. Thakore, G. E. Crawford, T. E. Reddy and C. A. Gersbach (2015). "Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers." Nat Biotechnol **33**(5): 510-517.
Hinshaw, J. E. and S. L. Schmid (1995). "Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding." Nature **374**(6518): 190-192.

Hohendahl, A., A. Roux and V. Galli (2016). "Structural insights into the centronuclear myopathy-associated functions of BIN1 and dynamin 2." J Struct Biol **196**(1): 37-47.
Hsu, P. D., E. S. Lander and F. Zhang (2014). "Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering." Cell **157**(6): 1262-1278.
Hu, L. J., J. Laporte, P. Kioschis, S. Heyberger, C. Kretz, A. Poustka, J. L. Mandel and N. Dahi (1996). "X-linked myotubular myopathy: refinement of the gene to a 280-kb region with new and highly informative microsatellite markers." Hum Genet **98**(2): 178-181.
Hussain, N. K., S. Jenna, M. Glogauer, C. C. Quinn, S. Wasiak, M. Guipponi, S. E. Antonarakis, B. K. Kay, T. P. Stossel, N. Lamarche-Vane and P. S. McPherson (2001). "Endocytic protein intersectin-l regulates actin assembly via Cdc42 and N-WASP." Nat Cell Biol **3**(10): 927-932.
Ishino, Y., H. Shinagawa, K. Makino, M. Amemura and A. Nakata (1987). "Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product." J Bacteriol **169**(12): 5429-5433.
James, N. G., M. A. Digman, J. A. Ross, B. Barylko, L. Wang, J. Li, Y. Chen, J. D. Mueller, E. Gratton, J. P. Albanesi and D. M. Jameson (2014). "A mutation associated with centronuclear myopathy enhances the size and stability of dynamin 2 complexes in cells." Biochim Biophys Acta **1840**(1): 315-321.
Jasin, M. (2000). "Chromosome breaks and genomic instability." Cancer Invest **18**(1): 78-86.
Jinek, M., K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna and E. Charpentier (2012). "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity." Science **337**(6096): 816-821.
Jinek, M., F. Jiang, D. W. Taylor, S. H. Sternberg, E. Kaya, E. Ma, C. Anders, M. Hauer, K. Zhou, S. Lin, M. Kaplan, A. T. Iavarone, E. Charpentier, E. Nogales and J. A. Doudna (2014). "Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation." Science **343**(6176): 1247997.
Jungbluth, H., C. Wallgren-Pettersson and J. Laporte (2008). "Centronuclear (myotubular) myopathy." Orphanet J Rare Dis **3**: 26.
Kamagata, E., T. Kudo, R. Kimura, H. Tanimukai, T. Morihara, M. G. Sadik, K. Kamino and M. Takeda (2009). "Decrease of dynamin 2 levels in late-onset Alzheimer's disease alters Abeta metabolism." Biochem Biophys Res Commun **379**(3): 691-695.
Kang, H., P. Minder, M. A. Park, W. T. Mesquitta, B. E. Torbett and Slukvin, II (2015). "CCR5 Disruption in Induced Pluripotent Stem Cells Using CRISPR/Cas9 Provides Selective Resistance of Immune Cells to CCR5-tropic HIV-1 Virus." Mol Ther Nucleic Acids **4**: e268.
Kearns, N. A., H. Pham, B. Tabak, R. M. Genga, N. J. Silverstein, M. Garber and R. Maehr (2015). "Functional annotation of native enhancers with a Cas9-histone demethylase fusion." Nat Methods **12**(5): 401-403.
Kenniston, J. A. and M. A. Lemmon (2010). "Dynamin GTPase regulation is altered by PH domain mutations found in centronuclear myopathy patients." EMBO J **29**(18): 3054-3067.
Kleinstiver, B. P., V. Pattanayak, M. S. Prew, S. Q. Tsai, N. T. Nguyen, Z. Zheng and J. K. Joung (2016). "High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects." Nature **529**(7587): 490-495.
Kleinstiver, B. P., M. S. Prew, S. Q. Tsai, V. V. Topkar, N. T. Nguyen, Z. Zheng, A. P. Gonzales, Z. Li, R. T. Peterson, J. R. Yeh, M. J. Aryee and J. K. Joung (2015). "Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities." Nature **523**(7561): 481-485.
Komor, A. C., A. H. Badran and D. R. Liu (2017). "CRISPR-Based Technologies for the Manipulation of Eukaryotic Genomes." Cell **168**(1-2): 20-36.

Komor, A. C., Y. B. Kim, M. S. Packer, J. A. Zuris and D. R. Liu (2016). "Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage." Nature **533**(7603): 420-424.
Koutsopoulos, O. S., C. Koch, V. Tosch, J. Bohm, K. N. North and J. Laporte (2011). "Mild functional differences of dynamin 2 mutations associated to centronuclear myopathy and Charcot-Marie Tooth peripheral neuropathy." PLoS One **6**(11): e27498.
Kouwenberg, C., J. Bohm, C. Erasmus, I. van Balken, S. Vos, B. Kusters, E. J. Kamsteeg, V. Biancalana, C. Koch, N. Dondaine, J. Laporte and N. Voermans (2017). "Dominant Centronuclear Myopathy with Early Childhood Onset due to a Novel Mutation in BIN1." J Neuromuscul Dis **4**(4): 349-355.
Laporte, J., L. J. Hu, C. Kretz, J. L. Mandel, P. Kioschis, J. F. Coy, S. M. Klauck, A. Poustka and N. Dahl (1996). "A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast." Nat Genet **13**(2): 175-182.
Larson, M. H., L. A. Gilbert, X. Wang, W. A. Lim, J. S. Weissman and L. S. Qi (2013). "CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression." Nat Protoc **8**(11): 2180-2196.
Lee, J. E., L. M. Westrate, H. Wu, C. Page and G. K. Voeltz (2016). "Multiple dynamin family members collaborate to drive mitochondrial division." Nature **540**(7631): 139-143.
Lee, K., M. Conboy, H. M. Park, F. Jiang, H. J. Kim, M. A. Dewitt, V. A. Mackley, K. Chang, A. Rao, C. Skinner, T. Shobha, M. Mehdipour, H. Liu, W. C. Huang, F. Lan, N. L. Bray, S. Li, J. E. Corn, K. Kataoka, J. A. Doudna, I. Conboy and N. Murthy (2017). "Nanoparticle delivery of Cas9 ribonucleoprotein and donor DNA in vivo induces homology-directed DNA repair." Nat Biomed Eng **1**: 889-901.
Lieber, M. R. (2008). "The mechanism of human nonhomologous DNA end joining." J Biol Chem **283**(1): 1-5.
Liu, Y., Y. Yang, X. Kang, B. Lin, Q. Yu, B. Song, G. Gao, Y. Chen, X. Sun, X. Li, L. Bu and Y. Fan (2017). "One-Step Biallelic and Scarless Correction of a beta-Thalassemia Mutation in Patient-Specific iPSCs without Drug Selection." Mol Ther Nucleic Acids **6**: 57-67.
Loerke, D., M. Mettlen, D. Yarar, K. Jaqaman, H. Jaqaman, G. Danuser and S. L. Schmid (2009). "Cargo and dynamin regulate clathrin-coated pit maturation." PLoS Biol **7**(3): e57.
Long, C., L. Amoasii, A. A. Mireault, J. R. McAnally, H. Li, E. Sanchez-Ortiz, S. Bhattacharyya, J. M. Shelton, R. Bassel-Duby and E. N. Olson (2016). "Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy." Science **351**(6271): 400-403.
Ma, H., L. C. Tu, A. Naseri, M. Huisman, S. Zhang, D. Grunwald and T. Pederson (2016). "Multiplexed labeling of genomic loci with dCas9 and engineered sgRNAs using CRISPRainbow." Nat Biotechnol **34**(5): 528-530.
Maier, O., M. Knoblich and P. Westermann (1996). "Dynamin II binds to the trans-Golgi network." Biochem Biophys Res Commun **223**(2): 229-233.
Makarova, K. S. and E. V. Koonin (2015). "Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems." Methods Mol Biol **1311**: 47-75.
Marraffini, L. A. and E. J. Sontheimer (2008). "CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA." Science **322**(5909): 1843-1845.
Maruyama, T., S. K. Dougan, M. C. Truttmann, A. M. Bilate, J. R. Ingram and H. L. Ploegh (2015). "Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining." Nat Biotechnol **33**(5): 538-542.

McEntagart, M., G. Parsons, A. Buj-Bello, V. Biancalana, I. Fenton, M. Little, M. Krawczak, N. Thomas, G. Herman, A. Clarke and C. Wallgren-Pettersson (2002). "Genotype-phenotype correlations in X-linked myotubular myopathy." Neuromuscul Disord **12**(10): 939-946.
McNiven, M. A., L. Kim, E. W. Krueger, J. D. Orth, H. Cao and T. W. Wong (2000). "Regulated interactions between dynamin and the actin-binding protein cortactin modulate cell shape." J Cell Biol **151**(1): 187-198.
McPherson, P. S., K. Takei, S. L. Schmid and P. De Camilli (1994). "p145, a major Grb2-binding protein in brain, is co-localized with dynamin in nerve terminals where it undergoes activity-dependent dephosphorylation." J Biol Chem **269**(48): 30132-30139.
Mimitou, E. P. and L. S. Symington (2008). "Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing." Nature **455**(7214): 770-774.
Mojica, F. J., C. Diez-Villasenor, J. Garcia-Martinez and E. Soria (2005). "Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements." J Mol Evol **60**(2): 174-182.
Mojica, F. J., C. Ferrer, G. Juez and F. Rodriguez-Valera (1995). "Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea Haloferax mediterranei and Haloferax volcanii and could be involved in replicon partitioning." Mol Microbiol **17**(1): 85-93.
Mojica, F. J., G. Juez and F. Rodriguez-Valera (1993). "Transcription at different salinities of Haloferax mediterranei sequences adjacent to partially modified PstI sites." Mol Microbiol **9**(3): 613-621.
Mooren, O. L., T. I. Kotova, A. J. Moore and D. A. Schafer (2009). "Dynamin2 GTPase and cortactin remodel actin filaments." J Biol Chem **284**(36): 23995-24005.
Muhlberg, A. B., D. E. Warnock and S. L. Schmid (1997). "Domain structure and intramolecular regulation of dynamin GTPase." EMBO J **16**(22): 6676-6683.
Nelson, C. E., C. H. Hakim, D. G. Ousterout, P. I. Thakore, E. A. Moreb, R. M. Castellanos Rivera, S. Madhavan, X. Pan, F. A. Ran, W. X. Yan, A. Asokan, F. Zhang, D. Duan and C. A. Gersbach (2016). "In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy." Science **351**(6271): 403-407.
Nicot, A. S., A. Toussaint, V. Tosch, C. Kretz, C. Wallgren-Pettersson, E. Iwarsson, H. Kingston, J. M. Garnier, V. Biancalana, A. Oldfors, J. L. Mandel and J. Laporte (2007). "Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy." Nat Genet **39**(9): 1134-1139.
Nishimasu, H., F. A. Ran, P. D. Hsu, S. Konermann, S. I. Shehata, N. Dohmae, R. Ishitani, F. Zhang and O. Nureki (2014). "Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA." Cell **156**(5): 935-949.
Nunez, J. K., L. B. Harrington, P. J. Kranzusch, A. N. Engelman and J. A. Doudna (2015). "Foreign DNA capture during CRISPR-Cas adaptive immunity." Nature **527**(7579): 535-538.
Nunez, J. K., A. S. Lee, A. Engelman and J. A. Doudna (2015). "Integrase-mediated spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity." Nature **519**(7542): 193-198.
Obar, R. A., C. A. Collins, J. A. Hammarback, H. S. Shpetner and R. B. Vallee (1990). "Molecular cloning of the microtubule-associated mechanochemical enzyme dynamin reveals homology with a new family of GTP-binding proteins." Nature **347**(6290): 256-261.
Ochi, T., A. N. Blackford, J. Coates, S. Jhujh, S. Mehmood, N. Tamura, J. Travers, Q. Wu, V. M. Draviam, C. V. Robinson, T. L. Blundell and S. P. Jackson (2015). "DNA repair. PAXX, a paralog of XRCC4 and XLF, interacts with Ku to promote DNA double-strand break repair." Science **347**(6218): 185-188.

Oh, P., D. P. McIntosh and J. E. Schnitzer (1998). "Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium." J Cell Biol **141**(1): 101-114.
Orth, J. D. and M. A. McNiven (2003). "Dynamin at the actin-membrane interface." Curr Opin Cell Biol **15**(1): 31-39.
Pattanayak, V., S. Lin, J. P. Guilinger, E. Ma, J. A. Doudna and D. R. Liu (2013). "High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity." Nat Biotechnol **31**(9): 839-843.
Paull, T. T. (2010). "Making the best of the loose ends: Mre11/Rad50 complexes and Sae2 promote DNA double-strand break resection." DNA Repair (Amst) **9**(12): 1283-1291.
Ran, F. A., P. D. Hsu, C. Y. Lin, J. S. Gootenberg, S. Konermann, A. E. Trevino, D. A. Scott, A. Inoue, S. Matoba, Y. Zhang and F. Zhang (2013). "Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity." Cell **154**(6): 1380-1389.
Rangarajan, E. S., H. Park, E. Fortin, J. Sygusch and T. Izard (2010). "Mechanism of aldolase control of sorting nexin 9 function in endocytosis." J Biol Chem **285**(16): 11983-11990.
Rass, E., A. Grabarz, I. Plo, J. Gautier, P. Bertrand and B. S. Lopez (2009). "Role of Mre11 in chromosomal nonhomologous end joining in mammalian cells." Nat Struct Mol Biol **16**(8): 819-824.
Reardon, S. (2015). "Leukaemia success heralds wave of gene-editing therapies." Nature **527**(7577): 146-147.
Reubold, T. F., K. Faelber, N. Plattner, Y. Posor, K. Ketel, U. Curth, J. Schlegel, R. Anand, D. J. Manstein, F. Noe, V. Haucke, O. Daumke and S. Eschenburg (2015). "Crystal structure of the dynamin tetramer." Nature **525**(7569): 404-408.
Romero, N. B. (2010). "Centronuclear myopathies: a widening concept." Neuromuscul Disord **20**(4): 223-228.
Romero, N. B. and M. Bitoun (2011). "Centronuclear myopathies." Semin Pediatr Neurol **18**(4): 250-256.
Romero, N. B. and N. F. Clarke (2013). "Congenital myopathies." Handb Clin Neurol **113**: 1321-1336.
Romeu, A. and L. Arola (2014). "Classical dynamin DNM1 and DNM3 genes attain maximum expression in the normal human central nervous system." BMC Res Notes **7**: 188.
Schlegel, B. P., F. M. Jodelka and R. Nunez (2006). "BRCA1 promotes induction of ssDNA by ionizing radiation." Cancer Res **66**(10): 5181-5189.
Schulze, R. J., S. G. Weller, B. Schroeder, E. W. Krueger, S. Chi, C. A. Casey and M. A. McNiven (2013). "Lipid droplet breakdown requires dynamin 2 for vesiculation of autolysosomal tubules in hepatocytes." J Cell Biol **203**(2): 315-326.
Shajahan, A. N., B. K. Timblin, R. Sandoval, C. Tiruppathi, A. B. Malik and R. D. Minshall (2004). "Role of Src-induced dynamin-2 phosphorylation in caveolae-mediated endocytosis in endothelial cells." J Biol Chem **279**(19): 20392-20400.
Sharma, C. M., S. Hoffmann, F. Darfeuille, J. Reignier, S. Findeiss, A. Sittka, S. Chabas, K. Reiche, J. Hackermuller, R. Reinhardt, P. F. Stadler and J. Vogel (2010). "The primary transcriptome of the major human pathogen Helicobacter pylori." Nature **464**(7286): 250-255.
Shen, B., W. Zhang, J. Zhang, J. Zhou, J. Wang, L. Chen, L. Wang, A. Hodgkins, V. Iyer, X. Huang and W. C. Skarnes (2014). "Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects." Nat Methods **11**(4): 399-402.

Shmakov, S., O. O. Abudayyeh, K. S. Makarova, Y. I. Wolf, J. S. Gootenberg, E. Semenova, L. Minakhin, J. Joung, S. Konermann, K. Severinov, F. Zhang and E. V. Koonin (2015). "Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems." Mol Cell **60**(3): 385-397.
Shpetner, H. S. and R. B. Vallee (1989). "Identification of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules." Cell **59**(3): 421-432.
Singleton, B. K., M. I. Torres-Arzayus, S. T. Rottinghaus, G. E. Taccioli and P. A. Jeggo (1999). "The C terminus of Ku80 activates the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit." Mol Cell Biol **19**(5): 3267-3277.
Slaymaker, I. M., L. Gao, B. Zetsche, D. A. Scott, W. X. Yan and F. Zhang (2016). "Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity." Science **351**(6268): 84-88.
Smolenicka, Z., J. Laporte, L. Hu, N. Dahl, J. Fitzpatrick, W. Kress and S. Liechti-Gallati (1996). "X-linked myotubular myopathy: refinement of the critical gene region." Neuromuscul Disord **6**(4): 275-281.
Song, J., D. Yang, J. Xu, T. Zhu, Y. E. Chen and J. Zhang (2016). "RS-1 enhances CRISPR/Cas9- and TALEN-mediated knock-in efficiency." Nat Commun **7**: 10548.
Sorek, R., V. Kunin and P. Hugenholtz (2008). "CRISPR--a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea." Nat Rev Microbiol **6**(3): 181-186.
Stark, J. M., A. J. Pierce, J. Oh, A. Pastink and M. Jasin (2004). "Genetic steps of mammalian homologous repair with distinct mutagenic consequences." Mol Cell Biol **24**(21): 9305-9316.
Sternberg, S. H., B. LaFrance, M. Kaplan and J. A. Doudna (2015). "Conformational control of DNA target cleavage by CRISPR-Cas9." Nature **527**(7576): 110-113.
Su, S., B. Hu, J. Shao, B. Shen, J. Du, Y. Du, J. Zhou, L. Yu, L. Zhang, F. Chen, H. Sha, L. Cheng, F. Meng, Z. Zou, X. Huang and B. Liu (2016). "CRISPR-Cas9 mediated efficient PD-1 disruption on human primary T cells from cancer patients." Sci Rep **6**: 20070.
Sweitzer, S. M. and J. E. Hinshaw (1998). "Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation." Cell **93**(6): 1021-1029.
Sy, S. M., M. S. Huen and J. Chen (2009). "PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(17): 7155-7160.
Sy, S. M., M. S. Huen, Y. Zhu and J. Chen (2009). "PALB2 regulates recombinational repair through chromatin association and oligomerization." J Biol Chem **284**(27): 18302-18310.
Tabebordbar, M., K. Zhu, J. K. W. Cheng, W. L. Chew, J. J. Widrick, W. X. Yan, C. Maesner, E. Y. Wu, R. Xiao, F. A. Ran, L. Cong, F. Zhang, L. H. Vandenberghe, G. M. Church and A. J. Wagers (2016). "In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells." Science **351**(6271): 407-411.
Takei, K., P. S. McPherson, S. L. Schmid and P. De Camilli (1995). "Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-gamma S in nerve terminals." Nature **374**(6518): 186-190.
Tanabe, K. and K. Takei (2009). "Dynamic instability of microtubules requires dynamin 2 and is impaired in a Charcot-Marie-Tooth mutant." J Cell Biol **185**(6): 939-948.
Thompson, H. M., H. Cao, J. Chen, U. Euteneuer and M. A. McNiven (2004). "Dynamin 2 binds gamma-tubulin and participates in centrosome cohesion." Nat Cell Biol **6**(4): 335-342.
Tilokani, L., S. Nagashima, V. Paupe and J. Prudent (2018). "Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms." Essays Biochem **62**(3): 341-360.

Trochet, D., B. Prudhon, M. Beuvin, C. Peccate, S. Lorain, L. Julien, S. Benkhelifa-Ziyyat, A. Rabai, K. Mamchaoui, A. Ferry, J. Laporte, P. Guicheney, S. Vassilopoulos and M. Bitoun (2018). "Allele-specific silencing therapy for Dynamin 2-related dominant centronuclear myopathy." EMBO Mol Med **10**(2): 239-253.
van Dam, E. M. and W. Stoorvogel (2002). "Dynamin-dependent transferrin receptor recycling by endosome-derived clathrin-coated vesicles." Mol Biol Cell **13**(1): 169-182.
van der Bliek, A. M. and E. M. Meyerowitz (1991). "Dynamin-like protein encoded by the Drosophila shibire gene associated with vesicular traffic." Nature **351**(6325): 411-414.
Wang, L., B. Barylko, C. Byers, J. A. Ross, D. M. Jameson and J. P. Albanesi (2010). "Dynamin 2 mutants linked to centronuclear myopathies form abnormally stable polymers." J Biol Chem **285**(30): 22753-22757.
Wang, Y., G. Ghosh and E. A. Hendrickson (2009). "Ku86 represses lethal telomere deletion events in human somatic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(30): 12430-12435.
Warnock, D. E., T. Baba and S. L. Schmid (1997). "Ubiquitously expressed dynamin-II has a higher intrinsic GTPase activity and a greater propensity for self-assembly than neuronal dynamin-I." Mol Biol Cell **8**(12): 2553-2562.
Wei, Y., M. T. Chesne, R. M. Terns and M. P. Terns (2015). "Sequences spanning the leader-repeat junction mediate CRISPR adaptation to phage in Streptococcus thermophilus." Nucleic Acids Res **43**(3): 1749-1758.
Wei, Y., R. M. Terns and M. P. Terns (2015). "Cas9 function and host genome sampling in Type II-A CRISPR-Cas adaptation." Genes Dev **29**(4): 356-361.
West, S. C. (2003). "Molecular views of recombination proteins and their control." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(6): 435-445.
Yin, H., C. Q. Song, J. R. Dorkin, L. J. Zhu, Y. Li, Q. Wu, A. Park, J. Yang, S. Suresh, A. Bizhanova, A. Gupta, M. F. Bolukbasi, S. Walsh, R. L. Bogorad, G. Gao, Z. Weng, Y. Dong, V. Koteliansky, S. A. Wolfe, R. Langer, W. Xue and D. G. Anderson (2016). "Therapeutic genome editing by combined viral and non-viral delivery of CRISPR system components in vivo." Nat Biotechnol **34**(3): 328-333.
Yin, H., W. Xue, S. Chen, R. L. Bogorad, E. Benedetti, M. Grompe, V. Koteliansky, P. A. Sharp, T. Jacks and D. G. Anderson (2014). "Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype." Nat Biotechnol **32**(6): 551-553.
Yoon, Y., K. R. Pitts and M. A. McNiven (2001). "Mammalian dynamin-like protein DLP1 tubulates membranes." Mol Biol Cell **12**(9): 2894-2905.
Zhang, Y., N. Heidrich, B. J. Ampattu, C. W. Gunderson, H. S. Seifert, C. Schoen, J. Vogel and E. J. Sontheimer (2013). "Processing-independent CRISPR RNAs limit natural transformation in Neisseria meningitidis." Mol Cell **50**(4): 488-503.
Zuchner, S., M. Noureddine, M. Kennerson, K. Verhoeven, K. Claeys, P. De Jonghe, J. Merory, S. A. Oliveira, M. C. Speer, J. E. Stenger, G. Walizada, D. Zhu, M. A. Pericak-Vance, G. Nicholson, V. Timmerman and J. M. Vance (2005). "Mutations in the pleckstrin homology domain of dynamin 2 cause dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth disease." Nat Genet **37**(3): 289-294.