

When we began this work, there was no direct evidence that DUX4 was responsible for FSHD, and little interest in the significance of protein similarities with muscle regeneration genes. The field was mainly focused on genes nearby but not at the actual site of the FSHD mutation on chromosome 4. As there was no consensus on which gene was at the root of FSHD, funding agencies were unenthusiastic about research projects involving the deep study of any of these genes. My own laboratory was very fortunate to have received philanthropic support from the Pacific Northwest Friends of FSHD Research and the FSH Society to pursue research into DUX4 during this time. Several important findings including work by Jane Hewitt showing that mice have a similar gene, implying that DUX4 is not junk DNA, and by Alexandra Belayew showing that the DUX4 gene is expressed and the protein is present in FSHD, as well as our own work on the pathological effects of DUX4, have pushed DUX4 into the fore. The recent publication by Silvere van der Maarel's research team in Leiden and collaborators in Seattle and Rochester demonstrating that FSHD can be linked to chromosome 10 if a copy of DUX4 jumps over from chromosome 4 really brings DUX4 into the limelight, as it is very hard to explain by invoking any gene other than DUX4. In concert with this accumulation of evidence in favor of DUX4, interest by the NIH in FSHD (measured by dollars spent) has also increased. This is a trend that will need to continue, as basic research naturally leads into the development of therapies targeting the DUX4 gene. Because of the lack of consensus on a specific mechanism, FSHD research funding has lagged far behind other muscular dystrophies. By all indications, with the recent work on DUX4, this tide appears to be changing, and we are finally entering into a hopeful time for research towards a therapy for FSHD.

A minimum genetic region is required for FSHD. The *Science* paper shows one FSHD patient who has a very rare translocation of the minimum FSHD causing region from chromosome 4 that was moved to chromosome 10. Placing the minimum region into another chromosomal context DUX4 really brings DUX4 into the limelight, as it is very hard to explain by invoking any gene other than DUX4. (Source: Dr. Stephen Tapscott's 2010 FSH Society Patient and Researcher Network meeting presentation on August 1, 2010, Las Vegas, Nevada.)

Quand nous avons commencé cette étude, le lien entre le DUX4 et la FSHD n'avait pas été établi, et on s'intéressait peu à ce que signifiait la similitude entre les protéines et les gènes à l'origine de la régénération des muscles. La recherche ne s'intéressait pas particulièrement au site de la mutation de la FSHD sur le chromosome 4, mais aux gènes qui l'entouraient. Les agences de financement n'étaient pas favorables aux projets de recherche dédiés à l'étude de l'un de ces gènes dans la mesure où il n'y avait aucun consensus concernant le gène à l'origine de la FSHD. Mon laboratoire a donc vraiment eu beaucoup de chance de recevoir le soutien du Pacific Northwest Friends of FSHD Research et de la FSH Society pour poursuivre ses recherches sur le DUX4 pendant cette période. Les travaux de Jane Hewitt montrant que les souris ont un gène similaire, ce qui implique que le DUX4 n'est pas de l'ADN « poubelle », celui d'Alexandra Belayew démontrant l'expression du gène DUX4 et la présence de la protéine dans la FSHD, ainsi que notre propre recherche sur les effets pathogènes du DUX4, ont mis l'importance de ce gène en évidence. La récente publication de l'équipe de recherche de Silvere van der Maarel à Leiden et de ses collaborateurs à Seattle et Rochester démontrant qu'un lien peut être établi entre la FSHD et le chromosome 10, si une copie du DUX4 provenant du chromosome 4 le modifie, met vraiment le DUX4 sous les projecteurs car la démonstration de cette théorie repose sur le DUX4 lui-même. Le NIH s'est de plus en plus intéressé à la recherche sur la FSHD et l'a financée en conséquence pendant la période où les preuves s'accumulaient en faveur de l'importance du rôle du DUX4. Il faut poursuivre dans ce sens car la recherche fondamentale est à l'origine du développement de traitements ciblant le gène du DUX4. La recherche sur la FSHD est beaucoup moins bien financée que celle d'autres dystrophies musculaires en raison de l'absence de consensus quant à un mécanisme spécifique l'expliquant. Tout indique avec les récentes découvertes à propos du DUX4 que les temps changent et que l'on peut espérer que la recherche se concentre sur une thérapie pour lutter contre la FSHD.

Pour que la FSHD se développe il faut qu'une région génétique minimum soit atteinte. L'article paru dans *Science* évoque un patient qui souffre d'un transfert très inhabituel

Perspectives and Reactions: The long walk towards a key role for dux4 in fshd

... from page 10

tially deleted D4Z4 locus in a patient with FSHD identifies a putative gene within each 3.3 kb element. *Gene*, 236, 25-32, 1999.

5. Kowaljow V, Marcowycz A, Ansseau E, Conde CB, Sauvage S, Mattéotti C, Arias C, Corona ED, Nuñez NG, Leo O, Wattiez R, Figlewicz D, Laoudj-Chenivresse D, Belayew A, Coppée F, Rosa AL The DUX4 gene at the FSHD1A locus encodes a pro-apoptotic protein. *Neuromuscul Disord*. 17:611-23, 2007.
6. Dixit M, Ansseau E, Tassin A, Winokur S, Shi R, Qian H, Sauvage S, Mattéotti C, van Acker AM, Leo O, Figlewicz D, Barro M, Laoudj-Chenivresse D, Belayew A, Coppée F, Chen YW. DUX4, a candidate gene of facioscapulohumeral muscular dystrophy, encodes a transcriptional activator of PITX1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:18157-18162, 2007.
7. Bosnakovski D, Xu Z, Gang FJ, Galindo CL, Liu M, Simsek T, Garner HR, Agha-Mohammadi S, Tassin A, Coppée F, Belayew A, Perlingeiro RC, Kyba M. An isogenetic myoblast expression screen identifies DUX4-mediated FSHD-associated molecular pathologies. *EMBO J*. 27:2766-79, 2008.

Research

Perspectives and Reaction s FSHD and DUX4 gene expression: a genetic signature of FSHD families

by Alberto Luis Rosa, M.D., Ph.D.
Fundación Allend, Hipólito Irigoyen, Córdoba, Argentina

Clinical genetic research is not just a medical or

d'une région minimum du chromosome 4 au chromosome 10, occasionnant une FSHD. Placer la région minimum dans un autre contexte chromosomique met vraiment le DUX 4 en exergue car ce phénomène ne peut s'expliquer qu'en évoquant le gène du DUX4. (Source : Conférence du Dr Stephen Tapscott du réseau des chercheurs et de l'association des malades de FSH présentée à Las Vegas dans le Nevada, le 1^{er} Août 2010.

Différents points de vue et Réactions : La difficulté de prouver le rôle clé du DUX4 dans la FSHD

... À partir de la page 10

Séquence de nucléotides du locus du D4Z4 partiellement détruit chez un patient souffrant de FSHD identifiant un gène putatif contenant 3.3 kb élément. *Gène*, 236, 25-32, 1999.

5. Kowaljow V, Marcowycz A, Ansseau E, Conde CB, Sauvage S, Mattéotti C, Arias C, Corona ED, Nuñez NG, Leo O, Wattiez R, Figlewicz D, Laoudj-Chenivresse D, Belayew A, Coppée F, Rosa AL Le gène DUX4 au locus FSHD1A code une protéine pro-apoptotique. *Trouble neuromusculaire*. 17:611-23, 2007.
6. Dixit M, Ansseau E, Tassin A, Winokur S, Shi R, Qian H, Sauvage S, Mattéotti C, van Acker AM, Leo O, Figlewicz D, Barro M, Laoudj-Chenivresse D, Belayew A, Coppée F, Chen YW. DUX4, un gène candidat de la dystrophie musculaire facio-scapulo-humérale, code un activateur transcriptionnel de PITX1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:18157-18162, 2007.
7. Bosnakovski D, Xu Z, Gang FJ, Galindo CL, Liu M, Simsek T, Garner HR, Agha-Mohammadi S, Tassin A, Coppée F, Belayew A, Perlingeiro RC, Kyba M. Image de myoblaste isogénétique identifiant les pathologies moléculaires transmises par l'intermédiaire du DUX4 et associées à la FSHD. *EMBO J*. 27:2766-79, 2008.

Recherche

Opinions et réactions La FSHD et l'expression du gène DUX4 : une particularité génétique de l'ensemble des FSHD

Par Alberto Luis Rosa, M.D., Ph.D.
Fundación Allend, Hipólito Irigoyen, Córdoba, Argentina

La recherche génétique n'est pas une affaire
purement médicale ou scientifique. Cela fait

scientific thing. It is part of the everyday life of patients carrying inherited diseases and their families. Scientific studies certainly contribute to the happiness and hope of patients all around the world. Patients, families, doctors and scientists interested in FSHD know about these feelings since (at least!) the year 1992: in that year a fruitful collaboration between research groups from UK and The Netherlands recognized that FSHD is associated to shortening of a portion of chromosome 4 (i.e. D4Z4 alleles: contractions of the polymorphic tandem repeat D4Z4 at the tip of the large arm of chromosome 4). FSHD patients and their families received this exciting news with enthusiasm. A detailed molecular analysis of the D4Z4 region was later presented by the same research groups². Those studies contributed to the beginning of an intense international research devoted to decipher the cryptic pathogenic mechanism underlying FSHD. The role of D4Z4 in FSHD was quickly revisited: in 1996 it was demonstrated that individuals carrying a complete deletion of the D4Z4 tandem do not have FSHD₃, meaning that at least one residual D4Z4 unit is required to cause the disease.

The connection between D4Z4 and FSHD increased in complexity when scientists found the existence of interchromosomal exchanges between homologous regions of chromosomes 4 and 10⁴. Only contractions of chromosome 4-linked D4Z4 alleles appeared to cause FSHD. Scientists concluded that these observations "complicate the search for the FSHD gene but also imply the presence of a potentially novel molecular pathogenesis"⁵. Twelve additional years of intense and elegant formal and molecular genetic research, mostly performed by Drs. Lemmers, van der Maarel, Frants and colleagues in Leiden, the Netherlands, revealed two puzzling characteristics of pathological FSHD chromosomes: 1) FSHD patients carry particular ("permissive") DNA sequences at the end of the D4Z4 tandem repeat^{6,13}, and 2) D4Z4 sequences in FSHD patients are less "peppered" by DNA methylation⁷ (an epigenetic watermark of DNA). FSHD families around the world have been extremely valuable in all of these studies: DNA samples obtained from patients all over the world provide scientists with a large collection of chromosome variants and DNA diversity, allowing us to challenge hypotheses derived from initial examinations of a few clinical cases.

Along these years, many other excellent papers have been published concerning the cellular and molecular biology of FSHD. Two predominant ideas have influenced scientists to pursue their various research avenues:

1. contraction of the D4Z4 tandem lead to aberrant expression of a gene located outside of the D4Z4 tandem region gene⁸, and,

partie du quotidien des porteurs de maladies génétiques ainsi que celui de leur famille. Les études scientifiques entretiennent l'espoir et contribuent au bien-être des patients partout dans le monde. Les malades, les familles, les médecins et les scientifiques qui s'intéressent à la FSHD savent de quoi il s'agit depuis 1992 au moins, année pendant laquelle des groupes de recherche du Royaume-Uni ont étroitement collaboré avec leurs homologues des Pays Bas, ce qui leur a permis de reconnaître que la FSHD est associée à un raccourcissement d'une partie du chromosome 4. Par exemple, pour les allèles D4Z4, des contractions du tandem polymorphique les répètent à l'extrémité du bras long du chromosome 4. Les malades souffrant de FSHD et leur famille ont reçu cette nouvelle exaltante avec enthousiasme. Les mêmes groupes de recherche ont présenté par la suite une analyse moléculaire détaillée de la région du D4Z4. Ces études ont marqué le début d'une recherche internationale intense consacrée au déchiffrement du mécanisme pathogène crypté sous-jacent à la FSHD. Les recherches ont modifié la vision que l'on avait du rôle du D4Z4 : en 1996 il a été démontré que les individus porteurs d'une suppression totale de la paire d'allèles D4Z4 ne sont pas atteints de FSHD₃, ce qui signifie que pour déclencher la maladie il faut qu'il reste au moins un élément de cette paire.

Le lien entre le D4Z4 et la FSHD est devenu plus complexe lorsque les scientifiques ont constaté l'existence d'échanges inter chromosomiques entre des régions homologues des chromosomes 4 et 10⁴. Seules les contractions d'allèles D4Z4 liées au chromosome 4 semblent générer une FSHD. Les scientifiques estiment que ces observations « compliquent la recherche du gène à l'origine de la FSHD et impliquent également l'existence d'une nouvelle pathogénèse moléculaire potentielle ». Les Docteurs Lemmers, van der Maarel et Frants et leurs collègues de Leiden, aux Pays Bas, avec l'aide d'autres chercheurs, ont poursuivi leur recherche génétique moléculaire et formelle pendant douze ans et y ont travaillé intensivement. Ils ont ainsi révélé deux caractéristiques déconcertantes des chromosomes pathogènes de la FSHD : la première est que les malades souffrant de FSHD sont porteurs de séquences spécifiques d'ADN « permissif » en fin de duplication de la paire D4Z4, et la deuxième que leurs séquences de D4Z4 sont moins atteintes par la méthylation de l'ADN, un filigrane épi génétique de l'ADN. La participation des familles du monde entier atteintes par la FSHD a été très utile et importante pour ces études. Les échantillons d'ADN prélevés sur ces malades ont fourni un large éventail de variants chromosomiques et une

2. the D4Z4 tandem itself was just 'junk' DNA. Indeed, efforts from various laboratories around the world to recognize expression of a gene within the D4Z4 tandem were unsuccessful. In 1998, however, two groups, Dr. Belayew's in Belgium and my own research group in Argentina, started a series of studies considering a risky (!) alternative hypothesis: "shortening of the D4Z4 tandem repeat modifies its chromosome configuration leading to abnormal expression of a D4Z4-encoded toxic protein that causes FSHD_{9,10}. The hypothesis was independently formulated by Drs. Hewitt and Belayew in Europe and by my

Original drawing presented at the University of Cordoba (Argentina) in 1998 by Drs. Kowaljow and Rosa challenging the more appealing hypothesis at that time (represented in panel A) which proposed that shortening of the tandem D4Z4 (rectangle) allows spreading of telomeric (T) heterochromatin (peaked waves) all over the centromeric (C) proximal region (smooth waves) altering the expression of genes external to D4Z4. On Panel B, Drs. Rosa and Kowaljow proposed an alternative hypothesis: shortening of the D4Z4 tandem leaves a relaxed chromatin environment at the residual D4Z4 units allowing binding of transcription factors and expression of DUX4. The drawing proposes that the hypothetical DUX4 gene (at that time considered a pseudogene) is epigenetically controlled and that abnormally expressed DUX4 protein (i.e. higher amounts, abnormal muscle tissue patterns and/or altered developmental expression) produces FSHD.

Current members of Dr. Rosa's laboratory in Argentina. From left to right: Dr. Alberto L. Rosa, post-doctoral student Dr. Daniela Jacquelin and Ph.D. student E. Daniel Corona

laboratory in Argentina. A courageous doctoral (Ph.D.) student in my research group, Valeria Kowaljow, explored between 1998 and 2004 "the potential pathogenic role in FSHD of the putative toxic protein DUX4, encoded at the tandem repeat D4Z4 at 4q35"¹⁰.

grande diversité d'ADNs aux scientifiques nous permettant de contester des hypothèses formulées à la suite des premières études de plusieurs cas cliniques.

Par ailleurs, pendant toutes ces années de nombreux articles de qualité sur la biologie moléculaire et cellulaire de la FSHD ont été publiés. Deux idées prédominantes ont influencé les scientifiques dans le choix de leurs différents axes de recherche :

1. La contraction de la paire D4Z4 entraîne l'expression aberrante d'un gène situé en dehors de la région du gène de la paire D4Z4, et,
2. la paire D4Z4 elle-même n'est constituée que d'ADN « poubelle ».

Plusieurs laboratoires du monde entier ont en effet essayé de reconnaître l'expression d'un gène de la paire D4Z4 mais n'y sont pas parvenus.

Le groupe du Dr Belayew en Belgique et mon propre groupe de recherche en Argentine ont commencé une série d'études s'intéressant à une hypothèse alternative risquée (!) en 1998. Le raccourcissement de la duplication de la paire D4Z4 modifie la configuration de son chromosome, ce qui engendre l'expression d'une protéine toxique codée D4Z4, à l'origine de la FSHD_{9, 10}. Cette hypothèse a été indépendamment formulée par les Docteurs Hewitt et Belayew en Europe et par mon

Schéma original présenté à l'Université de Cordoba en Argentine en 1998 par les docteurs Kowaljow et Rosa remettant en question l'hypothèse la plus répandue à l'époque (représentée sur le panneau A) qui suggère que le raccourcissement de la paire D4Z4 (rectangle) permet la propagation de l'hétéro chromatine (tracé supérieur) télomérique (T) sur l'ensemble de la région proximale (tracé inférieur) centromérique (C) ce qui a pour conséquence de modifier l'expression des gènes indépendants du D4Z4. Sur le panneau B les Docteurs Rosa et Kowaljow proposent une hypothèse alternative : le raccourcissement du tandem D4Z4 laisse un environnement chromatinien relâché aux unités résiduelles de D4Z4 permettant la liaison des facteurs de transcription et l'expression du DUX4. Le schéma suggère que le gène hypothétique du DUX4 (considéré à l'époque comme un pseudo gène) est épi génétiquement contrôlé et que la protéine DUX4 s'exprime anormalement (par des modèles de tissus musculaires en plus grande quantité et anormaux et/ou une expression de développement altéré) ce qui engendre la FSHD.

Les membres actuels du laboratoire du Docteur Rosa en Argentine. De gauche à droite : Le Dr. Alberto L. Rosa, l'étudiant post-doctoral Dr. Daniela Jacquelin et le doctorant (Ph.D) E. Daniel Coron.

laboratoire en Argentine. Une doctorante (Ph.D.) de mon groupe de recherche, Valeria Kowaljow, a étudié de près « le rôle pathogène potentiel de la protéine toxique putative DUX4, codée au niveau de la duplication de la paire D4Z4 au 4q3510 dans la FSHD » entre 1998 et 2004.