

**INSTITUT DE GÉNÉTIQUE ET DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET  
CELLULAIRE**

**CNRS-INSERM-UNIVERSITÉ DE STRASBOURG**

**THÈSE**

Présentée en vue de l'obtention  
du grade de Docteur de l'Université de Strasbourg

**DISCIPLINE**

Science du Vivant- Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

**PAR VALÉRIE TOSCH-LIENHART**

**Les protéines impliquées dans les  
myopathies à centralisation des noyaux :  
Comprendre leur lien et les conséquences de  
leurs mutations**

Soutenue le 10 Février 2011, devant la commission d'examen, composée de :

Dr JOCELYN LAPORTE : DIRECTEUR DE THÈSE

Dr NICOLAS VITALE : EXAMINATEUR INTERNE

Dr BRUNO ANTONNY : EXAMINATEUR EXTERNE

Pr JEAN-CLAUDE KAPLAN : EXAMINATEUR EXTERNE

*« Lorsque vous avez éliminé l'impossible, ce qui reste,  
si improbable soit-il, est nécessairement la vérité »*

*Sir Arthur Conan-Doyle*

*« Si vous ne pouvez expliquer un concept à un enfant de six ans,  
c'est que vous ne le comprenez pas complètement »*

*Albert Einstein*

# Remerciements

---

## REMERCIEMENTS

Tous les manuscrits commencent par des remerciements, le mien ne fera donc pas exception et comme beaucoup je commencerais par remercier l'initiateur de ce projet, Jocelyn Laporte. Notre collaboration a commencé en 2003 et a continué pour aboutir à ce manuscrit, résultat de 3 années et demie de thèse et de 8 années de collaboration, entrecoupées par mes études !

J'aimerais aussi remercier le Pr Jean-Louis Mandel pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour m'avoir guidée lors de nos réunions JLM du Vendredi.

J'aimerais remercier le Pr Jean Claude Kaplan, et les Drs Nicolas Vitale et Bruno Antonny, pour avoir accepté de faire partie de mon jury, de lire et de juger ma thèse.

Merci à toutes les personnes de l'équipe. Tout d'abord Christine, celle qui a été là depuis le début et qui restera après mon départ. C'est toi qui peux nous parler de Jocelyn, thésard de son époque !

Anne-Sophie, que j'ai connue au début de sa thèse, tu nous as beaucoup manqué quand tu es partie. Merci pour tout ce que tu m'as appris.

Holger, très cher Holger, si tu étais mon professeur pour l'anglais, moi j'étais ton professeur de français ou plutôt ta maîtresse !

Anne, tu as commencé ta thèse un an avant moi et nous avons pu nous soutenir pendant tout ce temps, nos moments passés dans l'atrium à déguster un thé tout en parlant de science (parfois d'autres choses mais il ne faut pas le dire !) m'ont beaucoup manquée quand tu es partie. Merci pour ton soutien !

Karim, mon très cher Karim, nous avons été plusieurs fois voisins pendant toute ma thèse, tu m'as très souvent soutenue et aidée, merci pour tout.

Olga, ma chère Olga, tu parles très bien français, si, si ! Merci pour m'avoir soutenue et aidée cette dernière année de thèse et pour tout ce que tu m'as apportée.

Catherine, vu le peu de temps que je t'ai accordée au début de ton stage, tu t'en es très bien tirée et tu mérites de trouver un poste. Merci pour l'aide que tu m'as apportée.

Et tous les autres, Barbara et Belinda (prenez bien soin de vous 2, les filles !), Johann (range un peu !), Manuela (grazie mi mancherai), Lama, Nassim, Nicolas, Ivana, Léonéla, Sylvain, Lina, Géraldine et Claire, et tous ceux que j'oublie.

## Remerciements

---

Et puis il y a tous les autres de l'IGBMC, des services communs, merci à tous.

Pascal, merci beaucoup pour toute l'aide que tu m'as apportée, dès le début, sans toi j'aurais vraiment lutté en microscopie. Et surtout merci pour tous ces moments, qui m'ont permis de me détendre et de penser à autre chose, ces discussions m'ont beaucoup aidée pendant ces trois longues années de thèse.

Mais aussi merci à Marc, Jean-Daniel, Yannick, Coralie, les filles du service de culture cellulaire, tous ceux du 3<sup>ième</sup> étage de l'IGBMC, et tous ceux que j'oublie.

Il me reste à remercier ma famille et mes amis qui m'ont soutenue pendant ce long et difficile parcours.

Tout d'abord j'aimerais remercier celui qui partage ma vie depuis maintenant 6 ans, Yann, mon mari. Tu as été pour beaucoup dans mon épanouissement pendant cette thèse et tu es pour beaucoup dans les résultats qui s'en suivent. Antoine de Saint Exupéry a dit : « *Aimer, ce n'est pas se regarder l'un l'autre, c'est regarder ensemble dans la même direction* », je pense que c'est ce que nous faisons depuis le début, preuve en est, nous allons soutenir nos thèses presque en même temps. Tu m'as donnée pendant cette thèse le plus beau des cadeaux, notre petite fille Thémis. Elle a fait notre bonheur et continuera à nous émerveiller encore longtemps je pense. Paul Carvel a dit : « *Vivre la naissance d'un enfant est notre chance la plus accessible de saisir le sens du mot miracle* », aujourd'hui je ne peux qu'acquiescer, parce qu'en effet Thémis est notre petit miracle, je t'en remercie du fond du cœur.

Thémis, ma petite princesse, notre petit miracle. Aujourd'hui tu ne peux pas lire ce que j'écris mais saches que tu auras été pour tes parents la plus belle chose qui nous soit arrivée. Hervé Biron a dit : « *Ce ne serait pas la peine d'avoir des enfants si leurs petites mains n'étaient pas toujours avec leurs sourires et leurs caresses au milieu de notre esprit et au milieu de notre cœur* » que dire de plus, tes sourires, tes caresses, tes premiers gazouillis font des tes parents les plus heureux du monde et m'ont permis de finir cette thèse.

Merci à mes très chers parents, Jean-Marie et Dominique. Vous avez toujours été là pour moi dans les moments de bonheur, de doutes et les moments plus difficiles. Merci pour tous les sacrifices que vous avez du faire pour que vos trois enfants puissent choisir leur parcours. Vous nous avez toujours soutenus et aimés et si aujourd'hui, nous sommes trois enfants épanouis, c'est grâce à vous, car nous avons eu l'exemple d'une famille soudée et aimante. Sans vous et votre amour, rien de tout cela n'aurait été possible et comme le dit si



## Remerciements

---

bien Victor Hugo "*L'amour d'une famille, est le centre autour duquel tout gravite et tout brille*". Merci pour tout, je vous aime.

Merci Nathalie, ma grande sœur. Tu auras été d'un très grand soutien dans beaucoup de moments. J'ai le bonheur aujourd'hui d'être la marraine de ton fils et d'être bientôt à nouveau tata. Les merveilleux moments passés avec ta petite famille m'ont permis de me détendre. Merci à toute ta petite famille.

Merci au petit mec de la famille, Cyrille, mon petit frère. Certains diront que nous t'avons trop chouchouté, peut être et même certainement, mais tu es devenu un jeune homme merveilleux, accompagné d'une jolie et adorable jeune femme. Merci pour votre soutien.

Merci à Iris, Patrick et Zelda, toute ma belle famille réunie ! Je vous ai connu il y a 6 ans maintenant. Vous m'avez ouvert les bras, je vous en remercie. Aujourd'hui Yann et moi avons agrandi cette famille avec Thémis et au vu des regards de ces grands parents et marraine, je crois que ce bonheur que j'ai trouvé chez vous il ya 6 ans, s'est encore agrandi.

Merci à Grand-mère Rose, j'espère pouvoir t'accompagner avec Thémis à Montpascal, pour que tu lui parles de son arrière grand-père Georges. Merci à mes grands parents qui nous ont malheureusement quittés trop tôt (Georges, Gérard et Marthe), vous me manquez.

Merci à mes beaux grands parents, André et Yvette, je suis heureuse que Thémis ait pu vous rencontrer. Merci de vous occuper de Viper, j'espère qu'il vous apportera autant de bonheur qu'à moi. Merci aussi à ceux que j'ai moins connus, Joseph et Marie, qui nous manquent aussi.

Merci à Jo le barbare, mon très cher Jérémie ! Tu fais presque parti de notre petite famille, tu le sais, tu es mon meilleur ami. Tu auras supporté ma mauvaise humeur de ces dernières semaines avec beaucoup de courage. Notre porte te sera toujours ouverte.

Merci à Céline, ma meilleure amie. Tu auras toi aussi du vivre l'angoisse de la rédaction de thèse et le bonheur d'en finir enfin ! Je te souhaite plein de bonheurs dans ta nouvelle vie de docteur.

Merci à Beufa et à tous les autres, Tomtom, Zilu, Hervé, Yves et Céline, Yaya, Nico et Marie-Annick et leur petit Adrien, J-lo, Loic et Elo et leur petite Anna, et tous les autres..., merci pour tous les moments passés ensemble.

Je terminerai ces remerciements par une citation d'Hector Berlioz : « *Le temps est un grand maitre, dit-on. Le malheur est qu'il tue ses élèves.* ».

SOMMAIRE

*ABREVIATIONS* ..... 1

*LISTES DES FIGURES*..... 4

*LISTES DES TABLEAUX* ..... 6

*RESUME* ..... 7

*INTRODUCTION* ..... 13

**I. Les myopathies à centralisation des noyaux** ..... 13

**A. Les myopathies congénitales à noyaux centraux**..... 14

1. Implication de hJUMPY ..... 14

    REVUE: “JUMPY, a new phosphatase involved in human diseases.” ..... 16

2. Implication de RYR1 ..... 33

    a. Descriptions histologiques et cliniques des patients ..... 33

    b. Mutations dans le gène RyR1 : impact sur la fonction musculaire ..... 34

**B. Les myopathies centronucléaires**..... 36

1. Introduction ..... 36

2. Les trois formes de myopathies centronucléaires ..... 37

    a. La myopathie centronucléaire liée au chromosome X ..... 37

    b. Les myopathies centronucléaires autosomiques récessives et dominantes..... 39

        i. La myopathie centronucléaire autosomique récessive (ARCNM)..... 39

        ii. La myopathie centronucléaire autosomique dominante (ADCNM) ..... 40

3. Les protéines MAD (Myotubularine/Amphiphysine/Dynamine) : fonction cellulaire et implication dans la physiopathologie des CNM ..... 41

    a. La myotubularine MTM1 ..... 42

    b. L’amphiphysine 2 ..... 45

        i. L’amphiphysine 2 et les cancers ..... 46

        ii. L’amphiphysine 2 et l’endocytose ..... 47

        iii. L’isoforme BIN1 spécifique du muscle squelettique..... 49

    c. La dynamine 2 DNM2 ..... 50

        i. La dynamine 2 et l’endocytose..... 53

            1. L’endocytose dépendante de la clathrine ..... 53

            2. L’endocytose indépendante de la clathrine ..... 54

        ii. La dynamine 2 et le cytosquelette d’actine ..... 55

        iii. La dynamine 2 et les microtubules..... 56

4. Myopathies centronucléaires canines : implication du gène PTPLA..... 57

**C. Les Dystrophies Myotoniques**..... 58

1. La dystrophie myotonique de Steinert (de type 1)..... 59

2. La dystrophie myotonique de type 2..... 62

3. Les gènes impliqués dans les dystrophies myotoniques ..... 65

    a. Le gène DMPK impliqué dans la dystrophie myotonique de Steinert..... 65

    b. Le gène ZNF9 impliqué dans la dystrophie myotonique de type 2 ..... 66

**II. Les phosphoinositides, un lien potentiel entre plusieurs protéines impliquées dans les myopathies centronucléaires** ..... 68

**A. Les phosphoinositides présents dans les CNM**..... 68

1. Le phosphatidylinositol (PtdIns) ..... 70

2. Le phosphatidylinositol-3-phosphate (PtdIns(3)P) ..... 71

3. Le phosphatidylinositol-5-phosphate (PtdIns(5)P) ..... 72

4. Le phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate (PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>)..... 74

# Sommaire

5. Le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> ).....	75
B. Les autres phosphoinositides .....	76
1. Le phosphatidylinositol-4-phosphate (PtdIns(4)P).....	76
2. Le phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate (PtdIns(3,4)P <sub>2</sub> ).....	77
3. Le phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PtdIns(3,4,5)P <sub>3</sub> ).....	77
III. Le projet de thèse .....	78
<b>RESULTATS</b> .....	<b>81</b>
I. MTM1 : étude de l'impact des mutations grâce à un nouveau système .....	81
A. Contexte de l'étude : l'état initial des connaissances sur les myopathies centronucléaires liées au chromosome X .....	81
B. Questions biologiques : comment mieux détecter les mutations responsables des myopathies centronucléaires liées au chromosome X et ainsi mieux diagnostiquer ces pathologies humaines ?... 82	82
C. Résultats .....	82
D. Conclusion de l'étude .....	84
Publication 1: .....	87
« Novel molecular diagnostic approaches for X-linked centronuclear (myotubular) myopathy reveal intronic mutations. » .....	87
II. BIN1 : impact des mutations identifiées chez des patients atteints de myopathies centronucléaires autosomiques récessives .....	88
A. Contexte de l'étude : l'état initial des connaissances sur les myopathies centronucléaires.....	88
B. Question biologique : Impact des mutations dans le gène BIN1 sur la fonction cellulaire.....	89
C. Résultats .....	89
D. Ma contribution à l'étude .....	91
E. Conclusion de l'étude .....	91
Publication 2 : .....	93
« Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy. ».....	93
III. Identification de nouvelles mutations dans BIN1 .....	94
A. Contexte de l'étude : après la découverte du gène BIN1.....	94
B. Question biologique : Les mutations de BIN1 pourraient-elles avoir d'autres impacts cellulaire et moléculaire ? .....	94
C. Matériel et méthodes .....	95
1. Production d'ADN plasmidique.....	95
2. Culture de cellules et transfection.....	95
3. Immunofluorescence et microscopie.....	96
4. Etude d'interaction par GST« pull down ».....	96
a. Extraction cellulaire.....	96
b. Production de protéines de fusion liées à la GST .....	97
c. Immunoprécipitation.....	99
D. Résultats .....	99
1. Impact sur la tubulation .....	100
2. Impact des mutations de BIN1 sur le recrutement de la dynamine 2 aux tubules membranaires.....	102
3. Impact des mutations de BIN1 sur la régulation de la protéine .....	102
a. L'homodimérisation BAR-BAR .....	102
b. L'interaction moléculaire PI-SH3 .....	103
E. Conclusion de l'étude .....	104
IV. BIN1 : impact d'un épissage alternatif défectueux dans les dystrophies myotoniques de Steinert et de type 2.....	106

# Sommaire

A.	Contexte de l'étude : l'état initial des connaissances sur les dystrophies myotoniques .....	106
B.	Question Biologique : pourquoi observe-t-on une faiblesse musculaire et/ou des noyaux centraux chez les patients atteints de DM? .....	107
C.	Résultats .....	107
D.	Ma contribution à l'étude .....	108
E.	Conclusion de l'étude .....	109
	Publication 3:.....	111
	« Misregulation of alternative splicing of BIN1 is associated with T-tubules and muscle alterations in myotonic dystrophy. » .....	111
V.	Défauts moléculaires des mutations de la dynamine 2 dans les myopathies centronucléaires et les neuropathies de Charcot-Marie-Tooth .....	112
A.	Contexte de l'étude : état initial des connaissances .....	112
B.	Question biologique : les mutations de la dynamine 2 identifiées chez des patients atteints de myopathies centronucléaires ont-elles le même impact fonctionnel que les mutations identifiées chez des patients atteints de neuropathies de Charcot-Marie-Tooth ? .....	113
C.	Matériel et méthodes .....	114
1.	Production d'ADN plasmidique.....	114
2.	Culture de cellules et transfection.....	115
3.	Test d'endocytose de la transférine.....	115
4.	Immunofluorescence et microscopie.....	116
D.	Résultats .....	117
1.	Localisation cellulaire des mutants.....	117
2.	Impact sur le recrutement aux tubules membranaires formés par la surexpression de BIN1 118	
3.	Impact sur l'endocytose de la transférine .....	118
E.	Conclusion .....	119
VI.	Impact des protéines CNM (MTM1 et BIN1) sur la morphologie cellulaire : utilisation d'une nouvelle technique d'imagerie.....	121
A.	Contexte de l'étude : état initial des connaissances en microscopie .....	121
B.	Question biologique : les structures appelées « needles » formées par la surexpression de MTM1 dans des cellules en culture, sont-elles des tubules de membranes ?.....	124
C.	Résultats .....	125
D.	Ma contribution au papier .....	126
E.	Conclusion de l'étude .....	127
	Publication 4 : .....	129
	« From dynamic live cell imaging to 3D ultrastructure: novel integrated methods for high pressure freezing and correlative light-electron microscopy. » .....	129
VII.	MTM1-BIN1-DNM2 : Lien direct entre ces trois protéines impliquées dans les myopathies centronucléaires.....	130
A.	Contexte de l'étude .....	130
B.	Question biologique : existe t-il un lien entre les trois protéines impliquées dans les myopathies centronucléaires ?.....	130
C.	Matériel et Méthodes.....	131
1.	Production d'ADN plasmidiques .....	131
2.	Culture de cellules et transfection.....	132
3.	Immunofluorescence et microscopie.....	132
4.	Etude d'interaction par GST « pull down »: Pull down assays.....	132
a.	Extraction cellulaire.....	132
b.	Production de protéines de fusion liées à la GST .....	132
c.	Immunoprécipitation.....	133
D.	Résultats .....	133

# Sommaire

---

1. Lien MTM1/BIN1.....	133
2. Lien MTM1/DNM2 .....	134
E. Conclusion de l'étude .....	135
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>138</b>
<b>I. Régulation de BIN1 : une protéine impliquée dans les ARCNM .....</b>	<b>138</b>
<b>A. Le domaine PI : un domaine primordial pour la fonction musculaire de BIN1 .....</b>	<b>138</b>
1. Plusieurs isoformes BIN1 dans le muscle .....	138
2. Régulation intramoléculaire via le domaine PI ? .....	139
3. Le domaine PI : un domaine liant plusieurs entités de phosphoinositides ? .....	142
<b>B. Régulation par le domaine BAR.....</b>	<b>144</b>
1. Les protéines à domaine BAR : un domaine capable de tubuler, mais un domaine enfermé ?	144
2. Le domaine N-BAR de BIN1 : un domaine BAR libre, capable de tubuler les membranes ?	147
<b>C. Régulation par le domaine SH3.....</b>	<b>148</b>
1. Le domaine SH3 : régulation intramoléculaire .....	148
2. Le domaine SH3 : régulation de la liaison aux protéines à domaine PRD .....	149
<b>D. Perspectives .....</b>	<b>153</b>
<b>II. Lien entre les trois protéines MTM1-BIN1-DNM2 impliquées dans les myopathies à centralisation des noyaux.....</b>	<b>154</b>
<b>A. Lien entre MTM1-BIN1 .....</b>	<b>154</b>
1. Un lien direct ? .....	155
2. Lien via les phosphoinositides ? .....	157
3. Un lien impliquant une interaction directe et les phosphoinositides ?.....	159
4. Un lien dans le muscle squelettique ? .....	160
5. Perspectives.....	162
<b>B. Impact sur la physiopathologie des CNM.....</b>	<b>163</b>
1. La myotubularine : une spécificité de fonction ou d'expression .....	163
2. Mutations de BIN1 : impact sur la physiopathologie .....	167
a. Les myopathies centronucléaires autosomiques récessives .....	168
b. Les dystrophies myotoniques .....	171
3. Mutations de DNM2.....	173
4. Perspectives.....	176
<b>III. Les myopathies à centralisation des noyaux : pour aller plus loin? .....</b>	<b>178</b>
<b>A. JUMPY et RYR1 : deux nouveaux gènes formant une nouvelle famille de myopathie, proche des myopathies centronucléaires ? .....</b>	<b>178</b>
<b>B. Pourquoi des noyaux centraux dans les myopathies à centralisation des noyaux ?.....</b>	<b>180</b>
<b>IV. CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>183</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>185</b>

### ABREVIATIONS

AAV : Adeno-associated virus	CUGBP : CUG-binding protein
ADCNM :Myopathies centronucléaires autosomiques dominantes	DH : DBL Homology
ADN : acide désoxyribonucléique	DHPR : Récepteur des Dihydropyridines
ADNc : AND complémentaire	DI-CMT : dominant Intermediate Charcot-Marie-Tooth
Akt / PKB : protein kinase B	Dlps :dynamin-like proteins
AP-2 : adaptator protein 2	DM :Dystrophie myotonique
ARCNM : Myopathies centronucléaires autosomiques récessives	DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium
Arf: ADP-ribosylation factors	DMPK : dystrophie myotonique protéine kinase
ARN: acide ribonucléique	DNM: dynamine
ARNi: ARN interférent	DSP : dual-specificity protein phosphatase
ARNm : ARN messenger	E-C : couplage excitation-contraction
ARNO : Arf nucleotide binding site opener	ECG : électrocardiogramme
Atg : Autophagy-related protein	EEA1: early endosome antigen 1
ATP : Adenosine triphosphate	EGF(R) : Epidermal Growth Factor (Receptor)
BAR : Bin1/Amphiphysin/Rvs167	EH : Eps15 homology
BAVI : bloc auriculo-ventriculaire du 1 <sup>er</sup> degré	ENTH : Epsin N-Terminal Homology
BB : bloc de branches	F-BAR: FCH-BAR
Cdc42 : Cell division cycle 42	FBP17 : formin-binding protein 17
cDM : dystrophie myotonique de Steinert forme congénitale	FCS :foetal Calf Serum
CDP-DAG : cytidine diphosphate diacyglycérol	FKBP12 : 12-KDa FK506-binding protein
CIP4 : Cdc42-interacting protein 4	FYVE : Fab-1, YGL023, Vps27 and EEA1
CMP : cytidine monophosphate	GAP : GTPase activator protein
CMT :Charcot-Marie-Tooth	GED :GTPase effector Domain
CMT4B : CMT type 4B	GFP :Green Fluorescnet Protein
CNM : Myopathies centronucléaires	GLUT4 : Glucos transporter type 4

## Abréviations

---

GRAM: Glucosyltransferase, Rab-like	PI-TP : phosphoinositides-transfert protein
GTPase activator and myotubularins	PKC : protéine kinase C
Grb2 : Growth factor receptor-binding protein	PLC : Phospholipase C
Grp1 : General receptor 1	PMSF : fluorure de phényle méthyle sulfoyle
GTP : guanosine 2risphosphate	PRD : proline rich domain
HGPO : Hyperglycémie Provoquée par voie Orale	PROMM : myopathie proximale avec myotonie
HM : Hyperthermie maligne	PtdInsP : phosphatidylinositol phosphate
I-BAR : inverse-BAR	PTEN : phosphatase and ensin homology
IPTG : isoprpyl $\beta$ -D thiogalactoside	PTP :protein tyrosin phosphatases
KCl : chlorure de potassium	PTPLA : Protein Tyrosin Phosphatase Like A
KO : Knock-out	PX: pleckstrine homology phox
LB : Lysogénie bouillon	RID : Rac-induced recruitment domain
MBD : Myc binding domain	RS : Réticulum Sarcoplasmique
MBNL : muscleblind-like	RT-PCR : Reverse Transcriptase PCR
MH1 et MH2: Malignant Hyperthermia 1et 2 domaines	RYR1 : Ryanodine Recepteur 1
MTM1 : Myotubularine	SERCA : Sarco-Endoplasmic Reticulum $Ca^{2+}$ ATPase 1
MTMR : myotubularine-related	SH3 : Src Homology 3
MVB : multivesicular body	SHIP : SH2 containing inositol 5-phosphatase
N-WASP : Neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome Protein	SID : SET-interacting domain
OCRL : Oculocerebrorenal Lowe Syndrome	SNARE : Soluble NSF Attachment Protein Receptors
OPA1: Optic Atrophy 1	SNPs: Single Nucleotide Polymorphisms
PA : acide phosphatidique	SNX :sorting nexin
PBS : tampon phosphate salin	Toca-1 : transducer of Cdc42-dependent actin assembly 1
PCR : Polymerase Chain Reaction	Tubules-T : tubules-transverses
PFA : paraformaldéhyde	VPS : vacuolar sorting protein
PH : Pleckstrin homology	WT : Wild-Type ou sauvage
PI :phosphoinositide	
PIKfyve : Phosphoinositide kinase, FYVE finger containing (Fab1)	

## Abréviations

XLCNM : Myopathies centronucléaires

liées au chromosome X

Abréviations des Acides Aminés

YFP : Yellow Fluorescent Protein

ZNF9 : Zinc Finger protein 9

NOM	Code	
	1 Lettre	3 Lettres
Alanine	A	Ala
Arginine	R	Arg
Asparagine	N	Asn
Aspartate	D	Asp
Cystéine	C	Cys
Glutamate	E	Glu
Glutamine	Q	Gln
Glycine	G	Gly
Histidine	H	His
Isoleucine	I	Ile

NOM	Code	
	1 Lettre	3 Lettres
Leucine	L	Leu
Lysine	K	Lys
Méthionine	M	Met
Phénylalanine	F	Phe
Proline	P	Pro
Sérine	S	Ser
Thréonine	T	Thr
Tryptophane	W	Trp
Tyrosine	Y	Tyr
Valine	V	Val

Tableau 1 : Abréviations des Acides Aminés



## LISTES DES FIGURES

Figure 1: Description clinique et histologique des patients atteints de myopathies congénitales à noyaux centraux liées au gène RYR1	Page 33
Figure 2 : Organisation de la triade du muscle squelettique	Page 34
Figure 3 : Structure et organisation de RYR1	Page 35
Figure 4 : Description générale des CNM	Page 37
Figure 5 : Descriptions histologiques et cliniques des différentes formes de CNM	Page 38
Figure 6 : Les trois protéines impliquées dans les trois formes de myopathies centronucléaires et leurs mutations	Page 41
Figure 7 : Arbre phylogénétique de la famille MTMs et hypothèse sur leur régulation	Page 42
Figure 8: Les maladies liées à des mutations dans les protéines de la famille des myotubularines	Page 43
Figure 9 : La myotubularine : une phosphatase à phosphoinositides	Page 44
Figure 10 : Le domaine N-BAR de l'amphiphysine 2/BIN1	Page 46
Figure 11 : Le domaine SH3 de BIN1 et sa régulation	Page 48
Figure 12 : L'isoforme musculaire de l'amphiphysine 2, BIN1, tubule les membranes	Page 49
Figure 13 : Action de la dynamine 2 suivant son activité GTPase	Page 51
Figure 14 : Mutations de la dynamine 2 dans les myopathies centronucléaires et dans les neuropathies de Charcot-Marie-Tooth	Page 52
Figure 15 : La dynamine 2 dans l'endocytose des vésicules à clathrine	Page 53
Figure 16 : Cas spontanés de myopathie centronucléaire autosomique récessive chez le labrador	Page 57
Figure 17 : Les dystrophies myotoniques de Steinert : implication du gène DMPK	Page 65
Figure 18 : Les dystrophies myotoniques de type 2 : implication du gène ZNF9	Page 66
Figure 19 : Les phosphoinositides, leur localisation et leur métabolisme	Page 68
Figure 20 : Hypothèse sur un potentiel lien MAD (Myotubularine/Amphiphysine/Dynamine)	Page 78
Figure 21 : Principe de la technique de GST pull down	Page 97
Figure 22 : Identification de nouvelles mutations R154Q et Q573X dans les ARCNM	Page 99
Figure 23 : Tests <i>in vivo</i> de localisation cellulaire des mutations de BIN1 identifiées chez des patients ARCNM	Page 100
Figure 24 : Tests <i>in vivo</i> sur la tubulation membranaire du domaine BAR seul	Page 101
Figure 25 : Interaction et recrutement de DNM2 aux tubules membranaires formés par BIN1	Page 102
Figure 26 : Recrutement de la DNM2 aux petits tubules formés par un mutant du domaine BAR	Page 103
Figure 27 : Homodimérisation du domaine BAR de BIN1	Page 104
Figure 28 : Interaction intra et/ou intermoléculaire du domaine SH3 avec le domaine PI de BIN1	Page 105

## Listes des figures et tableaux

---

<b>Figure 29 : Impact des mutations sur l'interaction des domaines PI et SH3 de BIN1</b>	<b>Page 106</b>
<b>Figure 30 : La voie d'endocytose de la transférine</b>	<b>Page 115</b>
<b>Figure 31 : Tests <i>in vivo</i> de localisation de la dynamine 2 et des mutants</b>	<b>Page 117</b>
<b>Figure 32 : Recrutement <i>in vivo</i> de la DNM2 aux tubules membranaires formés par BIN1</b>	<b>Page 118</b>
<b>Figure 33 : Tests <i>in vivo</i> d'endocytose de la transférine avec la dynamine 2</b>	<b>Page 119</b>
<b>Figure 34 : Principe de la microscopie confocale</b>	<b>Page 121</b>
<b>Figure 35 : Principe de la microscopie électronique en transmission et à balayage</b>	<b>Page 122</b>
<b>Figure 36 : Tests <i>in vivo</i> de localisation cellulaire de MTM1 et de BIN1</b>	<b>Page 134</b>
<b>Figure 37 : Test <i>in vitro</i> d'interaction fonctionnel entre MTM1 et BIN1</b>	<b>Page 135</b>
<b>Figure 38 : Tests <i>in vivo</i> de localisation cellulaire de MTM1 et DNM2</b>	<b>Page 136</b>
<b>Figure 39 : Tests <i>in vitro</i> d'interaction fonctionnelle entre MTM1 et DNM2</b>	<b>Page 137</b>
<b>Figure 40 : Deux isoformes de BIN1 dans le muscle squelettique</b>	<b>Page 139</b>
<b>Figure 41 : Hypothèse d'interaction intramoléculaire dans l'amphiphysine 2 et dans l'isoforme musculaire BIN1</b>	<b>Page 140</b>
<b>Figure 42 : Les différentes interactions possibles des deux isoformes de BIN1 dans le muscle squelettique</b>	<b>Page 144</b>
<b>Figure 43 : La régulation intramoléculaire de BIN1</b>	<b>Page 148</b>
<b>Figure 44 : L'interaction MTM1-BIN1 dans le muscle squelettique sain</b>	<b>Page 155</b>
<b>Figure 45 : Séquence montrant les différents domaines de MTM1</b>	<b>Page 156</b>
<b>Figure 46 : Interaction MTM1-BIN1 dans le muscle squelettique sain : plusieurs voies ?</b>	<b>Page 159</b>
<b>Figure 47 : Impact des mutations de MTM1 sur le modèle d'interaction des trois protéines impliquées dans les myopathies centronucléaires</b>	<b>Page 166</b>
<b>Figure 48 : Impact des mutations du domaine SH3 de BIN1 sur le modèle d'interaction dans le muscle squelettique</b>	<b>Page 169</b>
<b>Figure 49 : Impact des mutations du domaine BAR de BIN1 sur le modèle d'interaction dans le muscle squelettique</b>	<b>Page 171</b>
<b>Figure 50 : Impact de l'épissage alternatif défectueux dans les dystrophies myotoniques sur le modèle d'interaction dans le muscle squelettique</b>	<b>Page 172</b>
<b>Figure 51 : Impact des mutations dans le domaine PH de la dynamine 2 chez les patients atteints de neuropathie de Charcot-Marie-Tooth sur l'endocytose</b>	<b>Page 175</b>
<b>Figure 52 : Modèle d'interaction des protéines impliquées dans les myopathies à centralisation des noyaux dans le muscle squelettique sain</b>	<b>Page 179</b>
<b>Figure 53 : Hypothèse sur le positionnement des noyaux à la périphérie des fibres musculaires saines</b>	<b>Page 181</b>

## **LISTES DES TABLEAUX**

<b>Tableau 1 : Récapitulatif des variants identifiés dans le gène hJUMPY</b>	<b>Page 15</b>
<b>Tableau 2 : Comparaison entre les dystrophies myotoniques de type 1 (Steinert) et de type 2</b>	<b>Page 59</b>
<b>Tableau 3 : Les domaines protéiques liant les phosphoinositides</b>	<b>Page 69</b>

### RESUME

Les myopathies centronucléaires (CNM) sont des maladies congénitales rares caractérisées par une faiblesse musculaire et des fibres musculaires à noyaux anormalement centraux. Les CNM peuvent être divisées en trois formes (Jeannet, Bassez et al. 2004; Pierson, Tomczak et al. 2005; Jungbluth, Wallgren-Pettersson et al. 2008).

La forme sévère néonatale liée au chromosome X (XLCNM) est due à des mutations dans le gène de la myotubularine (MTM1) codant pour une phosphatase à phosphoinositides (Laporte, Hu et al. 1996). La myotubularine régule deux types de phosphoinositides endosomaux : le phosphatidylinositol-(3)-phosphate (PtdIns(3)P) et le phosphatidylinositol-(3,5)-bisphosphate (PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>), ainsi que le trafic membranaire et la signalisation cellulaire (Di Paolo and De Camilli 2006; Nicot and Laporte 2008).

Des mutations dans le gène codant pour la dynamine 2 (DNM2) ont été identifiées dans la forme modérée autosomique dominante (ADCNM) apparaissant à l'âge adulte (Bitoun, Maugendre et al. 2005). Cette protéine est une large GTPase, impliquée dans la tubulation et la fission des membranes provenant de la membrane plasmique et du golgi (Jones, Howell et al. 1998).

La forme intermédiaire autosomique récessive (ARCNM) apparait durant l'enfance ou au début de l'adolescence. A mon arrivée pour mon Master 2, aucun gène n'avait encore été identifié pour cette forme, mais l'équipe de Jocelyn Laporte avait trouvé des mutations dans le gène codant pour une isoforme musculaire spécifique de l'amphiphysine 2 : BIN1 (Bridging interactor 1). Cette protéine est impliquée dans le remodelage des membranes et la formation des tubules-T dans le muscle squelettique (Lee, Marcucci et al. 2002). Elle possède un domaine N-BAR qui permet de sentir et de courber les membranes ainsi qu'un domaine SH3 qui peut interagir avec des protéines telles que la DNM2 (Sakamuro, Elliott et al. 1996; Owen, Wigge et al. 1998; Peter, Kent et al. 2004; Yamada, Padilla-Parra et al. 2009). Cette isoforme spécifique possède un domaine PI pouvant lier les phosphoinositides (Lee, Marcucci et al. 2002).

## Résumé

---

L'un des axes de ma thèse a été l'étude des mutations dans les trois protéines impliquées dans les CNM.

J'ai tout d'abord participé à l'étude des trois premières mutations dans le gène BIN1, identifiées chez 4 patients atteints d'ARCNM. Ensuite, nous avons identifié deux nouvelles mutations dans ce même gène dans deux autres familles. J'ai donc réalisé l'étude complète de l'impact de ces nouvelles mutations sur les fonctions de BIN1. J'ai tout d'abord testé les fonctions étudiées avec les trois premières mutations identifiées, puis j'ai étudié d'autres fonctions de BIN1, entre autre, son interaction intramoléculaire via les domaines PI et SH3 (Kojima, Hashimoto et al. 2004) et l'homodimérisation de son domaine BAR (Owen, Wigge et al. 1998). J'ai ainsi pu montrer que les nouvelles mutations identifiées dans le domaine N-BAR de BIN1 sont responsables d'une abolition de la capacité de tubulation des membranes de BIN1 et qu'elles n'altèrent pas l'interaction avec la DNM2. Les mutations du domaine SH3, quant à elles, sont responsables d'un défaut de repliement de la protéine. En effet, le domaine SH3 muté n'est plus capable d'interagir avec son domaine PI comme c'est le cas dans la protéine normale. Ces mutations du domaine SH3 diminuent aussi la capacité de BIN1 à recruter la dynamine 2 aux tubules membranaires formés.

Comme nous avons montré que BIN1 est impliquée dans les CNM, des myopathies à noyaux centraux, et que l'exon 11 codant pour le domaine spécifique PI est exprimé uniquement dans le muscle squelettique, nous avons collaboré avec l'équipe de Nicolas Charlet-Berguerand (IGBMC) pour tester si des anomalies d'épissage de BIN1 pouvaient avoir lieu chez les patients atteints de dystrophies myotoniques de Steinert et de type 2. En effet, la forme congénitale des dystrophies de Steinert (cDM) ressemble à la forme sévère liée au chromosome X des CNM. Elle est due à des anomalies d'épissage causées par une expansion d'un triplet de nucléotides CTG dans le gène DMPK codant pour la myotonine. L'équipe de Nicolas Charlet-Berguerand a ainsi montré que l'épissage de l'exon 11 de BIN1 était anormal et que cet exon 11 était soit totalement soit partiellement exclu suivant la sévérité de la dystrophie myotonique. J'ai participé à cette étude en montrant que le domaine PI était important pour la tubulation membranaires de BIN1 dans des cellules COS, et dans des cellules musculaires différenciées et immatures. Tous ces résultats semblent donc suggérer que le phénotype de centralisation excessive des noyaux et/ou la faiblesse musculaire observée chez les patients pourraient être dus à une perte de la fonction musculaire de BIN1.

## Résumé

---

Nous avons par la suite développé une nouvelle approche de diagnostic moléculaire de la forme liée au chromosome X des CNM afin d'identifier de nouvelles mutations. Ainsi, nous avons développé de nouveaux anticorps capables de détecter la myotubularine dans des cellules et sur des biopsies musculaires de patients, sans étape préalable d'immunoprécipitation comme cela était nécessaire auparavant. Enfin, nous avons mis en évidence, grâce à la technique de RT-PCR, une nouvelle mutation intronique entre les exons 7 et 8 qui amène à l'exonisation d'une partie de cet intron et à l'apparition d'un codon stop prématuré.

J'ai aussi été impliquée dans les premières études de l'impact des mutations de la DNM2 identifiées chez des patients ADCNM et chez des patients atteints de Neuropathie de Charcot-Marie-Tooth (CMT). En effet, des mutations dans cette protéine peuvent être responsables soit d'une myopathie soit d'une neuropathie. Nous voulions savoir si les fonctions touchées étaient les mêmes dans le cas des ADCNM et des CMT ou si suivant la fonction touchée de la dynamine 2, le patient pouvait être atteint d'une myopathie ou d'une neuropathie. J'ai ainsi observé qu'une mutation du domaine PH impliquée dans les CMT était responsable d'une diminution de l'endocytose de la transférine. Ce résultat a été confirmé par une étude pendant ma thèse (Tanabe and Takei 2009).

Finalement mon dernier axe de travail était d'identifier un potentiel lien fonctionnel entre les trois protéines impliquées dans les CNM. Nous avons émis l'hypothèse que les trois protéines devaient agir dans une voie moléculaire commune. En effet, ces trois protéines semblent être impliquées dans le trafic membranaire et la voie des phosphoinositides. De plus, des études *in vitro* avaient déjà montré un lien entre BIN1 et la DNM2.

Dans un premier temps j'ai participé au développement d'une nouvelle technique au sein de l'IGBMC : la CLEM (Correlative Light and Electron Microscopy). Ce développement avait pour but de définir si des structures appelées « needles », formées par la surexpression de la myotubularine liée à la GFP dans des cellules COS après un choc hypoosmotique, pouvaient être des tubules membranaires tout comme ceux formés lors de la surexpression de BIN1 dans des cellules COS. Nous avons ainsi montré que ces « needles » n'étaient pas des tubules membranaires mais des structures dépendantes de la myotubularine et de la GFP qui se formaient sous la membrane plasmique.

## Résumé

---

Enfin j'ai directement étudié le possible lien fonctionnel entre MTM1 et BIN1 et entre MTM1 et DNM2 grâce à la technique de co-surexpression dans des cellules COS et grâce à la technique de GST « pull down ». J'ai ainsi pu observer que MTM1 et BIN1 semblent interagir ensemble via le domaine SH3 de BIN1. Ces résultats suggèrent que ces trois protéines doivent être impliquées dans une même voie moléculaire, commune aux trois formes de CNM, où BIN1 pourrait représenter le lien entre MTM1 et DNM2.

### Mon travail de thèse a ainsi montré que :

- Les trois protéines impliquées dans les CNM semblent partager une voie moléculaire commune.
- Les mutations de BIN1 peuvent être responsables soit d'un défaut de la fonction de tubulation membranaire, soit d'un mauvais repliement de la protéine chez les patients ARCNM.
- La perte du domaine PI spécifique du muscle squelettique de BIN1 semble être responsable du phénotype de faiblesse musculaire observée chez les patients DM. Ce phénotype semble être dû à un défaut de la fonction de tubulation membranaire.
- Les mutations de la DNM2 semblent être responsables d'une mauvaise localisation de la DNM2 dans les ADCNM et d'une forte diminution de l'endocytose chez les CMT.
- Enfin une nouvelle approche de diagnostic moléculaire peut être utilisée chez les patients XLCNM afin de détecter plus facilement un plus grand nombre de mutations.

### Bibliographie

- Bitoun, M., S. Maugenre, et al. (2005). "Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy." *Nat Genet* **37**(11): 1207-9.
- Di Paolo, G. and P. De Camilli (2006). "Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics." *Nature* **443**(7112): 651-7.
- Jeannet, P. Y., G. Bassez, et al. (2004). "Clinical and histologic findings in autosomal centronuclear myopathy." *Neurology* **62**(9): 1484-90.
- Jones, S. M., K. E. Howell, et al. (1998). "Role of dynamin in the formation of transport vesicles from the trans-Golgi network." *Science* **279**(5350): 573-7.
- Jungbluth, H., C. Wallgren-Pettersson, et al. (2008). "Centronuclear (myotubular) myopathy." *Orphanet J Rare Dis* **3**: 26.

## Résumé

---

- Kojima, C., A. Hashimoto, et al. (2004). "Regulation of Bin1 SH3 domain binding by phosphoinositides." Embo J **23**(22): 4413-22.
- Laporte, J., L. J. Hu, et al. (1996). "A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast." Nat Genet **13**(2): 175-82.
- Lee, E., M. Marcucci, et al. (2002). "Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle." Science **297**(5584): 1193-6.
- Nicot, A. S. and J. Laporte (2008). "Endosomal phosphoinositides and human diseases." Traffic **9**(8): 1240-9.
- Owen, D. J., P. Wigge, et al. (1998). "Crystal structure of the amphiphysin-2 SH3 domain and its role in the prevention of dynamin ring formation." Embo J **17**(18): 5273-85.
- Peter, B. J., H. M. Kent, et al. (2004). "BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure." Science **303**(5657): 495-9.
- Pierson, C. R., K. Tomczak, et al. (2005). "X-linked myotubular and centronuclear myopathies." J Neuropathol Exp Neurol **64**(7): 555-64.
- Sakamuro, D., K. J. Elliott, et al. (1996). "BIN1 is a novel MYC-interacting protein with features of a tumour suppressor." Nat Genet **14**(1): 69-77.
- 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): 939-48.
- Yamada, H., S. Padilla-Parra, et al. (2009). "Dynamic interaction of amphiphysin with N-WASP regulates actin assembly." J Biol Chem **284**(49): 34244-56.



# INTRODUCTION

# INTRODUCTION

## I. Les myopathies à centralisation des noyaux

Les myopathies à centralisation des noyaux sont des maladies génétiques rares et héréditaires qui appartiennent au groupe des myopathies congénitales. Le terme de myopathie congénitale a été introduit précocement par Shy et Magee, en 1956, pour désigner une myopathie découverte dans l'enfance, d'évolution lente et non dystrophique, caractérisée par une anomalie morphologique des fibres musculaires (Magee and Shy 1956). Cette appellation devait différencier cette nouvelle entité des dystrophies musculaires (Duchenne, Becker, myopathies des ceintures, Steinert) et des atrophies neurogènes. Il s'agissait alors du premier cas identifié de myopathie à axe central (central core disease). Très rapidement, c'est à partir des descriptions neuropathologiques qu'ont donc été individualisées les différentes formes de ces maladies. Elles ont longtemps été considérées comme une des causes des hypotonies du nourrisson, bénignes et pratiquement non évolutives au cours de la vie adulte. Actuellement, elles sont séparées en formes à début néonatal et infantile, souvent graves, voire mortelles pour certaines, et les formes à début plus tardif, quelquefois révélées à l'âge adulte. Leur évolutivité est en réalité fréquente et très variable et elles comportent souvent de multiples complications orthopédiques, respiratoires et parfois cardiaques. Chacune des myopathies congénitales est associée à une lésion musculaire bien définie et maintenant bien connue. On peut ainsi en distinguer cinq formes :

- Les myopathies à cores centraux, les plus courantes et qui se caractérisent par l'apparition d'une amyotrophie musculaire (c'est-à-dire une diminution du volume des muscles striés).

- Les myopathies à multicores ou multiminicores, qui sont caractérisées par l'apparition d'une atrophie musculaire et une altération des structures intrinsèques de la fibre.

- Les myopathies à bâtonnets, caractérisées par une atteinte musculaire massive et une paralysie des muscles respiratoires.

- Les myopathies à inclusions ou myopathies myofibrillaires aussi appelées les myopathies avec accumulation de filaments intermédiaires dont les plus fréquentes sont les

# Introduction

---

desminopathies (desmin-related myopathy), caractérisées par une atteinte respiratoire et une arthrogrypose (articulations recourbées).

- Et enfin, les myopathies à centralisation des noyaux dont les myopathies congénitales à noyaux centraux, les myopathies centronucléaires (CNM) et la myopathie myotubulaire font parties.

## **A. Les myopathies congénitales à noyaux centraux**

### **1. Implication de hJUMPY**

C'est en 2003 que j'ai réalisé pour la première fois un stage de DUT dans l'équipe de Jocelyn Laporte au sein de l'IGBMC. Le but de mon stage était d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans les myopathies centronucléaires.

Deux approches étaient possible afin d'identifier de nouveaux gènes. La première, la méthode de liaison génétique, consiste à repérer des marqueurs polymorphiques toujours liés à la maladie. A cette fin, de grandes familles comportant plusieurs personnes atteintes sont étudiées pour la ségrégation de ces marqueurs par rapport à la maladie. Ces marqueurs doivent, en effet, entourer la région mutée responsable des CNM.

La deuxième méthode est la stratégie du candidat fonctionnel. C'est cette dernière que nous avons privilégié à l'époque par manque de grandes familles informatives. Nous avons ainsi sélectionné un gène JUMPY, par rapport aux connaissances de l'époque sur le seul gène déjà confirmé comme étant impliqué dans les CNM : la myotubularine, dont je discuterai plus longuement dans un chapitre suivant.

La protéine JUMPY est une phosphatase à phosphoinositides qui semble avoir un site catalytique identique à celui de la myotubularine. En effet depuis 1999, cette nouvelle phosphatase à phosphoinositides : JUMPY, proche de la famille des myotubularines, a été identifiée chez *Sarcophaga peregrina* (*S. peregrina*) (Yamaguchi, Homma et al. 1999) puis *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) (Seroude, Brummel et al. 2002) et enfin chez l'homme (*Homo sapiens*) (Alonso, Sasin et al. 2004), la souris (*Mus musculus*) (Shen, Yu et al. 2009) et le poisson zèbre (*Danio rerio*) (Dowling, Low et al. 2010). A l'époque, une étude

## Introduction

---

américaine avait montré que JUMPY est une protéine importante dans le muscle squelettique puisqu'une ablation de ce gène (Knock-out: KO), chez la drosophile, provoque un phénotype musculaire se traduisant par une myopathie. Comme ce gène se retrouve aussi chez l'homme, il semblait être un très bon candidat fonctionnel.

J'ai ainsi pu mettre en évidence plusieurs variations dans ce gène codant pour hJUMPY. En effet, nous avons réussi à trouver pas moins de quatorze variations pour les exons 3, 4, 5, 7, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 17 et 18 (Tableau 1) (Tosch, Rohde et al. 2006). Ces variations ne permettaient pourtant pas d'affirmer avec certitude que hJUMPY pouvait être impliquée dans les myopathies centronucléaires.

Par contre, toutes les études qui suivirent, semblent montrer que JUMPY est impliquée dans la fonction musculaire et augmente ainsi la probabilité de son implication dans une forme de myopathie proche des CNM. En effet, une étude a prouvé que hJUMPY est impliquée dans la régulation du complexe macroprotéique RYR1 (Ryanodine receptor 1) (Shen, Yu et al. 2009). Ce complexe (dont je parlerai dans le paragraphe suivant) est lui-même impliqué dans des myopathies congénitales à noyaux centraux (Wilmshurst, Lillis et al. 2010). hJUMPY pourrait donc avoir un lien avec ces myopathies congénitales à noyaux centraux. Ces deux protéines pourraient alors former un nouveau groupe de myopathies : les myopathies congénitales à noyaux centraux, les plus proches des CNM.

Dans la revue suivante, j'ai discuté plus précisément des études et découvertes faites depuis l'identification de la protéine JUMPY.

**REVUE: “JUMPY, a new phosphatase involved in human diseases.”**

**JUMPY, a new phosphoinositides phosphatase,  
involved in human diseases**

**Running title : JUMPY, a PI3P phosphatase involved in diseases**

**Valérie Tosch, Jean Muller and Jocelyn Laporte\***

Departement Translational Medecine and Neurogenetics, IGBMC, INSERM U 596, CNRS UMR 7104,  
Université de Strasbourg, Collège de France, 67404 Illkirch France

\* Corresponding author : [mtm@igbmc.fr](mailto:mtm@igbmc.fr)

### **Abstract**

**Phosphoinositides (PIs) are a group of low-abundance phospholipids that play a critical role in major eukaryotic cell signaling pathway. hJUMPY/MTMR14, a potent phospholipid phosphatase, has been recently implicated in centronuclear myopathy and aging in addition to autophagy initiation by regulation of PI3P metabolism. We will focus on the role of this phosphatase and its implications in disease.**

**Key words :** hJUMPY, Myotubularin, phosphatase, Centronuclear Myopathy, Autophagy, Sarcopenia, Aging,

### **Introduction**

Interconversion of phosphorylated inositol lipids is a fundamental eukaryotic mechanism for the regulation of diverse cellular events including signal transduction, intracellular membrane trafficking, cytoskeletal dynamics, nuclear processes and for the control of cell death and survival. The inositol ring of phosphatidylinositol (PtdIns) can be phosphorylated by PtdIns kinases at the D3, D4 or D5 position and produce seven distinct phosphorylated derivatives. These derivatives can be in turn dephosphorylated by PtdIns

## Introduction

---

phosphatases. This interconversion allows for recruitment of proteins that contain PI-binding domains, to specific membranous compartments.

The JUMPY/MTMR14 protein displays sequence similarity to tyrosine phosphatases (PTPs), a large and diverse group of enzymes that are conserved from yeast to human (Laporte, Blondeau et al. 2001). PTPs catalyze phosphoester hydrolysis using a cysteine nucleophile and an arginine residue which binds to oxygen atoms of the phosphate. These two residues which are essential for catalytic activity are found in a Cys-X(5)-Arg motif, which is the signature of PTP domains (Denu and Dixon 1998). JUMPY is a 3-phosphatase linked to centronuclear myopathy, autophagy, sarcopenia and aging. This review presents the recent advances in the cellular function of JUMPY and its involvement in disease.

### 1. JUMPY : a new member of the myotubularin family?

Protein tyrosine phosphatases are critical regulators of a wide variety of cellular processes such as cell growth, metabolism, differentiation, motility and programmed cell death. They are divided into four groups: tyrosine-specific, dual specificity, low-molecular-weight and Cdc25 phosphatases. Myotubularins constitute one of the largest and most highly conserved protein tyrosine phosphatases (PTPs) superfamily in eukaryotes (Alonso, Sasin et al. 2004). They all feature a characteristic CX(5)R catalytic motif, where the cysteine is the catalytic residue, and the arginine is important in coordinating the substrate phosphatase group. The myotubularin family consists of 14 members in human, termed MTM1 and MTM-Related proteins (MTMR) 1 to 13. Of the 14 MTMs in human, eight are predicted to be enzymatically active (MTM1, MTMR1, MTMR2, MTMR3, MTMR4, MTMR6, MTMR7 and MTMR8) and share the conserved catalytic sequence 'CSDGWDR', whereas the other members contain naturally-occurring missense substitutions that disrupt the canonical CX(5)R motif, and are rendered catalytically inactive (Laporte, Bedez et al. 2003). The inactive myotubularins are believed to function as adaptors for the active members and therefore play an important regulatory role.

JUMPY/MTMR14 was initially identified as an egg-derived tyrosine phosphatase (EDTP) of *Sarcophaga peregrina* with a role in embryogenesis of fresh fly (Yamaguchi, Homma et al. 1999). This protein was reported to be expressed during oogenesis and its expression is rapidly suppressed following the completion of this process. EDTP was

## Introduction

---

subsequently renamed JUMPY in 2001 as disruption of EDTP in *Drosophila melanogaster* rendered the flies flightless due to progressive loss of muscle control and the appearance of shaky and slower movements. In 2004, Alonso et al. performed a genetic study which allowed for the identification of 107 human PTP genes, including nine previously unreported genes (Alonso, Sasin et al. 2004). Of these nine genes, two represented myotubularin-related proteins, and were subsequently termed *MTMR14* and *MTMR15*. *MTMR14* represents the human ortholog of EDTP/JUMPY. There is still some debate concerning the classification of JUMPY/*MTMR14* in the myotubularin family.

It is not so far-fetched to think of JUMPY/*MTMR14* as a member of the MTMs family. In both budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*), only a single myotubularin gene, *Ymr1p*, and no ortholog for JUMPY/*MTMR14*, could be found (Figure 1) (Parrish, Stefan et al. 2004). Thus, it is possible that JUMPY/*MTMR14* is a member of the MTMs family. Moreover, its catalytic loop sequence (LLVHCISGWDRTPLFISLLRLSLWAD) resembles that of active myotubularins (Alonso, Sasin et al. 2004) and it has been demonstrated to act as a lipid phosphatase which dephosphorylates common substrates to MTM1: PtdIns(3)P and PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> (Tosch, Rohde et al. 2006). JUMPY/*MTMR14* is ubiquitously expressed with higher levels of expression in skeletal and cardiac muscle (Tosch, Rohde et al. 2006). Interestingly, the expression profile of JUMPY/*MTMR14* is comparable to that of MTM1 during differentiation of C2C12 cells into myotubes (Tosch, Rohde et al. 2006). With these features in mind it seems that JUMPY/*MTMR14* has potentially earned a position in the MTM family.

Albeit the similarities to the MTMs, JUMPY/*MTMR14* displays features distinct to this family of proteins. It seems that although JUMPY/*MTMR14* contains the same 15 amino acids, catalytic loop of active myotubularins, it does not contain the other functional domains present in the MTMs (Figure 2). Each myotubularin possesses an N-terminal PH-GRAM (Pleckstrin-Homology, Glycosyltransferases, Rab-like GTPase Activators and Myotubularins) domain, a RID (Rac-Induced Recruitment Domain), the active site, a SID (SET-Interacting Domain) and, with one exception (*MTMR10*), a coiled-coil domain (Laporte, Bedez et al. 2003). Given the conservation of the PH-GRAM domain, it seems fair to imply that this domain is critical for MTM function and that MTM family members should contain this domain. However, this is not the case for JUMPY/*MTMR14*.

## Introduction

---

It is intriguing that although JUMPY/MTMR14 lacks a PH-GRAM domain, it can function in a similar fashion to myotubularins. Another example is PTEN (Phosphatase and TENsin homolog). PTEN is a phosphatidylinositol 3-phosphatase as MTMs but is not classified in the MTMs family. In addition, half of the members of the MTMs family are dead phosphatases (inactive) so, phosphatase activity is not a requirement for MTM family members. It is noteworthy, that loss of MTM1 in zebrafish was demonstrated to be compensated for by expression of human MTMR1 and MTMR2 but not JUMPY/MTMR14 (Dowling, Vreede et al. 2009; Dowling, Low et al. 2010). This infers that MTM1 and JUMPY/MTMR14 are not functional orthologs. Furthermore, the BioGRID database describes four putative interactors for the fly homolog of JUMPY/MTMR14 identified by yeast two-hybrid analysis: three are ribosomal proteins (RPS23, RPS9 and RPL17) and the CYP28d1 metabolic protein, suggesting that EDTP can have a role in ribosomal regulation (<http://thebiogrid.org/62653/summary/drosophila-melanogaster/edtp.html>).

JUMPY/MTMR14 may therefore be involved in protein synthesis or in metabolic processes.

It would appear that even though JUMPY/MTMR14 shares some functional similarities to the MTMs it is not a true member of the MTM family. Keeping this in mind we have chosen to call its human homolog JUMPY.

## 2. JUMPY mode of action

### a. JUMPY as a phosphoinositides phosphatase

Yamaguchi and colleagues (1999), first identified the fresh fly homolog of JUMPY as a putative tyrosine phosphatase (Yamaguchi, Homma et al. 1999). JUMPY seems to be an active phosphatase (Selaya A, CURJ, 2001 <http://seroudelab.biology.queensu.ca/pdf/selaya.pdf>). Indeed, it has been demonstrated *in vitro* to be a specific 3-phosphatases for phosphatidylinositol 3-phosphate (PtdIns(3)P) and phosphatidylinositol 3,5-biphosphate (PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>) leading to the production of phosphatidylinositol (PtdIns) and PtdIns(5)Phosphate (PtdIns(5)P) respectively (Tosch, Rohde et al. 2006; Shen, Yu et al. 2009). PIs are important lipid regulators of endosomal dynamics (Roth 2004). They are comprised of a fatty acid tail, which can anchor the molecule to cellular membranes, a diacylglycerol molecule, that links the tail to the inositol head ring.



## Introduction

---

This ring can be phosphorylated by kinases at positions D3, D4 and D5 resulting in seven different phosphoinositides (PPI<sub>n</sub>). PPI<sub>n</sub> are lipid second messengers involved in membrane trafficking, growth factor response and signal transduction via recruitment of proteins to their sites of action. PtdIns(3)P is produced by the class III PPI<sub>n</sub> 3-kinase (PIK3C3 also called VPS34 in *S. cerevisiae*). It has been localized to membranes of early endosomes and to the membranes of intraluminal vesicles of multivesicular bodies in fibroblasts. They can recruit proteins that contain FYVE, PX or PH domains. For example, PtdIns(3)P can link the endosomal protein early endosomal antigen-1 protein (EEA1) to early endosomes via its FYVE domain (the domain was named after its presence in Fab1, Yotb, Vac1 and EEA1). Moreover, PtdIns(3)P localizes to the inner membrane of the yeast autophagosome and WIPI-1 $\alpha$  and DFCP1 can bind PtdIns(3)P via their FYVE domains and localize to the autophagosome and to the omegasome respectively. Dephosphorylation of PtdIns(3)P leads to the formation of PtdIns. Potentially JUMPY acts as a regulator of endosomal trafficking and/or autophagy through PtdIns(3)P dephosphorylation.

PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> is in turn produced through phosphorylation of PtdIns(3)P by type III PI 5-kinases (PIKfyve in mammals and Fab1p in *S. cerevisiae*). In yeast, PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> has been implicated in the vesicular body-sorting pathway. It seems to be important for osmoregulation and membrane fission. In mammals, PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> localizes to the sarcoplasmic reticulum (Shen, Yu et al. 2009), where it activates the ryanodine receptor 1 (RyR1), an intracellular Ca<sup>2+</sup> release channel, and is involved in the regulation of Ca<sup>2+</sup> homeostasis. Its dephosphorylation, by myotubularins or JUMPY, produces PtdIns(5)P, a phosphoinositide of a yet unknown function.

### **b. JUMPY regulates Ca<sup>2+</sup> channels**

Studies in mice point to a role for JUMPY in Ca<sup>2+</sup> homeostasis. Although JUMPY knockout (KO) mice (MIP<sup>-/-</sup> : muscle-specific inositol phosphatase/MTMR14) appeared healthy up to 12 months of age behavioural studies revealed that they display decreased motor function (Shen, Yu et al. 2009). Shen and colleagues suggested that the muscular defect observed may be linked to deregulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis. They demonstrated that levels of Ca<sup>2+</sup> in the sarcoplasmic reticulum (SR) of JUMPY KO derived myotubes were decreased and that this was linked to an increase in the levels of PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>. In support of these findings, perfusion of PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>, but not PtdIns(5)P, the product of JUMPY, in wild

## Introduction

---

type myotubes resulted in SR lumen  $\text{Ca}^{2+}$  deregulation. In addition, they were able to demonstrate that the  $\text{Ca}^{2+}$  deregulation observed was linked to an irregular activation of RyR1 that was in turn caused by increased PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> binding. RyR1 is preferentially expressed in skeletal muscle and resides on the SR membrane where it triggers  $\text{Ca}^{2+}$  release from the SR lumen to the cytoplasm, an event that leads to muscle contraction. Point mutations in this gene have been linked to malignant hyperthermia, central core disease, multi-minicore disease and centronuclear myopathy (Jungbluth, Zhou et al. 2007; Wilmshurst, Lillis et al. 2010). An increase in the concentration of intracellular calcium can lead to pathology and involves downstream calpain activation. Calpain activation results in an increased rate in protein degradation including the degradation of troponins, major regulators of contraction. Potentially this could explain the changes in the skeletal muscle contractile function of MIP<sup>-/-</sup> KO mice.

Therefore Shen and colleagues (2009) demonstrated that JUMPY is important for muscle function at the level of PtdIns regulation and that a deregulation in these PIs leads to aberrant  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis due to defective  $\text{Ca}^{2+}$  release from the SR (Shen, Yu et al. 2009).

### **c. hJUMPY is involved in autophagy**

As the two substrates of JUMPY PtdIns(3)P and PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> are key regulators of the endocytic pathway, it is possible to envisage a role for this phosphatase in this process. The phosphatase MTM1, has been shown to deplete endosomal pools of PtdIns(3)P. Moreover, MTMR2 is able to translocate to EGF receptor containing vesicles sometime following EGF stimulation leading to a block in receptor degradation at late endosomes. This is a direct demonstration of a phosphatase affecting the fate of the endocytic process.

On the other hand, MTMR3, hJUMPY and MTMR6 have been recently linked to autophagy (Vergne, Roberts et al. 2009; Taguchi-Atarashi, Hamasaki et al. 2010). It seems that knock-down of MTMR3 is able to increase autophagosome formation, whereas its overexpression is responsible for a significant decrease in autophagic activity, suggesting that it is a negative regulator of this process (Vergne, Roberts et al. 2009). hJUMPY and to a lesser extent MTMR6 appear to be regulators of autophagy at the initiation step of the process. Knock-down of hJUMPY and MTMR6 increased the level of LC3-II, a marker of autophagy stimulation suggesting that they act as suppressors of the autophagic pathway (Taguchi-Atarashi, Hamasaki et al. 2010). It seems that hJUMPY acts at the level of formation and maturation of autophagosomes. Indeed, hJUMPY C330S, a catalytically

## Introduction

---

inactive variant (Tosch, Rohde et al. 2006) colocalized with LC3, Atg16 and Atg12 positive structures, indicating that JUMPY may play a role in the early stage of autophagic process. Atg16 and Atg12 form a multimeric complex with Atg5 and this complex is found particularly in phagophores, the initial vesicles formed during autophagy in mammalian cells. Recruitment of WIPI-1 to autophagic membranes was shown to be negatively regulated by hJUMPY. WIPI-1 is a PtdIns(3,5)P2 binding protein involved in vacuole membrane recycling and in retrograde Atg9 recycling. In addition, intracellular distribution of Atg9 was shown to be regulated by JUMPY, suggesting that this protein could act on the binding of WIPI-1 on PtdIns(3,5)P2 and on Atg9 retrieval. It seems that hJUMPY is a suppressor of autophagy and can act at different stages of this process in a PI3P-dependent manner by regulating the localization of Atg proteins.

### 3. JUMPY in disease and in non-pathological processes

#### a. hJUMPY in muscle development and disease

Our group recently identified two deleterious variants of hJUMPY leading to centronuclear myopathy (CNM). CNMs are a group of rare congenital disorders characterized by hypotonia the appearance of small rounded fibers with centralized nuclei. Three forms have been documented: the X-linked form that is the most severe and is linked to mutations within myotubularin (*MTM1*), the autosomal recessive form caused by mutations in Amphiphysin 2/Bridging integrator 1 (*BINI*) and the autosomal dominant form caused by mutations in dynamin 2 (*DNM2*). The X-linked form is characterized by severe and generalized muscle weakness in affected newborn males. The recessive form occurs generally in infancy or early childhood. The dominant form is the mildest since muscle weakness appears generally in adulthood. We wanted to identify which genes could be involved in the autosomal recessive form, as at the time no gene had been identified, so we performed-bioinformatics analysis using BLAST and TBLASTN to identify a new gene with a similar function to *MTM1*. We identified a 650 amino acids protein which shared strong homology to the active site of *MTM1* which we called JUMPY (accession no. AK074792). We demonstrated that this novel phosphatase is ubiquitously expressed and conserved throughout evolution. Genetic analysis lead to the identification of two heterozygous missense mutations

## Introduction

---

(R336Q and Y462C) in the JUMPY gene in two patients when we screened fifty CNM patients. These two missense mutations were found in two sporadic Brazilian cases with early onset CNM. The R336Q hJUMPY mutation was identified in a young boy suffering from neonatal hypotonia and diffused weakness. The mutated arginine was located in the conserved catalytic motif CX(5)R found in all PTP/DSP phosphatases. This mutation was also present in the father however, no biopsy analysis was performed. The Y462C hJUMPY mutation was identified in an adult woman suffering from a neonatal hypotonia. This variant was also found in one healthy Brazilian, suggesting that it might not induce the disease. Moreover DNM2 mutation (E368K), a known CNM causing mutation, was also identified in this female patient. As DNM2 mutations generally lead to mild CNM and this patient exhibited a more severe phenotype it is possible that the Y462C hJUMPY variant impacted on the severity of the disease. Ectopically expressed WT, R336Q, Y462C and C330S (artificial and inactive) hJUMPY displayed comparable localization to cytoplasmic reticular structures and an accumulation in the perinuclear region. We showed, through both *in vitro* and *ex-vivo* approaches, that hJUMPY can specifically dephosphorylate PtdIns(3)P and PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> and no other classes of PIs as previously reported for MTM1. Interestingly, the R336Q variant displayed reduced phosphatase activity reminiscent to the C330S inactive mutant which suggests that R336Q disrupts hJUMPY's phosphatase activity. The reduction was less striking for the Y462C (20%). As hJUMPY dephosphorylates the same substrates with MTM1 and reduction in MTM1 levels and/or activity lead to severe cases of CNM it is possible that the presence of hJUMPY R336Q which seems to lack phosphatase activity could lead to CNM.

In any case, hJUMPY seems to be important for normal muscle function as demonstrated with the JUMPY KO mice study (Shen, Yu et al. 2009), however the milder phenotype observed in mice compared to RQ and YC (hJUMPY) patients could be due to intrinsic differences between the two species.

JUMPY and MTM1 appear to have distinct roles in muscle function and in the development of CNM as shown by morpholino (MO) studies in zebrafish (Dowling, Vreede et al. 2009; Dowling, Low et al. 2010). Knock-down of JUMPY resulted in embryonic abnormalities including decrease in spontaneous coiling and an abnormal response after a tactile stimuli. These defects were more pronounced when MOs targeting MTM1 were introduced. Although, both proteins are implicated in embryonic development only MTM1 morphants displayed skeletal muscle abnormalities. It is of note that, double knock-down by MO injection targeting both MTM1 and JUMPY resulted in an even more severe phenotype;

## Introduction

---

muscle fibers displayed disorganized sarcomeres and an augmentation in autophagy. The increase in autophagic events was linked to a shift from LC3-I to LC3-II positive structure which was more noticeable in the double knock-down compared to the JUMPY morphants. They suggested that JUMPY does not readily lead to CNM but can impact on the severity of the CNM phenotype through its regulatory role in autophagy. Either way, JUMPY has a link to CNM.

Wilmshurst J.M. et al., have identified mutations in RyR1 in patients with congenital myopathy with central nuclei (Wilmshurst, Lillis et al. 2010) however they were not classified as CNM cases but as a new distinct family of myopathies. In conclusion, hJUMPY might be a second gene involved in congenital myopathy with central nuclei and potentially accelerate centronuclear myopathy by increasing autophagy.

### **b. JUMPY in development and oogenesis**

Yamaguchi et al. (1999) first identified JUMPY as an egg protein of 100 kDa indispensable for embryogenesis in the flies *S. peregrina* and *D. Melanogaster* (Yamaguchi, Homma et al. 1999; Yamaguchi, Katagiri et al. 2005). This protein is present during early embryogenesis of *S. peregrina* (Yamaguchi, Homma et al. 1999). In fruit fly, JUMPY is expressed during early and middle embryonic stages but is not present during the larval and pupal stages (Yamaguchi, Katagiri et al. 2005). Targeted disruption of this gene was considered embryonically semi-lethal, as a small percentage of homozygous larvae with deleted JUMPY genes survived through embryogenesis, although JUMPY transcripts were only detected during oogenesis and embryogenesis and not in subsequent developmental stages. JUMPY seems to be involved in oogenesis. One possibility is that the function of JUMPY during embryogenesis may be partially compensated for by other protein phosphatases. Moreover Tharmarajah (2006) has demonstrated in his thesis study that the homozygous deletion of the JUMPY gene in female *Drosophila* (DJ694 line) resulted in a rapid decline of fertility and males from the same germline seem to be infertile as they fail to fertilise females (unpublished observation <http://seroudeLab.biology.queensu.ca/labsite.html>).

Finally, JUMPY female knock-out mice, generated by a random homozygous insertion within the JUMPY locus, exhibit a significant decrease in follicular and oocyte growth

## Introduction

---

(Wishart, Taylor et al. 2001). These findings indicate that JUMPY is important for oocyte development and is involved in oogenesis.

### c. JUMPY and Sarcopenia

Recently, JUMPY has been implicated in aging sarcopenia (Romero-Suarez, Shen et al. 2010). Sarcopenia is the degenerative loss of skeletal muscle mass and strength associated with aging and is characterized by a decrease in the mass of muscle, which leads to weakness.

Young and adult  $MIP^{-/-}$  KO mice exhibit similar behavior to aged wild-type mice following exercise, both using force plate actimeter measurements and the treadmill stress test. The decreased physical activities in young and mature  $MIP^{-/-}$  KO mice compared to wild type age-matched mice seems to be due to a reduction in muscle mass suggesting a premature development of sarcopenia. In addition, mature  $MIP^{-/-}$  KO mice have cardiovascular defects and osteoporosis consistent with aging defects (Romero-Suarez, Shen et al. 2010) ; unpublished data). This hypothesis is reinforced by the fact that the maximal contractile force and power in young and mature  $MIP^{-/-}$  is reduced, due to dysfunction in the contractile properties of muscle fibers. They suggest that the absence of JUMPY leads to accumulation of PtdIns(3,5)P2, indicating that JUMPY may act on a distinct pool of PtdIns(3,5)P2 to MTM1, leading to a downstream effect on  $Ca^{2+}$  homeostasis. Furthermore the absence of JUMPY may lead to the activation of proteolytic enzymes and to the increased production of reactive oxygen species due to direct activation of RYR1. Indeed, augmented levels of PtdIns(3,5)P2 can lead to aberrant RYR1 activation. All this pathways would lead to muscle wasting and indicates that hJUMPY might be a therapeutic target for muscle aging and sarcopenia.

### d. JUMPY in aging

JUMPY was initially described as a protein involved in the aging process in fresh fly (<http://seroudeLab.biology.queensu.ca/pdf/selaya.pdf>). The JUMPY gene displays age-specific expression changes with expression up to mid-life followed by a subsequent decrease. Indeed, flies with a homozygous insertion in the JUMPY gene have a shorter lifespan and a reduction in resistance to stress induced by a free radical generator (paraquat) or starvation. These flies also cannot regain an upright position when they are dismantled from the surface of a glass container indicating muscle weakness



## Introduction

---

(<http://seroudelab.biology.queensu.ca/pdf/selaya.pdf>). Seroude and co-workers have dissected the aging process in *D. melanogaster* using a genetic approach (<http://seroudelab.biology.queensu.ca/labsite.html>). By using the enhancer-trap technique and the UAS/GAL4 system to identify spatio-temporal gene expression patterns *in vivo* during the whole life-span of the fly, the line (DJ694) with an insertion in the first intron of the JUMPY gene was identified. This line displayed age-dependent changes in the level of JUMPY with increased activity persisting during the first thirty days of life and a decrease after this age. Analysis of flight muscle cryo-sections showed a similar pattern of activity for JUMPY (Seroude 2002; Seroude, Brummel et al. 2002). Potentially the spatio-temporal decline in JUMPY activity with age can result in the reduction in locomotion and muscle performance associated with aging. Five *Drosophila* lines which were engineered with a homozygous excision of the JUMPY gene by the enhancer-trap technique died at the L1 larval stage due to an ingestion defect (<http://seroudelab.biology.queensu.ca/labsite.html>, 2003). Indeed, larvae of these lines placed on yeast paste dyed with neutral red failed to ingest suggesting that they die from starvation due to a muscle defect as no in the nervous system were observed.

Other studies from the Seroude laboratory demonstrate the involvement of JUMPY in aging since they demonstrated that longevity of JUMPY flies is reduced when compared to wild-type populations. This trait is recessive as strains that are heterozygous for the JUMPY allele have a normal lifespan. This would imply that JUMPY is important in the regulation of the aging process (Edelman, Thesis, 2005; Tharmarajah, Thesis, 2006; Chan, Thesis, 2003; <http://seroudelab.biology.queensu.ca/labsite.html>).

### Conclusion/Perspectives

JUMPY is a newly identified phosphoinositides phosphatase with a role in skeletal muscle function. It seems that hJUMPY probably may not directly cause CNM but can accelerate the disease, by increasing autophagy as myopathies with excessive autophagy have been previously reported. JUMPY may also represent a candidate gene for patients suffering from congenital myopathy with centralized nuclei and excessive autophagy. Indeed RyR1 has been implicated in congenital myopathy with centralized nuclei and JUMPY is involved in the regulation of Ca<sup>2+</sup> homeostasis via its association with RyR1. JUMPY flies do not exhibit notable defects in the muscle fibers but rather has differences in the sarcomere, where RyR1

## Introduction

---

is localized and where basic regulation of skeletal muscle contraction occurs. Finally, JUMPY might represent the link between  $\text{Ca}^{2+}$  channels and autophagy (Figure 3). Some membranes involved in the formation of the omegasome in autophagy originate from the sarcoplasmic reticulum and PtdIns(3)P is localized on the sarcoplasmic reticulum, where JUMPY regulates  $\text{Ca}^{2+}$  channels. In conclusion, JUMPY seems to regulate a pool of PtdIns(3)P which is involved in the regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  channels and in the formation of the omegasome. We can therefore propose two hypothesis. Either, there are two different pool of PtdIns(3)P regulated by JUMPY: one involved in  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and another in the autophagic process or the sarcoplasmic reticulum may be the site of phagophore formation giving access to JUMPY to the same pool of PtdIns(3)P.

As two JUMPY variants were identified in two Brazilian patients suffering from CNM, it would seem that JUMPY may have a link to congenital myopathies with centralized nuclei. Potentially more patients with JUMPY mutations will be identified.



## BIBLIOGRAPHY

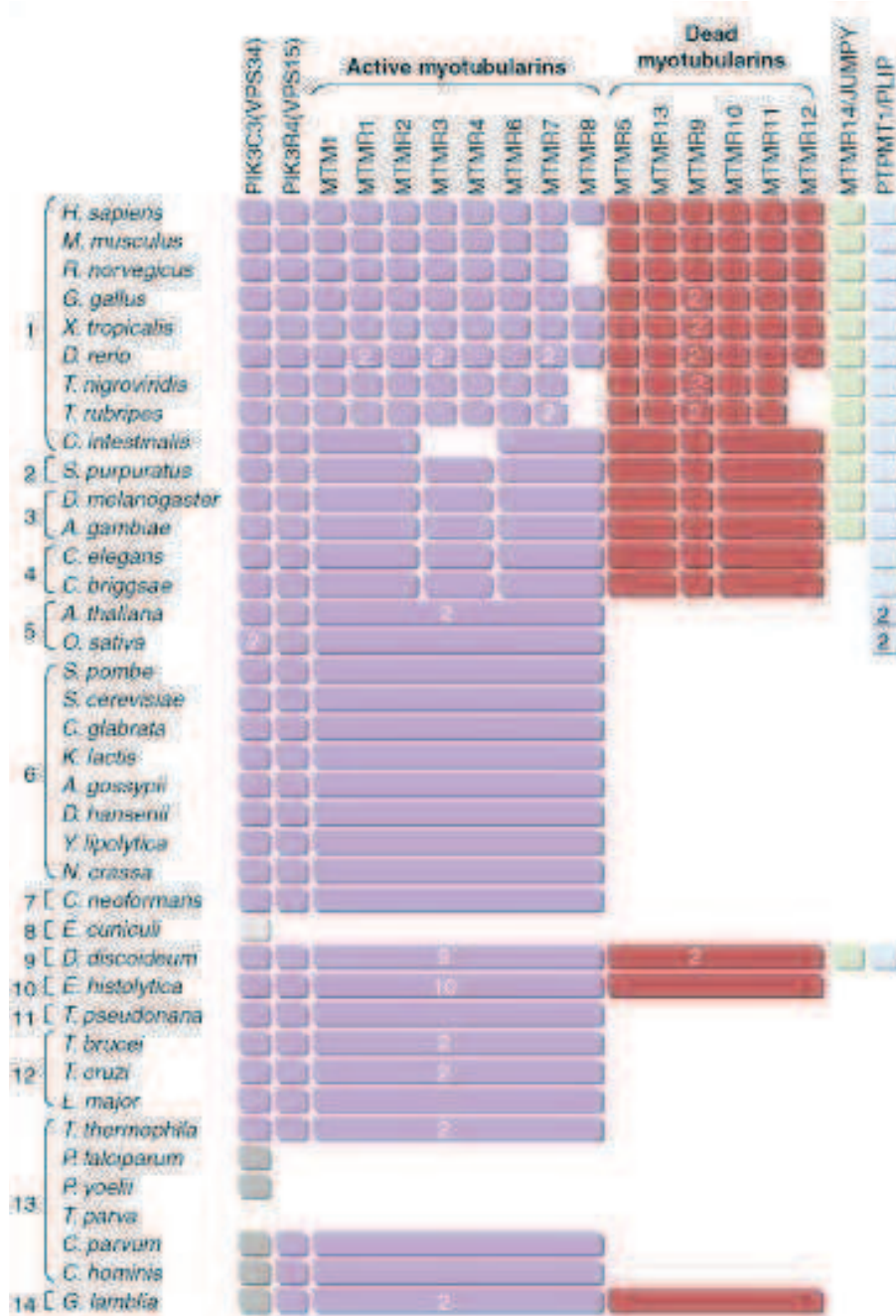
- Alonso, A., J. Sasin, N. Bottini, I. Friedberg, I. Friedberg, A. Osterman, A. Godzik, T. Hunter, J. Dixon and T. Mustelin (2004). "Protein tyrosine phosphatases in the human genome." Cell 117(6): 699-711.
- Denu, J. M. and J. E. Dixon (1998). "Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation." Curr Opin Chem Biol 2(5): 633-41.
- Dowling, J. J., S. E. Low, A. S. Busta and E. L. Feldman (2010). "Zebrafish MTMR14 is required for excitation-contraction coupling, developmental motor function and the regulation of autophagy." Hum Mol Genet 19(13): 2668-81.
- Dowling, J. J., A. P. Vreede, S. E. Low, E. M. Gibbs, J. Y. Kuwada, C. G. Bonnemann and E. L. Feldman (2009). "Loss of myotubularin function results in T-tubule disorganization in zebrafish and human myotubular myopathy." PLoS Genet 5(2): e1000372.
- Jungbluth, H., H. Zhou, C. A. Sewry, S. Robb, S. Treves, M. Bitoun, P. Guicheney, A. Buj-Bello, C. Bonnemann and F. Muntoni (2007). "Centronuclear myopathy due to a de novo dominant mutation in the skeletal muscle ryanodine receptor (RYR1) gene." Neuromuscul Disord 17(4): 338-45.
- Laporte, J., F. Bedez, A. Bolino and J. L. Mandel (2003). "Myotubularins, a large disease-associated family of cooperating catalytically active and inactive phosphoinositides phosphatases." Hum Mol Genet 12 Spec No 2: R285-92.
- Laporte, J., F. Blondeau, A. Buj-Bello and J. L. Mandel (2001). "The myotubularin family: from genetic disease to phosphoinositide metabolism." Trends Genet 17(4): 221-8.
- Parrish, W. R., C. J. Stefan and S. D. Emr (2004). "Essential role for the myotubularin-related phosphatase Ymr1p and the synaptojanin-like phosphatases Sjl2p and Sjl3p in regulation of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast." Mol Biol Cell 15(8): 3567-79.
- Romero-Suarez, S., J. Shen, L. Brotto, T. Hall, C. Mo, H. H. Valdivia, J. Andresen, M. Wacker, T. M. Nosek, C. K. Qu and M. Brotto (2010). "Muscle-specific inositide phosphatase (MIP/MTMR14) is reduced with age and its loss accelerates skeletal muscle aging process by altering calcium homeostasis." Aging (Albany NY) 2(8): 504-13.
- Roth, M. G. (2004). "Phosphoinositides in constitutive membrane traffic." Physiol Rev 84(3): 699-730.
- Seroude, L. (2002). "GAL4 drivers expression in the whole adult fly." Genesis 34(1-2): 34-8.
- Seroude, L., T. Brummel, P. Kapahi and S. Benzer (2002). "Spatio-temporal analysis of gene expression during aging in *Drosophila melanogaster*." Aging Cell 1(1): 47-56.
- Shen, J., W. M. Yu, M. Brotto, J. A. Scherman, C. Guo, C. Stoddard, T. M. Nosek, H. H. Valdivia and C. K. Qu (2009). "Deficiency of MIP/MTMR14 phosphatase induces a muscle disorder by disrupting Ca(2+) homeostasis." Nat Cell Biol 11(6): 769-76.
- Taguchi-Atarashi, N., M. Hamasaki, K. Matsunaga, H. Omori, N. T. Ktistakis, T. Yoshimori and T. Noda (2010). "Modulation of local PtdIns3P levels by the PI phosphatase MTMR3 regulates constitutive autophagy." Traffic 11(4): 468-78.
- Tosch, V., H. M. Rohde, H. Tronchere, E. Zanoteli, N. Monroy, C. Kretz, N. Dondaine, B. Payrastre, J. L. Mandel and J. Laporte (2006). "A novel PtdIns3P and PtdIns(3,5)P2 phosphatase with an inactivating variant in centronuclear myopathy." Hum Mol Genet 15(21): 3098-106.
- Vergne, I., E. Roberts, R. A. Elmaoued, V. Tosch, M. A. Delgado, T. Proikas-Cezanne, J. Laporte and V. Deretic (2009). "Control of autophagy initiation by phosphoinositide 3-phosphatase Jumpy." Embo J 28(15): 2244-58.
- Wilmshurst, J. M., S. Lillis, H. Zhou, K. Pillay, H. Henderson, W. Kress, C. R. Muller, A. Ndong, V. Cloke, T. Cullup, E. Bertini, C. Boennemann, V. Straub, R. Quinlivan, J. J. Dowling, S. Al-Sarraj, S. Treves, S. Abbs, A. Y. Manzur, C. A. Sewry, F. Muntoni and H. Jungbluth (2010). "RYR1 mutations are a common cause of congenital myopathies with central nuclei." Ann Neurol 68(5): 717-26.

## Introduction

---

- Wishart, M. J., G. S. Taylor, J. T. Slama and J. E. Dixon (2001). "PTEN and myotubularin phosphoinositide phosphatases: bringing bioinformatics to the lab bench." Curr Opin Cell Biol 13(2): 172-81.
- Yamaguchi, S., K. Homma and S. Natori (1999). "A novel egg-derived tyrosine phosphatase, EDTP, that participates in the embryogenesis of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly)." Eur J Biochem 259(3): 946-53.
- Yamaguchi, S., S. Katagiri, K. Sekimizu, S. Natori and K. J. Homma (2005). "Involvement of EDTP, an egg-derived tyrosine phosphatase, in the early development of *Drosophila melanogaster*." J Biochem 138(6): 721-8.

# Introduction

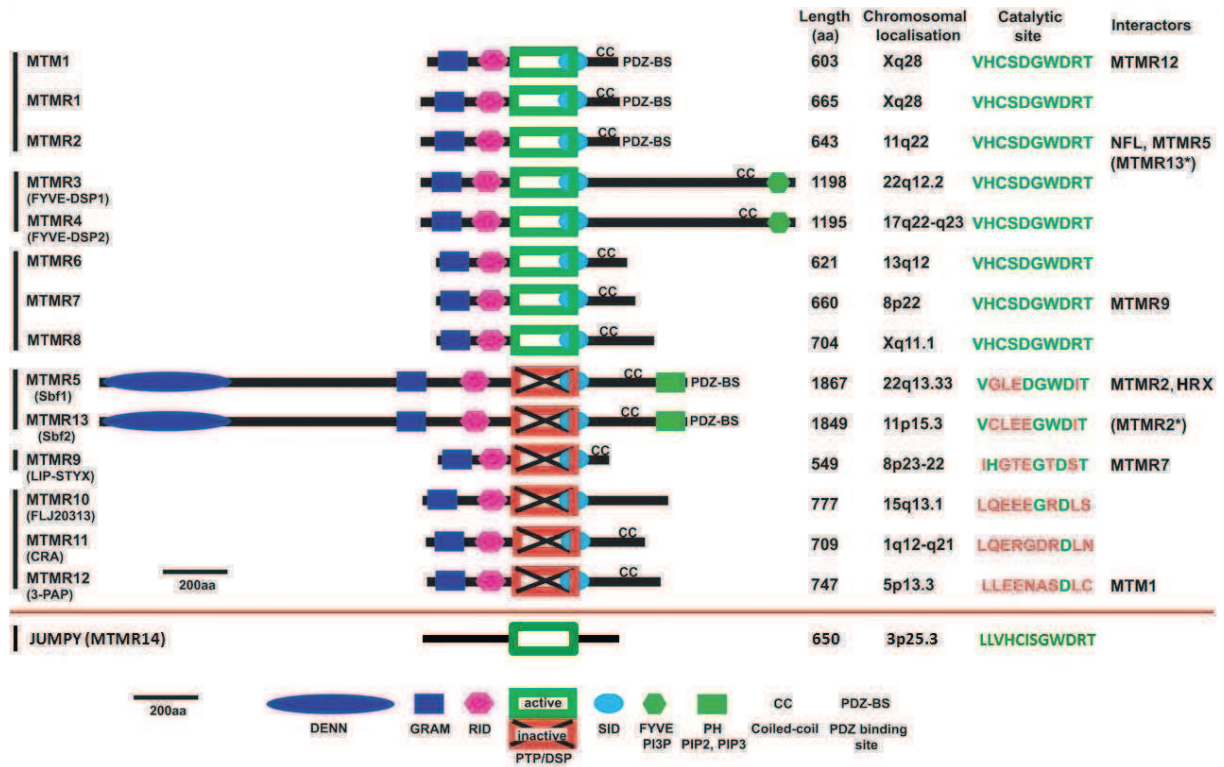


**Figure 1 : The phylogenetic distribution of members of myotubularine family and two others proteins : hJUMPY and PTPMT1 in 39 eukaryotic organisms**

In some cases, which are represented by large rectangles, only one homologue is found for several human counterparts (for instance, *Ciona intestinalis* possesses one homologue of the MTM1–MTMR1–MTMR2 group). When duplications occurred, the number of paralogues is indicated by a number. Proteins that lack important domain(s) are represented in grey. Vertical grey lines indicate a taxonomic group: Chordata (1), Echinodermata (2), Arthropoda (3), Nematoda (4), Viridiplantae (5), Ascomycota (6), Basidiomycota (7), Microsporidia (8), Mycetozoa (9), Entamoebidae (10), Stramenopiles (11), Euglenozoa (12), Alveolata (13) or Diplomonodida (14). We will design a phylogenetic tree between members of MTMs family and JUMPY/MTMR14 for the final version of the review

(Lecompte et al., Trends Biochem Sci 2008)

# Introduction

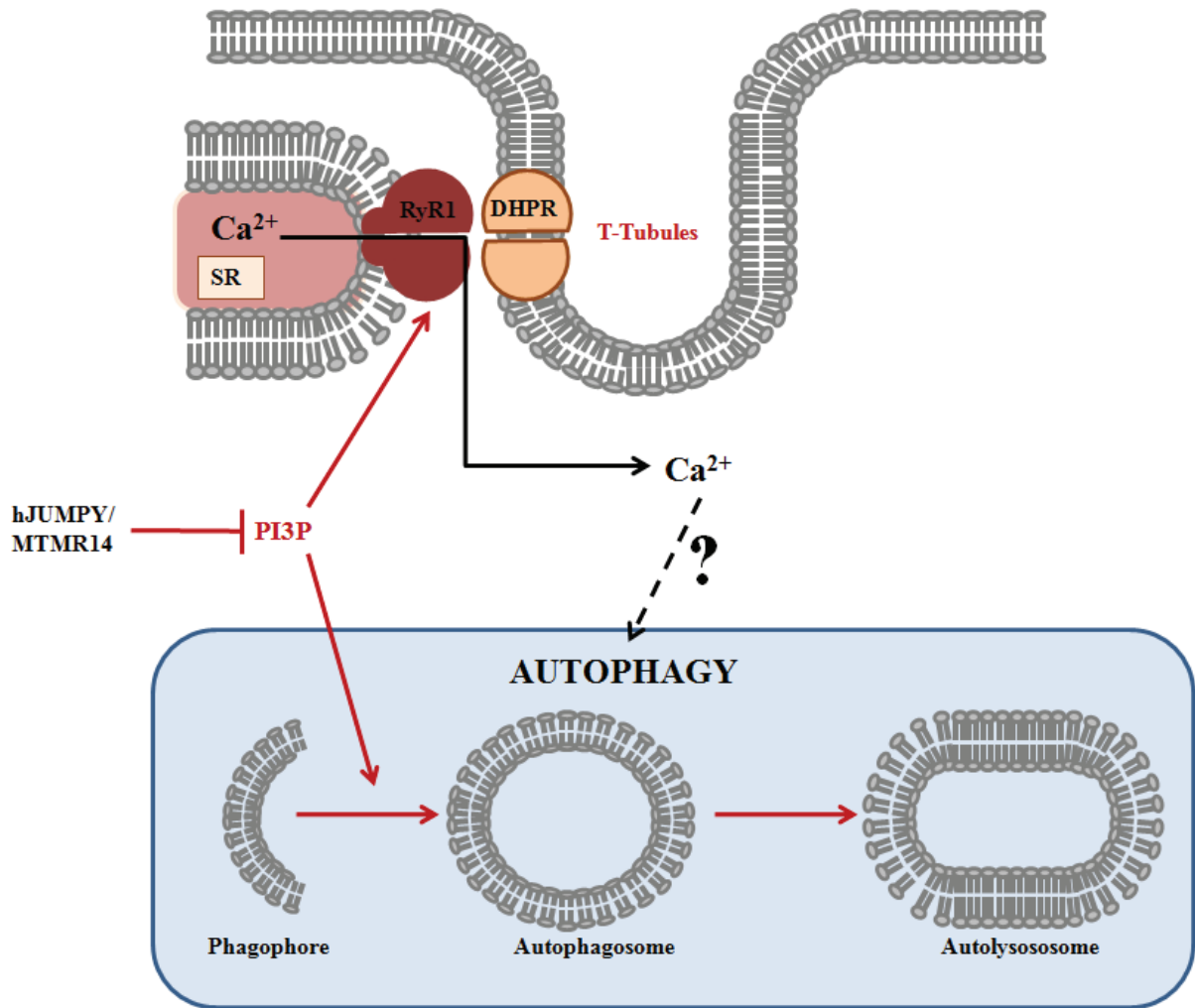


**Figure 2 : Comparison of human Myotubularin members and human JUMPY with their domains**

Eight active and six inactive myotubularins phosphatases are present in humans and one JUMPY gene. They all feature a characteristic CX5R catalytic motif of Protein Tyrosine Phosphatases (PTPs) but catalytically inactive myotubularins contain naturally-occurring missense substitutions that involve the Cys residue of this motif.

(According to Laporte et al., HMG, 2003)

## Introduction



**Figure 3 : Hypothesis on the possible role of hJUMPY on intracellular PI3P pools**  
hJUMPY inhibits the accumulation of  $\text{PtdIns}(3,5)\text{P}_2$  and then inhibits the direct activation of RYR1 channels. If JUMPY is absent, we can observe a partial depletion in the sarcoplasmic reticulum of JUMPY KO mice, caused by the direct activation of the RYR1  $\text{Ca}^{2+}$  release channel. JUMPY inhibits autophagy by dephosphorylating  $\text{PtdIns}(3)\text{P}$  involved in autophagosome formation. JUMPY dephosphorylates a pool of  $\text{PtdIns}(3)\text{P}$  involved in WIPI-1 binding and Atg9 retrieval indicating that hJUMPY seems to act directly at an early stage of autophagic process.

RyR1 : Ryanodine receptor 1; DHPR : Dihydropyridine receptor; SR: Sarcoplasmic reticulum

## 2. Implication de RYR1

### a. Descriptions histologiques et cliniques des patients

Une première étude avait décrit une jeune femme de 16 ans qui présentait une hypotonie néonatale, une ophtalmoplégie, des mouvements réduits et des difficultés pour manger nécessitant un tube gastrique pendant deux semaines (Jungbluth, Zhou et al. 2007). La grossesse s'était compliquée avec un polyhydramnios et une réduction des mouvements fœtaux. Elle acquit la marche sans aide vers 14 mois, souffre de problèmes respiratoires récurrents et d'une ophtalmoplégie externe (paralysie des muscles de l'œil). Deux biopsies faites à un an et 9 ans ont pu être examinées. A l'âge d'un an, la biopsie montrait deux populations de fibres avec une hypotrophie des fibres de type 1. Les noyaux centraux caractéristiques des CNM étaient présents dans de nombreuses fibres hypotrophiques et une accumulation d'enzymes oxydatives au centre des fibres pouvait être observée. La biopsie ne montrait pas de nécrose excessive ni d'excès de tissu conjonctif. La seconde biopsie, faite à l'âge de 9 ans, montrait une variation modérée dans la taille des fibres, des noyaux centraux dans plusieurs fibres, et une augmentation modérée des tissus conjonctifs. Le marquage des enzymes oxydatives montrait, en plus, une perte centrale du marquage et les images par résonance magnétique du muscle de la patiente étaient identiques à celles de patients atteints de multiples cores. L'analyse génétique de la patiente avait amené à impliquer le gène RyR1 puisqu'une mutation avait été identifiée dans ce gène (Jungbluth, Zhou et al. 2007).

Aucune autre étude n'avait confirmé le rôle de RyR1 dans les myopathies centronucléaires jusqu'à celle récente de Wilmshurst et collègues (Wilmshurst, Lillis et al. 2010). En effet, 24 patients avec un diagnostic de myopathies à centralisation des noyaux ont été séquencés et pour 17 d'entre eux, des mutations hétérozygotes dans le gène RyR1 ont pu être identifiées. 11 patients présentaient une réduction des mouvements fœtaux et tous, à l'exception d'un patient, une hypotonie et une faiblesse musculaire dès la naissance (Figure 1). Une implication bulbaire a été fréquemment trouvée menant à des difficultés pour manger. En effet, beaucoup de patients ont eu besoin d'un tube gastrique pour les aider à manger pendant la période néonatale. Les infections respiratoires étaient fréquentes, mais chez la plupart des patients elles se sont réduites avec le temps. Histologiquement, toutes les biopsies musculaires présentaient une augmentation des fibres de petites tailles avec des noyaux



## Introduction

---

centraux (noyaux au centre géométrique de la fibre) et des fibres avec des noyaux internalisés (noyaux apparaissant en dessous du sarcolème n'importe où dans le cytoplasme). Une augmentation modérée à forte des tissus graisseux et/ou conjonctif a été observée chez la plupart des patients. Pour 15 patients, une prédominance de fibres de type 1 a été observée ainsi qu'une hypertrophie des fibres de type 2 chez 12 patients. Enfin plusieurs patients présentaient des biopsies avec la présence de cores centraux, de minicores ou de structures ressemblant à des cores (Figure 1).

### **b. Mutations dans le gène RyR1 : impact sur la fonction musculaire**

Le gène du récepteur à la Ryanodine (RyR1) code pour un récepteur membranaire retrouvé dans le muscle squelettique RYR1 (Figure 2a). Sa principale fonction est d'être un canal de libération du calcium au niveau du réticulum sarcoplasmique (RS). Il sert également de lien entre le réticulum sarcoplasmique et les tubules-transverses (tubules-T) responsables du couplage excitation-contraction (Figure 2b). En effet, la contraction du muscle squelettique est causée par une brusque augmentation du  $Ca^{2+}$  myoplasmique provenant du RS. Elle est déclenchée par une dépolarisation membranaire causée par l'excitation nerveuse de la fibre musculaire. La dépolarisation est capable de se propager jusqu'à des invaginations de la membrane plasmique appelées les tubules-T. La première étape du couplage excitation-contraction commence alors par l'activation du récepteur des dihydropyridines (DHPR), un canal calcique de la membrane des tubules-T sensible au voltage. Cette activation du canal DHPR va être responsable de l'activation du canal RYR1 par une interaction mécanique directe entre ces deux canaux.

Le canal RYR1 est en fait un complexe macromoléculaire formé par un homotétramère de sous unités RYR1 (565 kDa par sous unité), auxquelles sont associées de nombreuses protéines régulatrices telles que la calmoduline, la triadine, la calséquestrine ou 12kDa FK506-binding protein (FKBP12) (Figure 3). Chaque sous unité est formée d'une partie transmembranaire carboxy-terminale contenant le pore et d'une large partie aminoterminal cytoplasmique impliquée dans la régulation de l'activité du canal.

Dans la première étude, de 2007, une mutation hétérozygote dominante *de novo*, Ser4112Leu, dans l'exon 90 du gène RyR1 (chr. 19q13.1) a été identifiée, chez la patiente

## Introduction

---

préalablement diagnostiquée avec un phénotype CNM (Jungbluth, Zhou et al. 2007). Cette mutation induit la substitution d'un acide aminé polaire (Ser), conservé dans les trois isoformes de RyR1 et dans toutes les espèces, par un acide aminé non polaire (Leu). Cette étude a pu montrer que cette mutation ne cause aucun changement de la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire ni de la quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  libérée lors de la dépolarisation induite par le KCl. En revanche, elle semble modifier la sensibilité de la cellule à la concentration de KCl. Les auteurs concluent donc que les cellules portant la mutation Ser4112Leu pourraient être plus sensibles à la dépolarisation (Jungbluth, Zhou et al. 2007).

Plus de 200 mutations du gène RyR1 ont été identifiées et sont responsables de pathologies différentes. Ainsi l'hyperthermie maligne *per* anesthésique (HM) est principalement due à des mutations dans deux domaines, MH1 et MH2, localisés au niveau amino-terminal et central de RYR1. D'autres mutations ont été identifiées dans les cas de myopathies congénitales à cores (Treves, Anderson et al. 2005). Il s'agit d'une famille de myopathies de sévérité variable, à transmission dominante ou récessive et caractérisées par la présence d'altérations morphologiques des fibres musculaires, les cores. Ce sont des régions de désorganisation sarcomérique au sein desquelles on ne retrouve plus de mitochondries (Quane, Healy et al. 1993). Le nombre, la taille et la localisation des cores dans la fibre musculaire peuvent varier, ce qui permet de classer ces myopathies avec différents noms : les myopathies à cores centraux, les myopathies à multicores, les myopathies à minicores, etc. Les mutations des formes dominantes se retrouvent surtout dans la partie carboxy-terminale du canal (Jungbluth, Muller et al. 2002) et celles des formes récessives se retrouvent tout au long du gène (Scacheri, Hoffman et al. 2000). Certaines mutations sont responsables d'un phénotype « fuyant » où le canal est ouvert en continu d'où une élévation du  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique même au repos. D'autres mutations aboutissent à une perte du couplage fonctionnel entre le DHPR et RYR1, et un petit nombre affecte la quantité de molécules RYR1 présentes dans le RS.

Dans la deuxième étude de 2010, menées par le groupe de Wilmshurst et collègues, toutes les mutations identifiées entraînent une diminution de l'expression du gène codant pour la protéine RYR1 (Wilmshurst, Lillis et al. 2010). Des composés hétérozygotes de mutations non sens et faux sens ont été identifiées dans le gène RyR1 chez ces patients. Ainsi dans 14 patients provenant du Sud de l'Afrique, trois mutations récurrentes ont pu être identifiées :



## Introduction

---

1) la mutation c.5726-5727delArg = p.Glu1909GlyfsX39 (exon 35) associée à la mutation c.9242T>C = p.Met3081Thr (exon 63) ;

2) la mutation c.8342\_8343delTA = p.Ile2781ArgfsX49 (exon 53) associée à la mutation c.11941C>T = p.His3981Tyr (exon 87) ;

3) la mutation c.14524G>A = p.Val4842Met (exon 101) associée à la mutation c.10348-6C>G (intron 68), résultant en la production d'un transcrit aberrant qui contient l'intron 68 et produit ainsi un codon stop prématuré p.His3449ins33fsX54.

Bien que chez quatre patients, l'hérédité récessive semblait être confirmée, dans trois cas, une seule mutation missense hétérozygote de RyR1 héritée d'un parent asymptomatique a pu être identifiée, mettant donc en doute l'hérédité récessive. Toutes les mutations amenant à une diminution de plus de 50 % de l'expression du gène.

Ces deux études semblent donc montrer l'implication du gène RyR1 dans les myopathies à centralisation des noyaux. La deuxième étude émet l'hypothèse que les patients avec une mutation du gène RyR1 ne sont pas atteints de myopathies centronucléaires mais plutôt d'une nouvelle famille de myopathies qu'ils nomment les myopathies congénitales à noyaux centraux (Wilmshurst, Lillis et al. 2010). Ces patients présentent un phénotype très proche des myopathies centronucléaires et ont tous été diagnostiqués pour cette myopathie. Pourtant ils présentent aussi des anomalies proches des myopathies à cores. Les mutations dans ce gène pourraient être responsables d'une myopathie avec des anomalies histologiques observées communément dans les myopathies centronucléaires et dans les myopathies à cores, tout comme cela pourrait être le cas pour le gène hJUMPY.

### **B. Les myopathies centronucléaires**

#### **1. Introduction**

Les myopathies centronucléaires (CNM) sont des maladies génétiques rares, caractérisées par une faiblesse musculaire généralisée, par l'apparition d'une hypotonie associée à des anomalies des fibres musculaires squelettiques, ainsi qu'à une réduction des

## Introduction

---

mouvements fœtaux ou un délai dans les étapes motrices. La sévérité de la maladie est assez hétérogène puisqu'on peut retrouver des formes très sévères d'hypotonie néonatale mais aussi des formes asymptomatiques. Enfin l'évolution est non ou lentement progressive (Figure 4a.). L'analyse histologique sur des biopsies du muscle squelettique de patients atteints de myopathies centronucléaires met en évidence de petites fibres rondes à noyaux centraux, au lieu d'une localisation périphérique sous sarcolémmique (Figure 4b.). En effet, une cellule musculaire provient de la fusion de cellules entre elles et devenant plurinucléée, les noyaux migrent alors contre la membrane plasmique lors de l'étape finale de maturation musculaire (Figure 4c.).

La présence de noyaux centraux a été décrite dans plusieurs myopathies, comme la Dystrophie de Duchenne, dans des fibres en régénération (Endtz 1983), mais dans le cas des CNM, elle n'est associée à aucun processus ni de régénération excessive ni de nécrose, ce qui suggérerait plutôt un défaut de maintenance structurale de la fibre ou à un arrêt précoce de la maturation musculaire d'où la première dénomination myopathie myotubulaire (van Wijngaarden, Fleury et al. 1969).

Trois formes de myopathies centronucléaires ont été décrites : la forme liée au chromosome X (XLCNM ou myopathie myotubulaire) (OMIM 31040), la forme autosomique récessive (ARCNM) (OMIM 255200) et la forme autosomique dominante (ADCNM) (OMIM 160150).

## **2. Les trois formes de myopathies centronucléaires**

### **a. La myopathie centronucléaire liée au chromosome X**

La forme gonosomique appelée aussi myopathie myotubulaire, est transmise par le chromosome X et touche 1 garçon sur 50 000 nouveau-nés, au diagnostic moléculaire confirmé en France (Jungbluth, Wallgren-Pettersson et al. 2008).

De rares cas de femmes atteintes ont été décrits et sont probablement dus à l'inactivation préférentielle du chromosome X (Heckmatt, Sewry et al. 1985; Sawchak, Sher et al. 1991; Wallgren-Pettersson, Pelin et al. 1999; Hammans, Robinson et al. 2000; Sutton, Winer et al. 2001). Ces femmes présentent toutes en général une faiblesse faciale bénigne.

## Introduction

---

Cette forme est la plus sévère des CNM et se caractérise dès la naissance par une hypotonie et une faiblesse musculaire généralisée très sévère, des difficultés respiratoires ainsi qu'une ophtalmoplégie externe (paralysie des muscles de l'œil) (Figure 5a.) (McEntagart, Parsons et al. 2002).

Avant la naissance, des signes comme une réduction des mouvements fœtaux, associée à la présence d'une quantité très importante de liquide amniotique (hydramnios) peuvent faire pencher le diagnostic.

A la naissance, l'enfant présente souvent des anomalies qui peuvent faire évoquer une dystrophie myotonique de Steinert, y compris sur la base de l'examen de la biopsie. L'enfant est anormalement mou (hypotonie néonatale) avec un visage immobile et en insuffisance respiratoire, nécessitant une aide ventilatoire. On peut aussi observer des troubles de la déglutition, une atteinte massive de la succion, une paralysie des muscles du visage (diplégie faciale), les paupières tombantes (ptosis), une paralysie des muscles des yeux, une gracilité des côtes, et des déformations du thorax et des pieds sont fréquemment associées. L'atteinte musculaire est non progressive, bien que des complications liées à la maladie puissent apparaître (Pierson, Tomczak et al. 2005) et ne s'accompagnent pas de défauts cognitifs (Wallgren-Pettersson, Clarke et al. 1995).

L'évolution est, le plus souvent, rapidement fatale dans la première année de vie par insuffisance respiratoire. Toutefois certains patients présentant des troubles respiratoires à la naissance ont survécu jusqu'à l'âge adulte (van Wijngaarden, Fleury et al. 1969; Heckmatt, Sewry et al. 1985; Wallgren-Pettersson, Clarke et al. 1995).

L'enfant qui passe ainsi le cap néonatal, est susceptible d'acquies avec beaucoup de retard la station assise, la station debout et même la marche. Il présente toutefois une faiblesse musculaire très marquée et une ophtalmoplégie. Il peut aussi développer des complications hépatiques, endocriniennes et hématologiques (Herman, Finegold et al. 1999; Chanzy, Routon et al. 2003; Yu, Manson et al. 2003). Le développement intellectuel, quant à lui, est normal. Bien que la plupart des cas soit néonataux, il arrive aussi que la faiblesse musculaire apparaisse plus tard au cours de la vie (Hoffjan, Thiels et al. 2006).

Histologiquement, cette forme liée au chromosome X est caractérisée par l'existence d'un muscle pathologique, immature avec des fibres musculaires, pour beaucoup de petits calibres et rondes. La plupart présente des noyaux situés au centre de la fibre (Braga, Gerber et al. 1990). La quantité de ces fibres à noyaux centraux est variable et ne semble pas être corrélée avec la sévérité de la maladie (Spiro, Shy et al. 1966; Helliwell, Ellis et al. 1998). Les

## Introduction

---

fibres ont de plus, une région périnucléaire présentant une accumulation de mitochondries et de glycogène mais dépourvue de myofilaments reflétant une désorganisation des myofibrilles. Une prédominance des fibres de type 1 (lentes) est aussi observée. Tout cela conférant à ces fibres un aspect de fibres immatures, n'ayant pas achevé leur processus de maturation (Spiro, Shy et al. 1966).

Le gène en cause, situé en Xq28, est celui de la myotubularine, MTM1, une tyrosine-phosphatase (Laporte, Hu et al. 1996).

### **b. Les myopathies centronucléaires autosomiques récessives et dominantes**

Les myopathies centronucléaires autosomiques sont caractérisées par une faiblesse musculaire rarement fatale (Pierson, Tomczak et al. 2005). Du point de vue histologique, les fibres musculaires sont généralement plus polygonales que celles de la forme liée au chromosome X, peut être dû à l'âge plus avancé des patients. Dans les formes dominantes, le réseau intermyofibrillaire subit un réarrangement radial partant du noyau central, ce qui permet de la distinguer des autres formes autosomiques et de celle liée au chromosome X (Romero 2010).

#### **i. La myopathie centronucléaire autosomique récessive (ARCNM)**

Cette forme récessive affecte aussi bien les hommes que les femmes et se différencie de celle liée au chromosome X par une apparition de la faiblesse musculaire au cours de l'enfance ou au début de l'adolescence, de façon générale, bien que des cas présentant une hypotonie à la naissance aient été rapportés (Wallgren-Pettersson, Clarke et al. 1995).

Les patients atteints de CNM autosomiques récessives (ARCNM) présentent une faiblesse musculaire progressive touchant les extrémités proximales et/ou distales (Siegel 1983) s'accompagnant ou non d'une ophtalmoparésie, c'est-à-dire d'une paralysie légère des muscles du globe oculaire. Une faiblesse musculaire faciale est également décrite ainsi qu'une atteinte des muscles masticateurs (Figure 5b.).

## Introduction

---

Les ARCNM peuvent être divisées en trois sous groupes : une forme avec une apparition à un âge précoce des symptômes associée à une ophtalmoparésie, une forme avec une apparition à un âge précoce des symptômes sans ophtalmoparésie et une forme avec un âge tardif d'apparition des symptômes (adolescence) sans ophtalmoparésie (Jeannet, Bassez et al. 2004). Des anomalies du squelette sont communes aux trois formes telles que la scoliose et l'arcade palatine haute ainsi que des anomalies des pieds (Page, Fletcher et al. 1982; Siegel 1983). Enfin une cardiomyopathie peut être associée de façon sporadique.

Les patients atteints d'une ophtalmoparésie sont souvent plus sévèrement atteints que les autres et les patients avec un âge tardif d'apparition des symptômes ont un phénotype clinique similaire aux patients atteints d'ADCNM tandis que certains cas d'ARCNM ont un phénotype sévère ressemblant à celui des myopathies myotubulaires (Pierson, Tomczak et al. 2005).

Des mutations dans le gène de l'amphiphysine 2/BIN1, situé en 2q14.3, ont été trouvées par notre équipe (Nicot, Toussaint et al. 2007).

### **ii. La myopathie centronucléaire autosomique dominante (ADCNM)**

La forme autosomique dominante (ADCNM) affecte les hommes et les femmes le plus souvent à l'adolescence ou à l'âge adulte. C'est la forme la moins sévère des CNM, caractérisée par une hypotonie légère et progressive s'accompagnant parfois de déformations orthopédiques, d'une atteinte des muscles du visage et des muscles oculaires ainsi que des muscles distaux dans certains cas (Figure 5c.).

Elles sont subdivisées en deux groupes selon la présence d'une hypertrophie diffuse des muscles ou non (Pierson, Tomczak et al. 2005). Bien que des cas sévères et précoces aient été décrits (Bitoun, Bevilacqua et al. 2007), les patients ont un phénotype clinique plus modéré que ceux atteints d'ARCNM ou de la forme liée au chromosome X.

La présence de noyaux centraux dans les fibres musculaires des patients atteints d'ADCNM est associée à une prédominance et une hypotrophie des fibres de type 1. La présence de travées sarcoplasmiques irradiant des noyaux centraux donne à ces fibres un aspect caractéristique en « rayons de roue » (Jeannet, Bassez et al. 2004). Ce dernier aspect semble spécifique aux formes autosomiques des CNM.

## Introduction

---

La taille des fibres observées dans le cas des myopathies centronucléaires autosomiques est plus variable et elles sont moins rondes que les XLCNM. Cela est sans doute dû à une sévérité moindre de la pathologie et à un âge plus avancé des patients lors de la biopsie musculaire. Les noyaux centraux sont présents aussi bien dans les fibres de petites tailles que celles de tailles normales, ou dans le cas de l'ADCNM, dans les fibres hypertrophiques.

Le gène en cause, situé en 19p13.2, est celui de la dynamine 2 (DNM2) (Bitoun, Maugendre et al. 2005).

Dans une revue publiée en février 2010, Romero NB, en faisant le point sur les anomalies histopathologiques caractéristiques des CNM, permet de proposer ou de rejeter l'un des gènes identifiés comme cause de CNM (Romero 2010). En effet, une fréquence élevée de fibres d'aspect en « rayons de roues » (fibres RSS) est significative d'une myopathie due à une mutation dans le gène dynamine 2. La présence de fibres de type 1 et de type 2 de mêmes diamètres impliquera plutôt le gène amphiphysine 2/BIN1, tandis que des fibres « en collier » sont observées dans des cas de myopathies à début précoce dues à des mutations dans le gène myotubularine.

Un phénomène d'internalisation nucléaire (un ou plusieurs noyaux disposés n'importe où dans le sarcoplasme) orientera plutôt vers le gène myotubularine ou le gène RyR1 tandis qu'un phénomène de centralisation nucléaire (un noyau au centre de la fibre) sera caractéristique d'une myopathie due à des mutations dans le gène amphiphysine 2/BIN1 ou dynamine 2 (Romero 2010).

### **3. Les protéines MAD (Myotubularine/Amphiphysine/Dynamine) : fonction cellulaire et implication dans la physiopathologie des CNM**

Trois formes de myopathies centronucléaires ont été décrites à ce jour. Avant mon arrivée dans l'équipe de Jocelyn Laporte, seules des mutations dans la myotubularine et la dynamine 2 (Figure 6a. et c.) avaient été identifiées, respectivement dans la forme liée au chromosome X (Laporte, Hu et al. 1996) et dans la forme autosomique dominante (Bitoun, Maugendre et al. 2005). Aucun gène n'avait été identifié pour la forme autosomique récessive.

## Introduction

---

A cette époque, notre équipe avait commencé à séquencer des gènes candidats pour cette forme et à identifier des mutations dans le gène BIN1, une isoforme particulière de l'amphiphysine 2 (Figure 6b.) (Nicot, Toussaint et al. 2007).

### a. La myotubularine MTM1

La myotubularine MTM1 est un membre fondateur d'une famille de phosphatases codées par 14 gènes chez l'homme : les myotubularines (MTM1 et MTMR1 à 13) (Figure 7a.) (Laporte, Hu et al. 1996). Certaines études, dont celle d'Andres Alonso et collègues, ajoutent à cette famille deux nouvelles protéines : hJUMPY ou MTMR14 et MTMR15 (Alonso, Sasin et al. 2004). La revue écrite précédemment sur JUMPY (page 15) a été l'occasion de discuter plus en détail de l'intégration ou non de hJUMPY (MTMR14) dans la famille des myotubularines.

Certains des membres de la famille des myotubularines ne possèdent pas les acides aminés essentiels à l'activité enzymatique, elles sont appelées phosphatases mortes ou silencieuses (dead phosphatases) (MTMR5, 9, 10, 11, 12, 13 et MTMR15) et semblent réguler les phosphatases actives en formant des hétérodimères avec elles (Figure 7b.). Cinq couples de myotubularines ont été identifiés pour le moment : MTM1/MTMR12 (Nandurkar, Layton et al. 2003), MTMR2/MTMR5 (Kim, Vacratsis et al. 2003), MTMR2/MTMR13 (Robinson and Dixon 2005), MTMR7/MTMR9 (Mochizuki and Majerus 2003) et MTMR6/MTMR9 (Zou, Chang et al. 2009).

Dans le cas du nématode, *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), 6 myotubularines ont été identifiées dont 3 actives : mtm-1, mtm-6 et mtm-3 et 3 inactives : mtm-5, mtm-9 et mtm-10 (Laporte, Blondeau et al. 2001; Wishart, Taylor et al. 2001; Laporte, Bedez et al. 2003). Un hétérodimère d'active/inactive myotubularine a été identifié entre mtm-6 et mtm-9. Les deux protéines appartiennent respectivement au sous groupe de MTMR7 et MTMR9 humain. Cela suggérerait donc que la coopération entre les myotubularines actives et les inactives est conservée à travers l'évolution et est essentielle pour leurs fonctions cellulaires.

En raison de leurs rôles essentiels, des membres de la famille des myotubularines sont impliqués dans plusieurs maladies rares comme la myopathie centronucléaire liée au chromosome X (MTM1) et deux formes des neuropathies démyélinisantes de Charcot-Marie-



## Introduction

---

Tooth (MTMR2 et MTMR13) (Figure 8). La phosphatase active MTMR2 est mutée dans la forme la plus sévère de ces neuropathies, tandis que la phosphatase morte MTMR13 a été trouvée mutée dans une forme moins sévère (Laporte, Bedez et al. 2003).

MTM1 et MTMR2 ont une séquence très similaire, avec près de 90 % d'identité et sont toutes les deux ubiquitairement exprimées. Pourtant, des mutations dans chacune d'entre elles, ne mènent pas à la même maladie, ce qui pourrait donc indiquer que les myotubularines n'ont pas un rôle redondant.

La forme liée au chromosome X de CNM est causée par des mutations dans le gène MTM1 (Laporte, Hu et al. 1996). Dans 90 % des cas diagnostiqués pour cette forme, des mutations dans ce gène ont été identifiées ce qui a amené à proposer une analyse génétique moléculaire de routine de MTM1.

Plus de 200 mutations dans le gène MTM1 ont été identifiées à ce jour, tout au long de la séquence codante de la myotubularine (Figure 6a.), mais des « hots-spots » existent, en particulier les exons 12, 4, 11, 8 et 9 sont les plus souvent mutés (De Luca, Torrente et al. 1999; Laporte, Biancalana et al. 2000; Bertini, Biancalana et al. 2004). Tous les types de mutations peuvent alors être identifiés mais trois sont majoritairement retrouvés : une mutation d'épissage c.1261-10A>G dans l'intron en amont de l'exon 12 qui mène à l'insertion de trois acides aminés (FIQ) à la position 420, une mutation faux-sens R214C au niveau de l'exon 9 et une délétion c.141-144delAGAA menant à un décalage du cadre de lecture au niveau de l'acide aminé 48 dans l'exon 4.

La majorité de ces mutations induisent une diminution du niveau de la protéine (de Gouyon, Zhao et al. 1997; Laporte, Guiraud-Chaumeil et al. 1997; Tanner, Laporte et al. 1998), tandis qu'il est normal dans les cellules de patients atteints de CNM autosomiques (Laporte, Kress et al. 2001), prouvant que ce n'est pas la perte indirecte de MTM1 qui est responsable des formes autosomiques.

La plupart de ces mutations provoquent la forme sévère et néonatale des CNM. Néanmoins certaines mutations peuvent être associées à un pronostic plus favorable (Laporte, Biancalana et al. 2000; McEntagart, Parsons et al. 2002).

La myotubularine est constituée de différents domaines (Figure 9a.) :

- Un domaine GRAM (Glucosyltransferase, Rab-like GTPase Activator and Myotubularins) capable de se lier aux phosphoinositides. Il permet ainsi



## Introduction

---

l'adressage de la myotubularine aux membranes enrichies en PtdIns(3)P et en PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> (Schaletzky, Dove et al. 2003).

- Un domaine RID (Rac-Induced Recruitment Domain) indispensable pour le recrutement de la myotubularine à la membrane plasmique après activation de la GTPase Rac1 (Laporte, Kress et al. 2001). Il est de plus, responsable de l'interaction de MTM1 avec les filaments intermédiaires (Hnia, Tronchere et al. 2010).
- Un domaine phosphatase PTP, qui contient le site actif de la protéine. Il est constitué de trois résidus essentiels pour l'activité de la myotubularine : le motif CX5R, formant la poche catalytique, et d'un résidu aspartate, situé proche de cette poche, impliqué dans la libération des phosphates (Begley and Dixon 2005).
- Un domaine SID (SET-Interacting Domain) impliqué dans les interactions protéines-protéines. Il permet l'interaction avec MTMR12 (Nandurkar, Layton et al. 2003).
- Des domaines coiled-coil et PDZ-binding aussi impliqués dans les interactions protéines-protéines. Le domaine PDZ permet l'interaction avec des protéines contenant un domaine PDZ ce qui facilite la formation de complexe de signalisation (Zimmermann 2006).

La myotubularine (MTM1) est une phosphatase qui possède deux substrats lipidiques appelés phosphatidylinositol-(3)-phosphate (PtdIns(3)P) et phosphatidylinositol-(3,5)-bisphosphate (PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>) (Figure 9b.) (Laporte, Bedez et al. 2003; Pierson, Tomczak et al. 2005).

Les phosphoinositides sont des lipides jouant un rôle essentiel dans la transduction du signal. Ils sont ainsi impliqués dans de nombreuses fonctions telles que la mobilité cellulaire, la fixation des protéines à la membrane, la mitogénèse, le trafic intracellulaire ou l'exocytose

## Introduction

---

(Payraastre 2004). Ils sont composés d'un groupement inositol, d'une chaîne d'acides gras et d'un diacylglycérol (Figure 9b.). Le groupement inositol peut être phosphorylé en trois points et permet ainsi la formation de sept entités de phosphoinositides différents par interconversion, cette dernière étape étant réalisée par des kinases et des phosphatases. Suivant leurs états de phosphorylation, ils recrutent des effecteurs protéiques spécifiques à des domaines membranaires. Par exemple, le PtdIns(3)P recrute la protéine EEA1 aux endosomes (Simonsen, Lippe et al. 1998) et le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> recruterait entre autre l'amphiphysine à la membrane plasmique (Lee, Marcucci et al. 2002). C'est sous sa forme oligomérisée que la myotubularine est capable de déphosphoryler le PtdIns(3)P en PtdIns et le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> en PtdIns(5)P. Il faut noter que la myotubularine est l'une des rares protéines capable de produire ce PtdIns(5)P (Schaletzky, Dove et al. 2003; Tronchere, Laporte et al. 2004). Le PtdIns(3)P est localisé au niveau des endosomes précoces et à la membrane interne des corps multivésiculaires (CMV ou MVB : multivesicular body), il est impliqué dans le recrutement de l'appareil endocytique (Gillooly, Morrow et al. 2000). Tandis que le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> est enrichi au niveau des endosomes précoces et à la membrane externe des CMV, il y jouerait un rôle dans la régulation du volume vacuolaire. Il a été montré que des mutations dans les phosphatases et les kinases régulant le niveau d'expression de ces PtdIns sont associées à plusieurs pathologies humaines (Nicot and Laporte 2008). Je discuterai plus amplement du rôle cellulaire des phosphoinositides dans un chapitre suivant.

Excepté quelques études sur la fonction cellulaire de MTM1 sur l'implication dans les voies de transport vésiculaire (Tsujita, Itoh et al. 2004) et le contrôle morphologique et fonctionnel des endosomes précoces (Cao, Laporte et al. 2007), peu de choses sont connues sur la fonction musculaire de cette protéine.

### **b. L'amphiphysine 2**

Deux gènes de l'amphiphysine existent chez les mammifères : l'amphiphysine 1 et l'amphiphysine 2 (Ramjaun, Micheva et al. 1997). L'amphiphysine 1 est une protéine neuronale, exprimée dans le cerveau (De Camilli, Thomas et al. 1993), où elle participe au mécanisme d'endocytose au niveau des synapses. L'amphiphysine 2 est retrouvée plus ubiquitairement dans l'organisme, mais est exprimée plus majoritairement dans le cerveau et

## Introduction

---

le muscle squelettique (Butler, David et al. 1997; Leprince, Romero et al. 1997; Ramjaun, Micheva et al. 1997).

L'amphiphysine 1 et l'amphiphysine 2 sont capables de former des dimères dans le cerveau (Wigge, Kohler et al. 1997).

L'amphiphysine 2 possède de nombreuses isoformes selon l'épissage alternatif de six exons. Toutes les isoformes de l'amphiphysine 2 possèdent un domaine c-myc impliqué dans la prolifération cellulaire (Sakamuro, Elliott et al. 1996; Elliott, Sakamuro et al. 1999). Les isoformes neuronales contiennent, quant à elles, un domaine de liaison à la clathrine et à l'adaptateur AP-2.

### **i. L'amphiphysine 2 et les cancers**

La première fonction, décrite dans la littérature, de l'amphiphysine 2 a été celle de suppresseur de tumeurs. En effet des analyses, par immunohistochimie et d'ARN, ont montré que l'amphiphysine 2 est fréquemment absente ou inactivée par des épissages alternatifs aberrants dans les tumeurs métastatiques et dans les lignées cellulaires de tumeurs indépendantes des androgènes tels que le cancer de la prostate (Ge, Minhas et al. 2000). De plus, une perte partielle ou complète de l'amphiphysine 2 a été décrite dans 60 % des cas de cancer du sein (Ge, Minhas et al. 2000). Dans les mélanomes, l'exon 13A, de l'isoforme spécifique du cerveau de l'amphiphysine 2, est anormalement épissé, ce qui provoque une perte de fonction de la protéine. Cette perte de fonction de l'amphiphysine 2 abolit sa capacité à inhiber la transformation en cellule maligne induite par c-myc ou les adénovirus (Ge, DuHadaway et al. 1999).

Toutes les isoformes de l'amphiphysine 2 possèdent un domaine de liaison à la protéine pro-apoptotique c-myc (MBD : Myc binding domain) (Figure 10a.). Grâce à ce domaine MBD de liaison à c-myc, l'amphiphysine 2 est capable d'inhiber l'activité oncogénique de c-myc (Sakamuro, Elliott et al. 1996). L'amphiphysine 2 semble donc inhiber sélectivement la transformation cellulaire, induite par c-myc, qui est impliquée dans de nombreux cancers humains.

L'introduction de l'amphiphysine 2 dans des cellules de carcinomes inhibe sélectivement la croissance de ces cellules qui n'expriment pas la protéine endogène, ce qui pourrait suggérer un rôle de l'amphiphysine 2 dans la régulation de la différenciation

## Introduction

---

cellulaire (Sakamuro, Elliott et al. 1996; Elliott, Sakamuro et al. 1999). Enfin, l'expression d'une isoforme de l'amphiphysine 2 est fortement réduite dans les neuroblastomes.

Cependant, une dernière étude récente propose que l'amphiphysine 2 serait un modificateur négatif ou un inhibiteur de la progression tumorale, initiée par l'activation de la voie *Ras*, dans le cancer du sein, plutôt qu'un suppresseur de tumeur (Chang, Boulden et al. 2007).

### ii. L'amphiphysine 2 et l'endocytose

Toutes les isoformes de l'amphiphysine 2 contiennent des domaines pouvant jouer un rôle dans l'endocytose. En effet, elles comportent toutes un domaine N-BAR et un domaine SH3 (Figure 10a.). Le domaine N-BAR, présent à l'extrémité amino-terminale de la protéine, est composé d'une hélice amphipatique en N-terminale qui permet l'insertion de la protéine dans les membranes et d'un domaine coiled-coil constitué par trois hélices  $\alpha$ , pouvant former des homodimères (<http://www.endocytosis.org/Amphiphysin/amphiphysin.html>).

L'homodimère forme alors un domaine incurvé en forme de banane qui est capable de sentir et de courber les membranes en interagissant, grâce à ses acides aminés chargés positivement, avec les phospholipides de la membrane plasmique chargés négativement (Figure 10b.) (Takei, Slepnev et al. 1999; Peter, Kent et al. 2004). Cette fonction est souvent utilisée durant la phase tardive de l'endocytose. Par exemple, les amphiphysines peuvent se lier aux vésicules à clathrine naissantes et recruter alors de nombreuses protéines telles que les dynamines.

Ce domaine BAR, tout comme celui de l'endophiline, est capable de déformer les membranes de liposomes d'une taille de 50 à 100 nm pour former des tubules de membranes (Takei, Slepnev et al. 1999). Or Fotin et collègues, ont démontré en 2004 que la taille des vésicules de clathrine était bien supérieure à 70 nm, il semblerait donc que l'amphiphysine 2 ne soit pas impliquée dans l'initiation de la courbure des vésicules à clathrine mais que d'autres protéines de la famille des protéines à domaine BAR interviennent dans ce processus (Fotin, Cheng et al. 2004). Les protéines à domaines F-BAR seraient, par exemple, les initiatrices de la formation des vésicules à clathrine puisqu'elles sont capables de déformer des liposomes d'un diamètre supérieur à 100 nm et de former des tubules de 65 nm de

## Introduction

---

diamètre (Shimada, Niwa et al. 2007). Ces protéines à domaine F-BAR, comme FBP17, CIP4 ou Toca-1 serait capables de sentir la faible courbure initiée par des protéines telles que l'epsine, de s'y accumuler et d'accentuer alors la courbure de la membrane en s'homodimérisant. Ce serait ainsi la première étape de formation des puits recouverts de clathrine. C'est alors que l'amphiphysine 2 serait recrutée afin d'accentuer encore la courbure et de permettre le recrutement d'autres protéines comme la dynamine 2 ou la synaptojanine via son domaine SH3 (Figure 11a.). Une fois le recrutement par l'amphiphysine 2 effectué, la dynamine 2 participerait à la fission des vésicules en formant un cou de faible diamètre autour de la vésicule (Shimada, Niwa et al. 2007).

Certaines isoformes particulières de l'amphiphysine 2, telles que les isoformes neuronales, contiennent en plus, des domaines de liaison à la clathrine et à AP-2. Tous ces domaines permettraient à l'amphiphysine 2 d'être le lien entre la formation des vésicules à manteau de clathrine, la fission dépendante de la dynamine et la dissociation du manteau par la synaptojanine (McPherson, Garcia et al. 1996; Wigge and McMahon 1998; Cremona, Di Paolo et al. 1999).

Une autre étude a montré qu'une isoforme de l'amphiphysine 2, présente dans les macrophages, serait impliquée dans la phagocytose (Gold, Morrissette et al. 2000). En effet cette isoforme est capable de s'associer aux phagosomes précoces. Un mutant dominant négatif, dépourvu de son domaine C-terminal SH3, est capable de bloquer cette phagocytose au stade de l'extension membranaire, suggérant que l'amphiphysine 2 puisse avoir un rôle dans l'internalisation de particules.

Enfin, Leprince et collègues ont proposé une association entre un variant neuronal de l'amphiphysine 2 et SNX4 (Sorting Nexin 4), via le domaine N-terminal de l'amphiphysine 2 et le domaine C-terminal de SNX4 (Leprince, Le Scolan et al. 2003). Cette association se ferait au niveau des endosomes précoces et tardifs certainement via les phosphoinositides ainsi qu'au niveau du réticulum endoplasmique. En effet, les membres de la famille des SNX contiennent tous un domaine PX (Pleckstrin Homology Phox) capable de se lier aux phosphoinositides. Cette étude suggérerait que l'association amphiphysine 2/SNX4 serait importante pour le sort des endosomes après la formation des vésicules de l'endocytose.

## Introduction

---

### iii. L'isoforme BIN1 spécifique du muscle squelettique

L'isoforme musculaire de l'amphiphysine 2 est l'isoforme 8 : BIN1. Cette isoforme est mutée dans la forme autosomique récessive des CNM (Figure 6b.) (Nicot, Toussaint et al. 2007). Elle ne contient ni domaine de liaison à la clathrine, ni à l'AP-2, mais elle contient les domaines N-BAR et SH3, ainsi qu'un domaine PI, qui semble lui conférer une fonction spécifique sur laquelle je reviendrai dans le prochain paragraphe (Figure 12a.). En effet, le transcrit de BIN1 est le seul contenant l'exon 11 codant pour 15 acides aminés (RKKS~~KL~~FSRLRRKKN), avec de nombreuses charges positives (Lysine K, Arginine R), et codant pour ce domaine PI.

BIN1 semble avoir un rôle dans la déformation des membranes (Razzaq, Robinson et al. 2001; Lee, Marcucci et al. 2002) et l'exon PI spécifique lui confère la capacité de fixer le phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) situé au niveau de la membrane plasmique (Figure 12a.) (Lee, Marcucci et al. 2002). Il participe ainsi à l'induction de la courbure membranaire afin de former les tubules-T, essentiels à la cellule musculaire pour établir les échanges de calcium avec la membrane plasmique lors du mécanisme couplé d'excitation-contraction (Butler, David et al. 1997; Wechsler-Reya, Elliott et al. 1998; Lee, Marcucci et al. 2002).

Cette protéine BIN1 est exprimée dans les cellules musculaires matures, l'exon 11 étant inséré dans le transcrit lors de la différenciation des cellules musculaires (Wechsler-Reya, Elliott et al. 1998). Elle possède également un domaine N-BAR (Bin-Amphiphysin-Rvs) à son extrémité N-terminale, composé d'une hélice amphipatique en N-terminal qui s'insère dans la membrane créant ainsi une courbure, suivie du domaine coiled-coil BAR, pouvant former des homodimères. L'homodimère forme alors un domaine incurvé capable de sentir et courber les membranes (Peter, Kent et al. 2004). Elle possède aussi un domaine SH3 (Src Homology 3) situé à l'extrémité C-terminale de la protéine. Il est capable de se lier aux protéines possédant un domaine riche en proline (PRD) comme la dynamine 1 pour l'amphiphysine 1, la dynamine 2 pour l'amphiphysine 2 (Owen, Wigge et al. 1998) ou encore la Synaptojanine (Figure 10b.). Ce domaine est aussi capable de se lier au domaine PI en intra ou intermoléculaire et permet ainsi de réguler la liaison de la protéine aux protéines possédant un domaine PRD (Lee, Marcucci et al. 2002; Kojima, Hashimoto et al. 2004). Cette liaison pourrait ainsi affaiblir la liaison de BIN1 à la dynamine 2. Seule la liaison du PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> au

## Introduction

---

domaine PI de BIN1 semble être capable d'empêcher la liaison du domaine SH3. Ainsi le recrutement de BIN1 au niveau de la membrane plasmique par le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> permettrait la libération du domaine SH3 qui pourrait alors fixer les protéines avec un domaine PRD (Figure 11b.).

La surexpression de cette isoforme spécifique BIN1 dans des cellules en culture provoque la formation de tubules reliés à la membrane plasmique, contrairement aux autres isoformes (Figure 12b.) (Lee, Marcucci et al. 2002). Et un knock-out de l'amphiphysine 2 chez la Drosophile provoque une malformation des tubules-T ainsi qu'une myopathie (Razzaq, Robinson et al. 2001), ce qui indique que BIN1 pourrait avoir un rôle important dans la fibre musculaire.

### **c. La dynamine 2 DNM2**

La dynamine 2 fait partie d'une famille de larges GTPases comprenant des dynamines et des « dynamin-related », qui sont impliquées dans de nombreux processus du trafic membranaire tels que la formation des vésicules d'endocytose et de sécrétion ainsi que la fission des mitochondries et la dynamique du cytosquelette d'actine (McNiven, Cao et al. 2000). Les dynamines peuvent être différenciées des autres GTPases, tels que les protéines Ras, par certains critères comme leur oligomérisation dépendante de l'activation du domaine GTPase, leur faible affinité de liaison au GTP et leur possibilité d'interaction avec des lipides membranaires (Sontag, Fykse et al. 1994; Praefcke and McMahon 2004). Ainsi, tandis que les protéines Ras nécessite l'action de GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) pour être activées, les dynamines peuvent s'auto-activer lorsque leur masse atteint un certain seuil (Sweitzer and Hinshaw 1998).

Il existe trois gènes codant pour des dynamines chez les mammifères. La dynamine 1 (chr.9q34) est une protéine exprimée dans le cerveau au niveau présynaptique, tandis que la dynamine 3 (chr.1q24.3) est retrouvée dans les testicules et dans le cerveau au niveau postsynaptique. La dynamine 2 (chr.19p13.2) quant à elle, est ubiquitaire avec une expression plus importante dans le cœur et dans le muscle (Praefcke and McMahon 2004).

## Introduction

---

En plus de ces trois gènes, chacun d'eux possède de nombreuses isoformes d'épissage, dont au moins six pour la dynamine 2. Ces trois protéines présentent toutes la même structure protéique avec (Figure 13a.):

- Un domaine GTPase, contenant quatre motifs de liaison au GTP de G1 à G4, nécessaires pour la liaison de la guanine et pour l'hydrolyse. L'activité catalytique GTPase peut être stimulée par l'oligomérisation de la protéine (Cao, Garcia et al. 1998). La dynamine 2 possède la plus haute affinité pour le GTP ainsi que la plus forte activité GTPase (Warnock, Baba et al. 1997).
- Un domaine intermédiaire impliqué dans la polymérisation de la molécule et l'assemblage de la protéine, mais dont la fonction reste encore vague (Ramachandran, Surka et al. 2007). L'activité GTPase de la molécule induit un changement de conformation de ce domaine et ce changement est associé à une réduction du pas de l'oligomère. Enfin, ce domaine intermédiaire est essentiel pour la localisation au centrosome de la protéine (McNiven 2005) ainsi que pour la cohésion du centrosome (Thompson, Cao et al. 2004).
- Un domaine d'homologie à la pleckstrine (PH), qui permet la liaison à des phosphoinositides spécifiques tels que le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (Yarar, Surka et al. 2008). Ce domaine PH régule négativement l'oligomérisation de la protéine et donc indirectement l'activité GTPase de la dynamine (Muhlberg, Warnock et al. 1997).
- Un domaine GED (GTPase Effector Domain), qui pourrait être responsable de l'auto-activation de la protéine ainsi que de la constriction des tubes (Sever, Muhlberg et al. 1999; Chen, Zhang et al. 2004).
- Un domaine PRD (domaine riche en proline) situé en C-terminal, qui permet l'interaction avec de nombreuses autres protéines comme l'amphiphysine, l'endophiline, l'intersectine, Grb2 et la syndapine (McPherson, Takei et al. 1994; McNiven 2005). De plus, la liaison de la dynamine aux membranes lipidiques, *in vitro*, permet de rendre le domaine PRD accessible, ce qui



## Introduction

---

suggère que l'interaction avec d'autres protéines serait régulée par la fixation de la dynamine aux membranes (Sweitzer and Hinshaw 1998).

La dynamine 2 est donc une GTPase impliquée dans le trafic membranaire qui agit comme une mécanoenzyme pouvant hydrolyser le GTP afin de déformer les membranes. La principale fonction de la dynamine 2 est la scission de vésicules au cours de l'endocytose et plus spécifiquement des vésicules à clathrine, tout comme la dynamine 1 (Figure 13b.). Dans ce processus, la dynamine 2 est recrutée à la membrane plasmique via des protéines telles que l'amphiphysine 2/BIN1 et l'interaction avec les lipides, grâce à ses domaines PRD et PH respectivement. L'interaction de la dynamine 2 avec l'amphiphysine 2/BIN1 améliore la tubulation induite par la surexpression de l'amphiphysine 2/BIN1 seule, dans les cellules en culture. Une explication proposée est la capacité de la dynamine 2 à réguler le cytosquelette d'actine, celui-ci participant à la structure de la membrane plasmique (Itoh, Erdmann et al. 2005). La constriction de la membrane se fera alors grâce à la dynamine 2. Ainsi l'interaction du domaine SH3 de l'amphiphysine 2 avec le domaine PRD de la dynamine 2 pourrait être un des mécanismes permettant la scission des vésicules.

D'autre part, il existe d'autres protéines ressemblant à la dynamine appelées les « dynamine-like » protéines (Dlps), OPA1 (Optic Atrophy 1) et la mitofusine qui sont impliquées dans la division et la fusion d'organelles telles que les mitochondries. Les Dlps sont plus spécifiquement impliquées dans la fission tandis que les deux autres participent à la fusion d'organelles. Toutes ces protéines comportent un domaine GTPase, un domaine intermédiaire et un domaine GED, et plusieurs d'entre elles sont impliquées dans des maladies humaines.

Des études ont mis en évidence des mutations dans le domaine intermédiaire de la dynamine 2 qui sont liées à la forme dominante des CNM (Figure 6c et 14) (Bitoun, Maugendre et al. 2005) et des mutations dans le domaine d'homologie à la pleckstrine de la dynamine 2 qui ségrégent avec une forme dominante intermédiaire de Neuropathie Charcot-Marie-Tooth (DI-CMT) ainsi que dans deux familles avec une forme axonale de type 2 de neuropathie de Charcot-Marie-Tooth (CMT2B) (Zuchner, Noureddine et al. 2005; Fabrizi, Ferrarini et al. 2007). La mutation la plus commune, retrouvée chez les patients ADCNM, a été identifiée dans le domaine intermédiaire (p.R465W) et induit un faux sens. La plupart des mutations identifiées chez les patients ADCNM sont retrouvées dans ce domaine

## Introduction

---

intermédiaire et ces mutations semblent corrélées à un phénotype modéré, avec un début à l'adolescence et une progression lente (Bitoun, Maugenre et al. 2005; Schessl, Medne et al. 2007). Tandis que des mutations retrouvées dans le domaine PH de la dynamine 2 semblent liées à un phénotype plus sévère, qui ressemblerait à une forme légère d'XLCNM.

Contrairement aux ADCNM, la plupart des mutations identifiées chez les patients atteints de Neuropathie de Charcot-Marie-Tooth se retrouvent dans le domaine PH de la dynamine 2 et quelques mutations ont été identifiées dans le domaine intermédiaire.

### **i. La dynamine 2 et l'endocytose**

#### **1.L'endocytose dépendante de la clathrine**

La dynamine a été décrite pour la première fois lors de l'étude de mutants *shibire* de *Drosophiles* (Koenig and Ikeda 1989). La protéine *Shibire* est le seul homologue de la dynamine chez les *Drosophiles* et partage 70 % d'identité de séquence avec la dynamine humaine (Chen, Obar et al. 1991). Ces mutants se retrouvent paralysés à température non permissive en raison d'un blocage du recyclage des vésicules synaptiques par endocytose. Cette paralysie est rapide mais réversible. Cette étude a permis d'obtenir les premières images de puits recouverts de clathrine invaginés et accumulés à la membrane plasmique. Les pseudo-vésicules observées sont attachées à la membrane par un long cou, autour duquel du matériel enroulé en spirale a été identifié comme étant des polymères de dynamine (Figure 15a.).

Plus tard, l'étude de l'expression de mutants de la dynamine, incapables d'hydrolyser ou de se lier au GTP, a montré que ces mutations inhibaient la formation des vésicules recouvertes de clathrine (Schmid, McNiven et al. 1998). Ces études ont ainsi permis d'impliquer la dynamine dans les événements de fission membranaire aboutissant à la formation de vésicules. En effet, Sweitzer et Hinshaw ont montré que la dynamine est capable d'interagir avec des liposomes, de les déformer en tubes et de les morceler en vésicules en présence de GTP (Sweitzer and Hinshaw 1998).

## Introduction

---

La fermeture des vésicules à clathrine est donc dépendante de la dynamine 2 qui s'enroule en spirale autour du col de la vésicule naissante (Figure 15b.). Différentes molécules, telles que l'amphiphysine, sont tout d'abord recrutées au niveau du manteau et s'organisent pour sentir et courber les membranes et former ainsi un puits recouvert de clathrine. Le puits s'invagine alors et la dynamine est recrutée au niveau du col du puits où elle s'oligomérisse en hélice ce qui va alors stimuler son activité GTPase, permettant la constriction par torsion, du col grâce à l'énergie fournie par le GTP. Cette dernière étape permettra alors la libération d'une vésicule recouverte de clathrine. L'interaction entre l'amphiphysine et la dynamine semble essentielle pour la formation des vésicules puisque l'amphiphysine permet non seulement le recrutement de la dynamine au niveau des puits recouverts de clathrine, mais aussi la stimulation de l'activité GTPase (Takei, Slepnev et al. 1999; Yoshida, Kinuta et al. 2004). En effet, la surexpression du domaine SH3 dans des cellules de mammifères inhibe l'endocytose médiée par la clathrine, qui est rétablie lors de la surexpression de la dynamine, ce qui suggèrerait que le domaine SH3 est capable de déplacer la dynamine endogène (Wigge, Kohler et al. 1997). Enfin la liaison de l'amphiphysine 1 et de la dynamine 1, *in vitro*, permet la formation de tubules membranaires qui sont fragmentés par l'ajout de GTP (Takei, Slepnev et al. 1999). Cela permettrait donc d'expliquer la formation des tubules-T dans le muscle squelettique puisque la région importante de l'amphiphysine pour la tubulation des membranes est dans la région N-terminale de la protéine. Cette région étant conservée entre les différentes amphiphysines, BIN1 la possède aussi. BIN1 étant présente au niveau des tubules-T dans le muscle squelettique, elle permettrait donc l'élongation de ces tubules-T, tout en empêchant la fission par la dynamine 2, en recrutant cette dernière dans les cellules musculaires et en bloquant sa fonction de fission (Lee, Marcucci et al. 2002; Nicot, Toussaint et al. 2007).

### **2.L'endocytose indépendante de la clathrine**

La présence d'invaginations membranaires et de vésicules lisses dénuées de manteau de clathrine a été observée depuis longtemps sur des coupes tissulaires en microscopie électronique (Palade 1953; Huet, Ash et al. 1980). L'utilisation de mutants de la dynamine a permis de montrer que l'endocytose de phase fluide est stimulée en réponse à l'inhibition de la voie de la clathrine (Lamaze and Schmid 1995). De plus, la dynamine ainsi que des protéines de fusion SNARE ont été retrouvées au niveau des cavéoles, suggérant que ces

## Introduction

---

dernières possèdent l'équipement protéique nécessaire pour se détacher de la membrane et pour fusionner avec des compartiments intracellulaires.

Récemment, les microdomaines lipidiques ou raft ont été impliqués dans les phénomènes d'endocytose. En effet, le récepteur de l'interleukine-2 est un récepteur transmembranaire associé aux microdomaines et est présent dans les endosomes précoces alors qu'il n'est ni endocyté par les puits recouverts de clathrine ni par les cavéoles. Tout cela suggèrerait que ce récepteur reste associé aux microdomaines. Cette endocytose à partir des microdomaines est dépendante de la dynamine (Lamaze, Dujancourt et al. 2001).

Enfin, la dynamine est aussi associée à la phagocytose de bactéries (Gold, Underhill et al. 1999; Yu, Odera et al. 2006), aux trafics vers et à partir des endosomes tardifs (Nicoziani, Vilhardt et al. 2000; Lauvrak, Torgersen et al. 2004) et des membranes du trans-golgi (Cao, Yao et al. 2001).

### ii. La dynamine 2 et le cytosquelette d'actine

Il a été proposé que la dynamine puisse faire le lien entre les vésicules recouvertes de clathrine et le cytosquelette d'actine. La dynamine participant à l'endocytose dans son rôle de fission de vésicules, pourrait aussi participer à l'étape suivante de transport des vésicules. En effet, la dynamine 1 est capable d'interagir avec la profiline, qui facilite la polymérisation de l'actine (Witke, Podtelejnikov et al. 1998). De plus, le domaine PRD des dynamines est capable d'interagir avec le domaine SH3 d'autres protéines qui interagissent avec l'actine. Par exemple, l'intersectine comporte des domaines EH (Eps15 Homology) en N-terminal mais surtout cinq domaines SH3 en C-terminal. Ces domaines SH3 peuvent interagir avec le domaine PRD de la dynamine. Une forme longue de l'intersectine, obtenue par épissage alternatif, comporte en plus de ces domaines EH et SH3, un domaine DH (*DBL homology*), en C-terminal, capable d'activer la petite GTPase Cdc42, en jouant le rôle de GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) pour cette GTPase.

Cdc42 est une petite GTPase de la famille des GTPases Rho qui, en s'associant à N-WASP (Neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome Protein) joue un rôle dans la nucléation de l'actine. En effet, N-WASP est un régulateur majeur de la nucléation de l'actine. Cette forme longue pourrait ainsi faire le lien entre l'assemblage de l'actine et les vésicules d'endocytose, en se liant à la fois à la dynamine et à la protéine N-WASP (Hussain, Jenna et al. 2001).

## Introduction

---

Il en est de même pour la protéine Tuba qui est capable d'interagir avec la dynamine grâce à son domaine SH3 mais aussi avec Cdc42 et N-WASP, et ainsi participe à la régulation de la polymérisation de l'actine. D'autres protéines, qui possèdent un domaine SH3, sont capables d'interagir avec la dynamine et sont impliquées dans la régulation de l'actine telles que SNX9 (Lundmark and Carlsson 2003). SNX9 qui grâce à son domaine PX peut s'associer au PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> et stimuler ainsi la polymérisation de l'actine, mais aussi à Grb2, à la syndapine et à la cortactine (McNiven, Kim et al. 2000). Enfin, via la plupart de ces protéines, la dynamine est aussi capable de s'associer avec le complexe Arp2/3 qui est impliqué dans la polymérisation de l'actine (Schafer 2004).

De plus, des études ont montré que la dynamine 2 est localisée au niveau des podosomes, des macrophages et des ostéoclastes. Or ce sont des structures riches en actine (Ochoa, Slepnev et al. 2000). Elle est aussi retrouvée au niveau des queues de comètes d'actine (Lee and De Camilli 2002; Orth, Krueger et al. 2002) et des repliements de membranes corticaux appelés « ruffles » (McNiven, Kim et al. 2000; Krueger, Orth et al. 2003). Une autre étude a montré que la force exercée par l'hélice de dynamine au niveau du cou des vésicules n'est probablement pas suffisante pour pouvoir, à elle seule, provoquer la fission de la membrane. Une force supplémentaire pourrait donc être nécessaire et pourrait être fournie par les moteurs de myosines se liant à l'actine (Roux, Uyhazi et al. 2006).

Enfin, Gu et collègues viennent de montrer que la dynamine est capable d'interagir directement avec des filaments d'actine permettant alors l'alignement des ces filaments en faisceau (Gu, Yaddanapudi et al. 2010).

### iii. La dynamine 2 et les microtubules

La dynamine fut dénommée ainsi afin de refléter ses propriétés moléculaires motrices (Shpetner and Vallee 1989). En effet, elle fut isolée, pour la première fois, comme une protéine liant les microtubules, *in vitro*, qui est libérée en présence d'ATP et qui montre une activité ATPase dépendante des microtubules. Le clonage et le séquençage de la dynamine révéla par la suite qu'elle faisait partie de la famille des larges GTPase et qu'elle n'était pas une protéine motrice dépendante de l'ATP (Obar, Collins et al. 1990). Jusqu'à il y a peu, son interaction avec les microtubules était sujette à controverse puisqu'il existait peu de preuves de leur interaction *in vivo*. Pourtant, dans les hépatocytes de rats, la dynamine a été localisée le long du fuseau mitotique pendant la phase de métaphase (Thompson, Skop et al. 2002). De

## Introduction

---

plus, la dynamine 2 a été localisée au niveau des centrioles et du matériel péricentriolaire, et une réduction de la dynamine 2 par ARNi montre des défauts de division du centrosome suggérant un rôle de la dynamine 2 dans la cohésion du centrosome (Thompson, Cao et al. 2004). Ces études suggèrent que la dynamine pourrait être impliquée dans la dynamique des microtubules au cours de la division cellulaire.

Récemment, une étude a démontré que l'interaction de la dynamine avec les microtubules *in vitro* ne semble pas se reproduire *in vivo* (Mettlen, Pucadyil et al. 2009). En effet, l'analyse par microscopie électronique a révélé que la dynamine endogène est localisée au niveau de puits recouverts de clathrine à la surface cellulaire, mais aucun effet sur la structure des microtubules n'a pu être démontré ni aucune association avec les microtubules. Pourtant, même si la dynamine ne semble pas pouvoir se lier aux microtubules *in vivo*, elle semble être requise pour la propre instabilité dynamique des microtubules (Tanabe and Takei 2009). En effet, la baisse de la dynamine endogène par un ARNi résulte en une augmentation des microtubules acétylés, qui sont des marqueurs des microtubules stables. De plus, la formation du complexe golgien mature, qui dépend du transport membranaire dépendant des microtubules, est affectée par cette même baisse (Tanabe and Takei 2009), ce qui suggérerait l'implication de la dynamine 2 dans la régulation de l'instabilité dynamique des microtubules, essentielle pour la motilité des organelles.

#### **4. Myopathies centronucléaires canines : implication du gène PTPLA**

Chez les chiens de la race Labrador Retrievers, une myopathie centronucléaire autosomique récessive spontanée, ressemblant histologiquement aux ARCNM humaines, a été décrite en 2003, grâce à des analyses cliniques et histopathologiques (Tiret, Blot et al. 2003). Les labradors atteints semblent normaux à la naissance. Seule une diminution du poids et une absence du réflexe tendineux sont détectables. La faiblesse musculaire ainsi que l'atrophie musculaire ne se déclarent que vers l'âge de deux à cinq mois et conduisent à une posture et une démarche anormales ainsi qu'à une intolérance à l'exercice physique (Figure 16). L'analyse histopathologique permet de mettre en évidence une atteinte des muscles avec une variation du diamètre des fibres musculaires, une perte des fibres rapides à métabolisme glycolipidiques (type II) ainsi qu'une fibrose interstitielle. Jusqu'à l'âge d'un an, les noyaux

## Introduction

---

sont retrouvés à la périphérie des fibres, après cet âge les noyaux sont anormalement centraux (Figure 16).

L'analyse génétique a permis par la suite, la localisation d'une insertion dans l'exon 2 du gène PTPLA (Protein Tyrosine Phosphatase Like A). Cette mutation fut décrite comme responsable de la perte de la fonction de la protéine. La fonction de ce gène n'est pas encore bien connue. Pourtant PTPLA semble posséder un motif presque semblable à celui de la famille des PTPs (Protein Tyrosin Phosphatases) (Pele, Tired et al. 2005). En effet, les PTPs possèdent un site actif avec une séquence commune caractéristique : CX(5)R. Dans la protéine PTPLA, le résidu arginine est remplacé par une proline. Cette arginine est importante chez les PTPs car elle permet à la phosphatase de se lier à l'atome d'oxygène du phosphate présent au niveau du substrat. PTPLA est principalement exprimée dans le muscle cardiaque fœtal et adulte et légèrement dans le muscle squelettique et le muscle lisse. Cette phosphatase-like pourrait ainsi partager des fonctions communes avec la myotubularine et pourquoi pas être proche des phosphatases mortes.

### **C. Les Dystrophies Myotoniques**

C'est en 1886 que le Dr Steinert décrit pour la première fois cette maladie et la même année, Batten et Gibb mettent en évidence le caractère familial de la dystrophie myotonique de Steinert (Batten and Gibb 1909; Steinberg and Wagner 2008).

La Dystrophie Myotonique (DM) de Steinert, ou dystrophie myotonique de type 1, est une affection génétique et héréditaire, qui atteint principalement les muscles, entraînant une difficulté au relâchement après la contraction (myotonie), une faiblesse musculaire progressive avec une atrophie et une centralisation des noyaux (Steinberg and Wagner 2008). La maladie est une affection neuromusculaire, pouvant atteindre d'autres organes que le muscle tels que le cœur, mais aussi les yeux ou le système endocrinien (Miller, Tunnecliffe et al. 1985). La prévalence de cette maladie est de 1 sur 20 000 dans la plupart des pays mais la fréquence de la maladie de Steinert est très variable puisqu'on la retrouve peu dans les pays africains tandis que la prévalence est de 1 sur 600 au Nord du Québec, dans la région de Charlevoix et du lac Saint-Jean. L'étude généalogique de cette population a permis d'établir



## Introduction

---

que tous les patients descendaient en fait d'un couple ancestral commun unique, immigré dans cette région en 1657 (Mathieu, De Braekeleer et al. 1990; De Braekeleer 1991).

La DM de Steinert fait partie de la famille des dystrophies myotoniques parmi laquelle on retrouve la dystrophie myotonique de type 2 (DM de type 2). Cette dernière se caractérise par un myotonie et une dystrophie musculaire avec une faiblesse prédominante dans les muscles proximaux, les cuisses et les épaules alors que la DM de Steinert montre une atteinte des muscles distaux, des mains et des pieds (Tableau 2) (Ricker, Koch et al. 1994). L'atteinte cardiaque est moins fréquente dans les DM de type 2 que dans les DM de type 1. De plus, l'anomalie génétique est différente de celle responsable de la DM de Steinert puisqu'elle se trouve sur le chromosome 3 et code pour une protéine appelée ZNF9 (Liquori, Ricker et al. 2001).

Il faut aussi différencier la DM de Steinert de la DM de type 3, individualisée récemment et très rare (Le Ber, Martinez et al. 2004). Elle a été identifiée chez une famille française chez laquelle une forme particulière de dystrophie myotonique de type 2 avait été mise en évidence mais qui n'était pas liée à une mutation responsable de la DM de type 2. Une liaison génétique a été trouvée avec le chromosome 15. Cette DM de type 3 comporte en plus de la myotonie, de la faiblesse musculaire et de la cataracte, une démence à début précoce (Le Ber, Martinez et al. 2004).

### **1. La dystrophie myotonique de Steinert (de type 1)**

Il existe plusieurs formes de DM de Steinert et toutes ces formes sont de transmission autosomique dominante. La gravité de la maladie dépend aussi bien de l'âge d'apparition, des signes cliniques et de l'évolution (Buxton, Shelbourne et al. 1992). Ainsi une caractéristique de la DM de type 1 est sa très grande hétérogénéité phénotypique, aussi bien entre des familles différentes qu'à l'intérieur d'une même famille (Tsilfidis, MacKenzie et al. 1992). Pourtant plus la maladie débute tôt, plus les risques de développer une forme grave sont élevés. Les principaux signes observés dans cette maladie sont (Harper 1989) :

- Une faiblesse musculaire, touchant tout d'abord la tête et le cou puis l'extrémité des membres (Bosma and Brodie 1969). La faiblesse des muscles de la face est associée à une chute des paupières supérieures. L'atteinte du



## Introduction

---

palais, des muscles de la langue et parfois des cordes vocales peut modifier la voix tandis que l'atteinte du pharynx peut provoquer une dysphagie (difficulté à avaler). Au niveau des membres supérieurs, la faiblesse prédomine sur les muscles de l'avant bras, des mains et en particulier sur les fléchisseurs des doigts et du poignet.

- Une myotonie (défaut de relâchement musculaire suite à une contraction), qui est indolore et augmentée par le froid et la fatigue et diminuée par la chaleur et la répétition de mouvements (Bosma and Brodie 1969). La myotonie est mise en évidence en demandant au patient de serrer la main et de la relâcher brutalement. Les patients soumis à ce test sont incapables, voir ont du mal à ouvrir la main.
- Des manifestations oculaires, comme une cataracte (présente chez près la quasi totalité des patients), pouvant apparaître dès l'âge de 10 ans mais aussi parfois une diplopie, une hypotension intraoculaire et des kératites.
- Des manifestations cardiaques, avec des troubles du rythme et de la conduction cardiaque. Ces troubles peuvent être responsables d'essoufflements, de malaises, de palpitations, de syncopes et dans les cas plus graves de mort-subite par arrêt du cœur (dans environ 16 % des cas) (Groh, Groh et al. 2008).
- Des manifestations respiratoires, plus ou moins graves et pouvant entraîner une détresse respiratoire nécessitant une aide ventilatoire, pouvant être responsable de mort subite.
- D'autres manifestations, comme une grande fatigabilité générale souvent associée à une hyper-somnolence diurne (Ciafaloni, Mignot et al. 2008), des troubles digestifs (occlusions, calculs biliaires) (Schwindt, Bernhardt et al. 1969), une calvitie chez les hommes principalement, une atrophie testiculaire, une hypersensibilité à l'insuline (Barbosa, Nuttall et al. 1974), une atteinte auditive, une déficience intellectuelle, des troubles de l'humeur, des problèmes hormonaux et une élévation du risque de fausse couche chez la femme peuvent aussi être retrouvées.

## Introduction

---

Chez un même malade, il est fréquent que seul quelques uns de ces symptômes apparaissent et leur évolution est généralement lente, la gravité augmentant progressivement avec l'âge. Ainsi, seul l'un ou l'autre de ces symptômes apparaît chez la plupart des malades, sauf dans les cas d'atteintes très graves.

Bien que l'origine génétique soit la même, la DM de Steinert se manifeste d'une façon très variable d'une personne à l'autre et on peut différencier plusieurs formes, en fonction notamment de l'âge de début de la maladie, allant des formes du nouveau-né très graves à certaines formes tardives de l'adulte pouvant passer inaperçues (Miller, Tunnecliffe et al. 1985).

La forme congénitale (cDM), très grave, présente dès la naissance et même souvent dans la période intra-utérine, a été décrite pour la première fois en 1960 par Vanier (Vanier 1960). Dans cette forme, on constate un excès de liquide amniotique (hydramnios) et une diminution des mouvements fœtaux. A la naissance l'enfant est très hypotonique, il a des difficultés à téter et à avaler. Cette forme néonatale est cliniquement très semblable à la myopathie centronucléaire liée au chromosome X. Elle entraîne une mortalité néonatale élevée et les troubles les plus importants cités plus haut, notamment un retard intellectuel plus ou moins important sont observés par la suite. Les caractéristiques histopathologiques des dystrophies myotoniques congénitales sont très proches de celles des myopathies myotubulaires. Les patients atteints de dystrophie myotonique congénitale développent également une faiblesse musculaire et une hypotonie sévère à la naissance. Les myofibres ont le même aspect que celles des XLCNM et le seul moyen d'établir un diagnostic différentiel entre ces deux pathologies est de rechercher la présence du marqueur MBNL (muscleblind-like) par immunohistochimie ou immunocytochimie. En effet, dans le cas de la dystrophie myotonique congénitale, l'ARN de ce marqueur est agrégé dans le noyau des cellules. En l'absence de marquage MBNL, le diagnostic est donc orienté vers l'XLCNM, alors qu'il sera orienté vers la dystrophie myotonique dans le cas contraire.

La forme infantile quant à elle, débute précocement avant l'âge de dix ans. Les enfants sont « mous et lents ». La myotonie est souvent absente. En revanche, il existe presque constamment une faiblesse musculaire et un déficit intellectuel modéré, amenant à un retard scolaire, des difficultés d'apprentissage (notamment dans la lecture) et de raisonnement et des difficultés d'insertion professionnelle (Harper 1989).

## Introduction

---

La forme habituelle ou forme juvénile est celle de l'adulte jeune. Elle débute habituellement vers 30 ans, mais peut survenir plus tôt dans l'adolescence. Le diagnostic est généralement posé vers 40 ans quand les symptômes s'aggravent. Cette forme associe de façon variable une atteinte musculaire avec une faiblesse musculaire et une diminution du volume du muscle, ainsi que d'autres atteintes cardiaques, oculaires, respiratoires, ... (Harper 1989).

La forme tardive bénigne est la moins sévère. Elle est aussi appelée forme asymptomatique car les personnes ne s'aperçoivent pas des symptômes qui sont extrêmement légers et tardifs. Elle se traduit par une cataracte, une calvitie et parfois des troubles cardiaques. Cette forme n'est donc généralement découverte que lors de la recherche des origines génétiques d'un descendant plus gravement atteint (Harper 1989).

### **2. La dystrophie myotonique de type 2**

C'est en 1994, que la dystrophie myotonique de type 2 fut décrite pour la première fois chez trois familles avec une maladie héréditaire dominante (Ricker, Koch et al. 1994). C'est une forme particulière de la dystrophie myotonique, dont l'anomalie génétique est différente de celle responsable de la forme classique de dystrophie myotonique de Steinert. En raison de l'atteinte musculaire prédominante sur les racines des membres, cette forme fut tout d'abord appelée myopathie proximale avec myotonie (« PROMM », en anglais) puis, dystrophie myotonique de type 2 en raison des similitudes des manifestations avec la DM de Steinert.

Les principaux signes observés dans cette maladie sont :

- Une faiblesse et une atrophie musculaire : la faiblesse musculaire touche les muscles de la face et les fléchisseurs du cou mais elle est nettement moins sévère que dans la DM de Steinert (Ricker, Koch et al. 1994). Elle peut aussi touchée précocement les abdominaux. Au niveau des membres, la faiblesse musculaire prédomine sur les muscles des hanches et des épaules. Une faiblesse musculaire modérée dans les mains et les pieds peut survenir lors de l'évolution de la maladie, mais est rarement une manifestation précoce. Un ptosis et une dysarthrie sont parfois retrouvés mais sont minimes dans ce cas. L'atrophie musculaire est modérée dans cette forme de dystrophie myotonique.

## Introduction

---

En fait, il existe parfois une hypertrophie musculaire touchant les mollets et une amyotrophie dans moins de 10% des cas.

- Une myotonie, qui est souvent décrite par les personnes atteintes de la maladie comme des barrures dans les mains. Elle reste modérée et est généralement peu handicapante. Elle est beaucoup plus variable dans le temps que celle associée à la forme DM de Steinert. En effet elle est très inconstante avec une atteinte dans moins de 50 à 75% des cas. Elle est souvent asymétrique et focale et est surtout exacerbée pendant la grossesse (Rudnik-Schoneborn, Schneider-Gold et al. 2006).
- Des douleurs, qui semblent être fréquentes (dans environ 50% des cas et 63% après 50 ans) et ne semblent pas être en rapport avec la sévérité de la myotonie ni avec l'exercice. Elles sont épisodiques, fluctuantes, et semblent prédominantes au repos. Elles siègent préférentiellement au niveau des membres inférieurs où elles sont diffuses ou pseudo-radiculaires. Elles ressemblent surtout à des brûlures ou des tiraillements d'après les personnes atteintes.
- Des manifestations oculaires, comme les cataractes, qui se développent avant l'âge de 50 ans et ont les mêmes caractéristiques que celles associées à la DM de Steinert. Elles sont présentes dans environ 50% des cas avant 60 ans et dans 20% des cas sont précoces avec une apparition avant l'âge de 20 ans. Elles sont sous-capsulaires postérieures avec des opacités multicolores irisées (Bonsch, Neumann et al. 2003).
- Des manifestations cardiaques, telles que les problèmes cardiaques qui sont beaucoup moins fréquents et moins sévères que dans la DM de Steinert. Ils se limitent à des troubles de conduction (BAVI, BB) sur les ECG (20% des patients) (Meola, Sansone et al. 1998). Les complications cardiaques sont en général moins sévères bien qu'il ait été reporté des cas de mort subite du nourrisson, d'implantation de pacemakers et des arythmies sévères. De rares cas de décès ont ainsi été reportés et sont dus à des troubles du rythme ou à une

## Introduction

---

cardiomyopathie dans 7% des cas. Contrairement à la forme DM de Steinert, il n'existe pas d'insuffisance respiratoire.

- Des manifestations endocriniennes, puisqu'il existe parfois un hypogonadisme hypergonadotrope chez 2/3 des hommes explorés, ainsi que des troubles du métabolisme des glucides avec hyperinsulinisme (menant à un diabète dans 20% des cas et à un HGPO anormale dans 75% des cas) mais ces manifestations sont moins sévères que dans la forme DM de Steinert. Il n'y a pas de données disponibles concernant l'association de maladies thyroïdiennes avec ce type de dystrophie. La grossesse est un facteur aggravant des douleurs, de la myotonie et des crampes musculaires. Ainsi, chez 9 femmes enceintes sur 47 (21%), les premiers symptômes de DM de type 2 se sont déclarés pendant la grossesse et la maladie s'est aggravée après l'accouchement. Sur les 47 grossesses, 17% ont conduit à des fausses couches. Un travail avant terme a eu lieu dans 50% des cas entraînant 27% de naissances prématurées. Enfin, les personnes malades se plaignent fréquemment de sueurs dans les mains (Rudnik-Schoneborn, Schneider-Gold et al. 2006).
- D'autres manifestations cliniques peuvent être retrouvées comme une calvitie (présente chez 1/3 des hommes entre 21 et 34 ans), une hyperhydrose (20 à 30% des patients) (Day, Ricker et al. 2003), une atteinte du système nerveux central sans retard mental mais avec une atrophie cérébrale (Kassubek, Juengling et al. 2003). Le profil cognitif et comportemental est particulier avec la présence d'une altération des fonctions exécutives et de traits de personnalités évitants (Meola, Sansone et al. 2003).

Tous ces symptômes peuvent être aggravés par une hypothyroïdie (Sansone, Griggs et al. 2000). La prévalence minimale de cette maladie est estimée à 1/100 000. L'âge d'apparition des symptômes se situe entre 30 et 60 ans et il n'existe pas de forme congénitale, ni infantile contrairement à la forme DM de Steinert. En 2003, une étude a montré un haplotype commun dans 17 familles DM de type 2 européennes d'origine géographique distincte (Bachinski, Udd et al. 2003). Cela semble donc indiquer que cette mutation proviendrait d'un ancêtre commun. Il existe quelques familles hors d'Europe qui présentent

## Introduction

---

cette maladie mais la plupart des familles DM de type 2 semblent venir du nord de l'Europe comme l'Allemagne et la Pologne (Day, Ricker et al. 2003).

### 3. Les gènes impliqués dans les dystrophies myotoniques

#### a. Le gène DMPK impliqué dans la dystrophie myotonique de Steinert

De génération en génération, le début de la DM de Steinert est de plus en plus précoce et la maladie de plus en plus grave. Ce phénomène d'anticipation peut être expliqué au niveau moléculaire. En effet, la maladie est due à l'augmentation d'une répétition CTG localisée en 3' non traduit du gène de la myotonine (DMPK) situé en 19q13.3 (Figure 17a.) (Brook, McCurrach et al. 1992; Buxton, Shelbourne et al. 1992). C'est ainsi que le triplet CTG est répété de 50 à plus de 3 000 fois chez les sujets atteints, alors qu'il n'est que de 5 à 37 fois chez le sujet sain (Monckton, Wong et al. 1995; Harper, van Engelen et al. 2002). D'une façon générale, plus le nombre de répétitions est élevé plus la maladie est sévère, sans qu'il existe toutefois un parallélisme parfait entre ce nombre de répétitions et la sévérité de la maladie. Ce nombre de répétitions a tendance à augmenter au fil des générations (phénomène d'anticipation) expliquant l'aggravation de la maladie au fil des générations au sein d'une même famille. Cette amplification varie selon le sexe du parent transmetteur et le nombre de répétitions dont il est porteur. Lorsque le nombre de triplets est inférieur à 100 chez le parent transmetteur, l'amplification à la génération suivante est plus importante si la transmission est paternelle. En revanche, au-delà de 500 CTG, on observe une inversion de l'influence du sexe tendant vers une diminution du nombre de répétitions lors des transmissions paternelles et une augmentation lors des transmissions maternelles. De plus, chez un même patient, le nombre de répétitions varie non seulement d'un tissu à l'autre, mais aussi au sein d'un même tissu. Les expansions ont généralement une taille plus importante dans les fibres musculaires et les lymphocytes.

Le gène DMPK code pour une protéine kinase : la Myotonine. Le rôle exacte de cette protéine n'est pas encore très bien connu, mais plusieurs études récentes ont pu démontrer que l'ARN mutant transcrit à partir du gène DMPK anormal s'accumule dans le noyau de la cellule et séquestre des facteurs de transcription endogènes tel que MBNL, menant ainsi à des

## Introduction

---

anomalies d'épissages de certains ARNs (Figure 17b.) (Timchenko, Timchenko et al. 1996; Philips, Timchenko et al. 1998).

Cette protéine DMPK est localisée par immunohistochimie au niveau du muscle cardiaque, des triades et du réticulum sarcoplasmique des cellules musculaires squelettiques et du réticulum endoplasmique des cellules épithéliales du cristallin. Dans le muscle des patients adultes, l'expression du gène DMPK est diminuée (Harris, Moncrieff et al. 1996).

### **b. Le gène ZNF9 impliqué dans la dystrophie myotonique de type 2**

La dystrophie myotonique de type 2 est due à une anomalie génétique située sur le chromosome 3q13.3-q24 (Ranum, Rasmussen et al. 1998). Cette découverte a amené à rebaptiser le locus de la maladie de Steinert en locus DM de type 1.

Il s'agit d'un quadruplet de nucléotides (CCTG), répété de 75 à plus de 11 000 fois chez la personne malade, dans l'intron 1 du gène ZNF9 et fut la première maladie à expansion de tétranucléotide reportée (Figure 18a.) (Liquori, Ricker et al. 2001). L'allèle sain comporte une suite de TG répétés entre 14 et 25 fois suivi de TCTG répété 4 à 10 fois et enfin de CCTG répété 11 à 26 fois. Ces 4 derniers nucléotides sont répétés environ 5000 fois chez les patients atteints. Il existe une instabilité somatique de l'expansion et une variation intergénérationnelle mais pas de phénomène d'anticipation comme dans la forme DM de Steinert. Le nombre de répétitions de CCTG chez l'enfant est souvent inférieur à celui des parents (père ou mère). En février 2003, l'analyse génétique de 379 personnes atteintes de DM2/PROMM, issues de 133 familles différentes a montré que la très grande instabilité des répétitions rend aléatoire la prévision de la gravité clinique ou de l'âge d'apparition de la maladie d'après la longueur des répétitions CCTG (Liquori, Ricker et al. 2001).

Le gène ZNF9 code pour une protéine en doigt de zinc supposée se lier à l'ADN. Elle est particulièrement exprimée dans le cœur et dans le muscle squelettique, les deux tissus les plus touchés dans la DM de type 2. En 2002, une étude a montré que le gène responsable de la dystrophie myotonique de type 2 est bien traduit en ARN précurseur et en ARN messager, cependant l'intron 1, porteur du quadruplet anormalement répété CCUG, s'accumule dans le noyau sous forme d'inclusions ribonucléoprotéiques ou foci qui sont toxiques, alors que dans la forme DM de Steinert, c'est la totalité de l'ARN anormal (l'ARN du gène DMPK et les

## Introduction

---

répétitions CUG) qui s'accumule dans les noyaux. Ces inclusions ribonucléiques vont alors lier la protéine muscleblind (MBNL) et interférer ainsi avec d'autres ARN spécifiques du muscle (gène p21, responsable de la différenciation musculaire; gène des récepteurs à l'insuline) (Figure 18b.). Une autre caractéristique de la forme DM de type 2 est la dégénérescence neurofibrillaire qui semble être due à une accumulation de la protéine Tau anormale dans les neurones du cerveau des personnes atteintes (Maurage, Udd et al. 2005). En effet, la protéine Tau appartient à la famille des protéines associées aux microtubules du neurone et est impliquée dans plusieurs maladies du cerveau telles que la maladie d'Alzheimer.

Le diagnostic moléculaire de la DM de type 2 est très difficile. En effet, dans 20% des cas avérés de DM de type 2, la technique de southern blot conventionnel ne détecte pas l'expansion CCUG. La technique de PCR classique permet d'exclure les individus ayant 2 allèles normaux amplifiables mais elle ne permet pas de différencier les individus sains avec 2 allèles de même taille (5 à 15% de la population générale), des individus atteints (Day, Ricker et al. 2003).

La séquestration de MBNL, l'augmentation de CUG-PB et l'interférence avec des ARNs messagers de protéines semblent être la cause de l'effet toxique des expansions d'ARN aussi bien dans les DM de Steinert que dans les DM de type 2 (Day and Ranum 2005).

Il n'existe encore aucun traitement pour les dystrophies myotoniques, mais une kinésithérapie régulière et soutenue est appréciée par les patients. De plus, la myotonie, les douleurs et les troubles de l'humeur bénéficient de traitements médicamenteux efficaces. Enfin, la pose d'un pacemaker est parfois recommandée pour prévenir les complications cardiaques.



## II. Les phosphoinositides, un lien potentiel entre plusieurs protéines impliquées dans les myopathies centronucléaires

### A. Les phosphoinositides présents dans les CNM

Les phosphatidylinositol (PtdIns) font partie de la famille des phospholipides membranaires, et sont des dérivés phosphorylés des phosphoinositides (PI) (Figure 19a.). La localisation et le métabolisme des PIs, très finement contrôlés, en font des seconds messagers lipidiques essentiels dans le contrôle de nombreuses fonctions cellulaires telles que la régulation du cytosquelette d'actine (Figure 19b. et c.) (Takenawa and Itoh 2001; Kanzaki, Furukawa et al. 2004), le trafic vésiculaire (Di Paolo, Moskowitz et al. 2004; Huang, Lifshitz et al. 2004), le transport du glucose (Lin, Yan et al. 2005; Sbrissa and Shisheva 2005), la régulation de l'apoptose (Mejillano, Yamamoto et al. 2001; Albi and Viola Magni 2004) et de la prolifération ou de la migration cellulaire (Zini, Lisignoli et al. 2005). Cette souplesse au niveau fonctionnel est due à la multitude d'espèces chimiques qui peut être générée par le réarrangement des dites phosphorylés du groupe inositol.

Un PI est un glycérophospholipide anionique membranaire qui représente environ 10 à 15% de l'ensemble des lipides membranaires (Rameh and Cantley 1999). Il est constitué d'un cycle *myo*-inositol (en C<sub>6</sub>) branché en position 1 à un sn-1,2-diacylglycérol (DAG) par une liaison phosphodiester impliquant le 3<sup>ième</sup> groupement hydroxyle de celui-ci (Figure 19a.). Le DAG contient généralement un acide stéarique (C<sub>18</sub> saturé : C18 : 0) sur le premier groupement hydroxyle et un acide arachidonique (C<sub>20</sub> polyinsaturé : C20 : 4) sur le deuxième (Mauco, Dangelmaier et al. 1984). Il constitue la région membranaire des PIs. Le noyau inositol est, quant à lui orienté vers le cytosol, et possède cinq groupements OH libres dont trois peuvent être phosphorylés (positions 3, 4 et 5) donnant naissance à sept formes différentes phosphorylées de PIs : trois monophosphorylés (PtdIns(3)P, PtdIns(4)P, PtdIns(5)P), trois bisphosphorylés (PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>, PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>) et un trisphosphorylé (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>) et à une forme non phosphorylée le PtdIns (Figure 19c.). Les formes les plus abondantes des PIs sont le PtdIns qui représente environ 8% des phospholipides totaux de la cellule et le PtdIns(4)P et le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> qui ne représentent qu'au maximum 3% de l'ensemble des lipides membranaires. Les formes les moins

## Introduction

---

abondantes sont le PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> ainsi que le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, qui ne représentent que 1,5% des lipides totaux (Rameh and Cantley 1999). Malgré cette faible abondance, les PtdIns jouent des rôles essentiels.

Le métabolisme des PIs est complexe et la formation, le recyclage et la répartition cellulaire des ces PIs sont hautement régulés par un ensemble de kinases, de phosphatases et de phospholipases (Martin 1998; Vanhaesebroeck, Leever et al. 2001; Varnai and Balla 2006).

La régulation très fine des PIs, induit une répartition très contrôlée de ceux-ci dans les membranes intracellulaires (Figure 19b.). Cette répartition permet aux PIs d'intervenir dans de nombreux processus. En effet, chaque phosphoinositide peut interagir individuellement avec un groupe unique de protéines cellulaires, en transmettant ainsi une information structurale et/ou fonctionnelle. Ces interactions sont médiées par des domaines ou des motifs protéiques bien définis, qui s'associent avec le groupe inositol de leur phosphoinositide cible, avec une spécificité et une affinité variables (Tableau 3). C'est la spécificité de ces domaines qui rend compte des rôles des PIs dans la cellule. On peut classer ces domaines en deux grandes familles : les domaines spécifiques des PIs et les domaines à spectre plus large (Santagata, Boggon et al. 2001; Balla, Tuymetova et al. 2005). Parmi ces domaines spécifiques, on retrouve les domaines PH, PX (Phox Domain), FYVE (Fab-1, YGL023, Vps27 and EEA1), ENTH (Epsin N-Terminal Homology), tubby et C2. Il existe aussi un certain nombre de motifs polybasiques hétérogènes qui s'associent électrostatiquement avec les phosphoinositides (Laux, Fukami et al. 2000; McLaughlin, Wang et al. 2002). Plusieurs domaines sont capables de lier des phosphoinositides bien définis, avec une affinité et une spécificité très forte, même si ces domaines sont excisés de leur protéine d'origine. En effet, l'affinité et la sélectivité de l'interaction sont suffisantes pour garantir leur utilisation comme sonde, afin de détecter la présence et la distribution de leurs phosphoinositides cibles. Ainsi des constructions chimères codant pour la GFP et le domaine FYVE de EEA1, ou le domaine PH de PLC $\delta$ , ont largement été utilisées pour détecter respectivement le PtdIns(3)P ainsi que le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (Klarlund, Guilherme et al. 1997; Stauffer, Ahn et al. 1998; Kutateladze, Ogburn et al. 1999).

Enfin, ces lipides peuvent servir de substrats pour la famille des PI3 kinases. Ces PI3 kinases utilisent le  $\gamma$ -phosphate de l'ATP pour phosphoryler en position 3' et ainsi, générer des phosphoinositides phosphorylés en position 3.

## 1. Le phosphatidylinositol (PtdIns)

Le phosphatidylinositol est un phospholipide acide (anionique), chargé négativement, et un constituant mineur sur le côté cytosolique des membranes cellulaires eucaryotes. Cette molécule est composée d'un groupement phosphatidyl (deux acides gras estérifiés sur une molécule de glycérol, elle-même liée de façon covalente à un acide phosphorique) dont le groupement phosphate est associé à une molécule d'inositol, un polyol cyclique (hexahydroxycyclohexane). Le phosphatidylinositol est plus spécialement abondant dans les tissus du cerveau, où il peut constituer environ 8% des phospholipides, mais il est présent dans tous les tissus et les types cellulaires. En général, le PtdIns est présent en grande quantité dans les cellules par rapport aux autres phosphoinositides et semble plus être une molécule de base servant à la formation des différents phosphoinositides.

Le phosphatidylinositol est synthétisé via le précurseur : cytidine diphosphate diacylglycérol (CDP-diacylglycérol) par une réaction avec un L-*myo*-inositol. Cette réaction est catalysée par une enzyme : la CDP-diacylglycérol inositol phosphatidyltransférase (également appelée phosphatidylinositol synthase) (Mathews, Christophe K.; van Holde, K.E.; Ahern, Kevin G., (2005). Biochemistry Third Edition.). Le deuxième produit de cette réaction est le CMP : cytidine monophosphate. La phosphatidylinositol synthase est localisée principalement au niveau du réticulum endoplasmique, bien qu'elle apparaisse aussi au niveau de la membrane plasmique chez la levure.

Le phosphatidylinositol a une région polaire et une région non polaire, qui le rendent amphiphile et lui permettent ainsi de s'insérer dans les membranes cellulaires.

L'inositol peut alors être phosphorylé pour former les phosphatidylinositol phosphates (PtdInsP), les phosphatidylinositol bisphosphates (PtdInsP<sub>2</sub>) et les phosphatidylinositol trisphosphates (PtdInsP<sub>3</sub>) et ainsi à partir de ce PtdIns les sept espèces de phosphoinositides peuvent être formées par l'action de kinases et de phosphatases.

### 2. Le phosphatidylinositol-3-phosphate (PtdIns(3)P)

Dans les cellules de mammifères, le PtdIns(3)P est le plus abondant PtdIns au niveau des endosomes (Gillooly, Morrow et al. 2000). Ce PtdIns(3)P endosomal est généré par la kinase à PtdIns-3 de class III, hVPS34, qui phosphoryle préférentiellement la position 3' du phosphatidylinositol (Volinia, Dhand et al. 1995). Comme les kinases de classe I, hVPS34 est sensible à de faibles concentrations de wortmannin et l'exposition à ce métabolite fongique ou la micro injection d'anticorps inhibiteurs anti-hVPS34 induit une rapide diminution du PtdIns(3)P endosomal (Stephens, Cooke et al. 1994). Le recrutement de hVPS34 aux endosomes est médié par une protéine adaptatrice p150, une serine/thréonine kinase. L'association avec p150, connue comme étant une protéine effectrice de Rab5 (Murray, Panaretou et al. 2002), est requise pour l'activation catalytique de hVPS34. Cette activation catalytique permet alors la production de PtdIns(3)P et le lien avec Rab5.

Peu de choses sont connues sur le catabolisme du PtdIns(3)P. Théoriquement, la perte de PtdIns(3)P peut survenir suite à au moins trois mécanismes différents :

- 1) la déphosphorylation du phosphate en 3', menant au PtdIns,
- 2) la conversion du PtdIns(3)P en une espèce bisphosphate via l'action de kinases à phosphoinositides,
- 3) la dégradation de ce phosphoinositide par une activité phospholipase.

Récemment, des molécules candidates pour chaque fonction ont été décrites, cependant leur relative contribution dans la perte de PtdIns(3)P *in vivo* n'est pas très claire. Deux protéines qui affichent une activité phosphatase spécifique du PtdIns(3)P, FYVE-DSP1 et FYVE-DSP2, ont récemment été caractérisées (Zhao, Qi et al. 2001). Des membres de la famille des myotubularines sont également capables de déphosphoryler ce substrat (Laporte, Blondeau et al. 1998). PIKfyve, l'homologue chez les mammifères de la protéine de levure Fab1, est une kinase à phosphoinositides en 5' qui peut convertir le PtdIns(3)P en PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> (Shisheva 2001). Enfin, plusieurs phospholipases ont été montrées comme hydrolysant le PtdIns(3)P, telles certaines PtdIns-PLD dont l'action préférentielle avec le PtdIns(3)P comme substrat *in vitro* a été décrite (Ching, Wang et al. 1999).

Notre compréhension du rôle fonctionnel du PtdIns(3)P a été grandement aidé par l'identification de deux domaines protéiques distincts qui interagissent sélectivement avec le

## Introduction

---

PtdIns(3)P : le domaine FYVE (Burd and Emr 1998) et le domaine Phox ou PX (Cheever, Sato et al. 2001; Ellson, Gobert-Gosse et al. 2001; Song, Xu et al. 2001; Xu, Seet et al. 2001). L'expression de protéines de fusion fluorescentes incorporant ces modules de liaison du PtdIns(3)P a permis la visualisation de la distribution de ce phosphoinositide dans les cellules vivantes. Comme mentionné auparavant, le PtdIns(3)P est localisé principalement au niveau des endosomes de sortie et au niveau des corps multivésiculaires mais est aussi détecté dans le nucléole (Gillooly, Morrow et al. 2000). Un autre pool de PtdIns(3)P a été identifié au niveau de la membrane plasmique de cellules en culture sous stimulation d'insuline, via l'activation d'une petite GTPase, TC10, et semble impliqué dans la translocation de la protéine transporteur de glucose, GLUT4, à la membrane plasmique (Maffucci, Brancaccio et al. 2003).

Le PtdIns(3)P est connu pour être un participant des fonctions cellulaires plutôt qu'une molécule du signal. En effet, le PtdIns(3)P et les protéines interagissant avec lui jouent un rôle régulateur essentiel dans le contrôle du trafic membranaire dans divers processus cellulaires comme la fusion des endosomes (Simonsen, Lippe et al. 1998), la dynamique des membranes nucléaires (Roggo, Bernard et al. 2002) et l'autophagie (Petiot, Ogier-Denis et al. 2000; Wurmser and Emr 2002). En effet, l'ajout d'inhibiteur de kinases à PI3 augmente l'autophagie dans les cellules, et l'ajout de PtdIns(3)P exogène permet de réduire ce défaut très significativement (Petiot, Ogier-Denis et al. 2000).

Cette capacité du PtdIns(3)P à participer dans un tel nombre de fonctions importantes peut être attribuée au grand nombre de protéines qui expriment soit un domaine FYVE soit un domaine PX.

### **3. Le phosphatidylinositol-5-phosphate (PtdIns(5)P)**

Le phosphatidylinositol-5-phosphate est le dernier membre de cette famille de phosphatidylinositol à avoir été caractérisé comme étant naturellement synthétisé. En effet, il a été mis en évidence à la fin des années 1990 dans les cellules. C'est en 1997, que Lucia Rameh observa que les enzymes appelées PtdInsP kinases de type 2 n'utilisaient pas le PtdIns(4)P comme substrat, comme cela avait été auparavant proposé, mais qu'elles utilisaient préférentiellement le PtdIns(5)P afin de produire du PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. Cette observation semblait

## Introduction

---

donc indiquer que les cellules devaient contenir un pool naturel de PtdIns(5)P, ce qui fut vérifié peu de temps après (Rameh, Toliás et al. 1997). Le PtdIns(5)P peut être généré de trois façons différentes :

- 1) à partir du PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> par l'action des myotubularines,
- 2) à partir du PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> par des 4-phosphatases telles que IpgD chez la bactérie ou les PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> 4-phosphatases de type 1 et 2 de mammifères comme décrits précédemment,
- 3) par l'action de la PtdIns 5-kinase, PIKfyve à partir du PtdIns.

La fonction du PtdIns(5)P reste pour le moment incertaine et aucune protéine liant ce phosphatidylinositol n'a pour le moment été identifiée. Une de ces fonctions pourrait être au niveau du trafic membranaire des endosomes tardifs vers la membrane plasmique (Lecompte, Poch et al. 2008).

Récemment, ce PtdIns(5)P a été démontré comme impliqué dans le modèle d'infection par la bactérie pathogène *Shigella flexneri* (Ramel D, Thèse, Université Paul Sabatier, 2010, <http://thesesups.ups-tlse.fr/655/>). Il a ainsi été montré que le taux de PtdIns(5)P était localement augmenté lors de l'infection par cette bactérie. Cette augmentation résulte alors en l'activation de la voie PI3-kinase/Akt. Le récepteur à l'EGF (EGFR) semble être un intermédiaire clé entre le PtdIns(5)P et Akt puisque l'augmentation du taux de PtdIns(5)P engendre des perturbations du trafic vésiculaire qui seraient responsables du blocage de la dégradation de l'EGFR, qui va à son tour inhiber la phosphatase PP2 responsable de l'inactivation de Akt.

Enfin, le PtdIns(5)P semble aussi réguler la dynamique de l'actine par l'intermédiaire de la GTPase Rac1 et de son activateur Tiam1.

Ainsi le PtdIns(5)P semble impliqué dans diverses pathologies humaines telles que l'infection par une bactérie ou le cancer et il pourrait donc avoir un rôle dans les mécanismes de survie, d'endocytose et de régulation de la polymérisation de l'actine.

### 4. Le phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate (PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>)

Le phosphatidylinositol-(3,5)-bisphosphate est un phospholipide mineur des membranes cellulaires, important pour la distinction des compartiments cellulaires. En effet, il est essentiellement impliqué dans le trafic membranaire et dans le recyclage des protéines des corps vésiculaires et des vésicules des compartiments vacuolaires ou lysosomaux (Dove, Piper et al. 2004; Michell, Heath et al. 2006). C'est le phosphatidylinositol bisphosphate qui fut découvert le plus récemment.

La génération de ce PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> sur les membranes internes via la PtdIns 5-kinase lipidique de type 3, PIKfyve, permet de recruter un nombre important de protéines impliquées dans le trafic intracellulaire. PIKfyve est une protéine de la grande famille des kinases qui altère le statut de phosphorylation des phosphoinositides intracellulaires. Des mutations dans cette protéine ont été identifiées chez des patients atteints de dystrophie cornéenne tachetée, qui est caractérisée par des kératocytes anormaux présentant des vésicules élargies dont l'origine est encore inconnue (Li, Tiab et al. 2005). De plus la surexpression de mutant PIKfyve déficient pour leur activité kinase, la suppression de PIKfyve par des siRNA ou des drogues spécifiques produisent des vésicules anormales décrites comme étant des endosomes précoces et tardifs élargies (Rutherford, Traer et al. 2006; Jefferies, Cooke et al. 2008). Le métabolisme de ce PtdIns peut encore être réalisé par l'action de la PtdIns 3-kinase de type 3, hVPS34 (Odorizzi, Katzmann et al. 2003).

Le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> peut être déphosphorylé par deux types de protéines : Sac3 et des membres de la famille de la myotubularine, en position 3' de l'inositol et généré ainsi le PtdIns(5)P. Sac3 a été récemment impliqué dans un syndrome neurodégénératif de Charcot-Marie-Tooth (Chow, Zhang et al. 2007). Tandis que parmi les myotubularines, trois ont été impliquées dans différentes maladies génétiques. En effet, MTM1 a été retrouvée mutée chez des patients atteints de XLCNM et des mutations dans MTMR2 et MTMR13 entraînent une neuropathie de Charcot-Marie-Tooth de type 4B1 et 4B2, respectivement (voir chapitre précédent).

Il existe plusieurs domaines de liaison à ce PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>, tels que le domaine PH de la centaurine-β2, le domaine PX de SNX1 et un nouveau domaine dans la protéine Atg18p (Michell, Heath et al. 2006).



### 5. Le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>)

Le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> joue un rôle central dans la biologie des PtdIns. C'est la forme la plus abondante retrouvée parmi les PIs, après le PtdIns. Ce PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> est essentiellement retrouvé à la membrane plasmique où il contrôle la formation des vésicules d'endocytose. Il peut ainsi recruter et séquestrer à la membrane plasmique, près des sites potentiels d'endocytose, des protéines comme AP2, AP1800 ou l'epsine (Ford, Pearse et al. 2001; Itoh, Koshihara et al. 2001). Il joue également un rôle majeur dans la régulation du cytosquelette d'actine (Tall, Spector et al. 2000) et interagit avec des protéines régulatrices de la polymérisation de l'actine comme la profiline ou la gelsoline (Yin and Janmey 2003; Hilpela, Vartiainen et al. 2004). Il permet la liaison du cytosquelette d'actine à la membrane plasmique, en interagissant avec des protéines d'ancrage comme la vinculine, la taline ou la filamine. Cette liaison permet l'interaction de ces protéines avec des glycoprotéines de surface ce qui augmente l'énergie d'adhésion entre le cytosquelette d'actine et la membrane plasmique (Toker 1998).

Trois voies de synthèse des PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> ont été décrites. Dans la première, dite « classique », le précurseur est le PtdIns(4)P produit à partir de PtdIns (Toker 1998), il est ainsi synthétisé par la phosphorylation du PtdIns(4)P à la position 5' par les kinases PtdInsP Kinase 1 (Rameh, Tolias et al. 1997). Il existe trois isoformes de PtdInsP Kinase 1 dans les cellules de mammifères :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (la nomenclature pour les isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  de l'homme et de la souris est malheureusement inversée).

Dans la seconde voie de synthèse, il est synthétisé à partir du PtdIns(5)P par les kinases PtdInsP Kinase 2, qui sont des PtdIns(5)P 4-kinases qui phosphorylent le PtdIns(5)P en position 4 (Rameh, Tolias et al. 1997).

Enfin la dernière voie de synthèse est celle à partir du PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> via la 3'-phosphatase PTEN, mais l'importance de cette contribution est mal définie.

Dans les cellules au repos, il existe un cycle permanent de phosphorylation-déphosphorylation du PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (Michell and Allan 1975) . Il est au centre de plusieurs voies de signalisation. En effet, il est le substrat des PLCs (Phospholipases C) qui le clivent en DAG et I(1,4,5)P<sub>3</sub> (Inositol Trisphosphate) qui sont des seconds messagers dans l'activation des PKC (Protein Kinase C) et la régulation du taux de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire depuis le réticulum



## Introduction

---

endoplasmique, respectivement (Berridge and Irvine 1984; Berridge and Irvine 1989; Rhee and Bae 1997).

Le DAG peut alors être dégradé par des lipases ou être phosphorylé par des DAG-kinases en acide phosphatidique (PA). Le PA va à son tour agir en tant que second messager et pourra être transporté au réticulum endoplasmique où il sera métabolisé en PtdIns. Le PtdIns formé sera alors transporté à la membrane plasmique par des protéines de transfert (PI-TP) afin de compléter le cycle (Cockcroft, Ball et al. 1997).

La synthèse de PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> est reversée aussi par l'action de 4-phosphatases, comme OCRL (Oculocerebrorenal Lowe Syndrome). La protéine OCRL est responsable d'un syndrome lié au chromosome X qui se caractérise par des retards mentaux, des cataractes congénitales et des problèmes rénaux (Lowe, Terrey et al. 1952).

Parallèlement à cette voie, le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> peut être phosphorylé en position 3' par les PtdIns 3-kinases (PtdIns3K) générant du PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>. Ce PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> joue un rôle dans de nombreuses fonctions cellulaires en servant de molécule de recrutement pour diverses protéines contenant des domaines d'interaction de type PH. Cette formation de PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> entraîne différentes réponses cellulaires par activation d'effecteurs comme la kinase Akt et la voie de signalisation mTOR.

### **B. Les autres phosphoinositides**

#### **1. Le phosphatidylinositol-4-phosphate (PtdIns(4)P)**

Le PtdIns(4)P a longtemps été considéré comme un simple précurseur des autres PIs. Il est présent à un taux relativement constant dans la cellule. Pourtant de nombreux travaux ont montré son rôle dans le maintien du réseau trans-golgien. En effet, ce PtdIns(4)P permet la relocalisation de protéines associées au Golgi telle que l'epsine R, l'adaptateur de la clathrine AP-1 au niveau de cet organelle via des domaines Enth et PH qui lie le PtdIns(4)P. Le mode d'action des protéines du Golgi recrutées par le PtdIns(4)P reste mal connu, mais des données récentes suggèrent que ces protéines sont capables de réguler la localisation et la fonction

## Introduction

---

d'autres protéines dans différents compartiments membranaires du réseau trans-golgien (De Matteis and Godi 2004; Downes, Gray et al. 2005).

### 2. Le phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate (PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>)

Le PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> provient de l'hydrolyse du PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> par l'inositol 5-phosphatase SHIP. Il est plus spécifiquement localisé à la membrane plasmique de façon transitoire et rapide en réponse à des stimulations. Il est capable de recruter, tout comme le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, via leur domaine PH, les sérine/thréonine kinases Akt et PDK1, l'impliquant ainsi dans des processus biologiques tels que la survie, la prolifération ou le métabolisme du glucose. De plus, des membres de la famille des PKC (PKC  $\zeta/\epsilon/\lambda$ ) peuvent être activés directement par ce PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> *in vitro* et *in vivo* (Toker, Meyer et al. 1994).

### 3. Le phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>)

Malgré un taux de base quasiment indétectable et une production transitoire et rapide, en réponse à des agonistes, ce PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> est le PI le mieux caractérisé (Hinchliffe 2001). Il peut interagir avec de nombreuses protéines possédant un domaine PH et conduit à leur localisation membranaire et/ou à leur activation. C'est le cas des facteurs d'échange des petites protéines G de la famille Arf (ADP-ribosylation factors) comprenant le récepteur Grp1 (General Receptor for phosphoinositides), la cytohesine-1 et ARNO (Arf nucleotide binding site opener) (Klarlund, Rameh et al. 1998) et un des facteurs d'échange de la GTPase Rac1, Vav (Han, Luby-Phelps et al. 1998).

Ce PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> est ainsi impliqué dans le contrôle de différentes fonctions cellulaires comme la survie et la prolifération cellulaire, la réorganisation du trafic vésiculaire ou l'apoptose.

Il peut être déphosphorylé par la phosphatase PTEN en position 3 générant ainsi le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> et par SHIP (SH2-containing inositol phosphatase) en position 5 de l'inositol produisant ainsi le PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>.

### III. Le projet de thèse

L'équipe de Jocelyn Laporte, dans laquelle j'ai effectuée ma thèse, travaille sur les myopathies centronucléaires. A mon arrivée dans le laboratoire pour mon stage de master 2, elle avait identifié le gène myotubularine, MTM1, comme le gène responsable de la forme liée au chromosome X des CNM (XLCNM) et avait généré et caractérisé un modèle de souris délétée pour cette protéine MTM1, reproduisant ainsi la pathologie. De plus, l'équipe avait participé à l'identification de mutations dans le gène dynamine 2, DNM2, pour la forme autosomique dominante des CNM (ADCNM). Elle venait tout juste de découvrir un nouveau gène BIN1, impliquée dans la forme autosomique récessive des CNM (ARCNM) et cherchait à étudier l'impact des mutations identifiées *in vitro* et *in vivo*. Cependant les rôles cellulaires de ces trois protéines, MTM1, BIN1 et DNM2 étaient encore peu connus, ce qui nous a permis d'émettre l'hypothèse que ces trois protéines pouvaient collaborer dans un même processus de trafic membranaire (Figure 20).

Lorsque j'ai débuté mon stage de master 2 dans l'équipe j'ai participé dans un premier temps, à l'étude de l'impact des mutations de BIN1, identifiées chez les patients ARCNM. Cette première étude constitue un premier axe dans mon projet de thèse, qui est l'étude des mutations de BIN1 identifiées chez les patients ARCNM.

Nos résultats sur BIN1 nous ont conduit à collaborer avec l'équipe de Nicolas Charlet-Berguerand, au sein de l'IGBMC, afin d'étudier une éventuelle implication de BIN1 dans les dystrophies myotoniques, puisque les patients développent également une hypotonie associée à des myofibres à noyaux centraux.

Par la suite, nous avons identifié deux nouvelles mutations dans le gène BIN1, j'ai donc continué à étudier ces nouvelles mutations en poussant nos recherches sur d'autres fonctions de BIN1 que celle précédemment étudiées.

Un deuxième axe de mon projet a été de débiter l'étude de l'impact de mutations identifiées chez les patients ADCNM, sur les fonctions connues de la dynamine 2 telles que sa localisation cellulaire, son implication dans l'endocytose de la transférine et son recrutement aux tubules membranaires formés par la surexpression de BIN1 dans les cellules en culture.

## Projet de thèse

---

Un troisième axe de mon projet porte sur les mutations de MTM1. Beaucoup de mutations ont été identifiées depuis la découverte de l'implication de ce gène dans la forme liée au chromosome X en 1996. Pourtant encore 10% des patients dont le diagnostic de XLCNM est clairement posé n'ont pas de mutations identifiées dans ce gène. Nous avons donc cherché à mettre au point une nouvelle technique qui permettrait de mieux diagnostiquer génétiquement ces patients.

Enfin le dernier axe de mon projet de thèse est d'étudier le possible lien entre ces trois protéines. En effet, nous savions que trois gènes différents induisent trois formes d'une même pathologie. Or ces trois protéines étant toutes impliquées dans le remodelage des membranes, nous avons émis l'hypothèse qu'elles puissent être impliquées dans une même voie moléculaire, qui est défectueuse dans les CNM. De plus, BIN1 semble représenter un lien moléculaire potentiel entre MTM1 et DNM2. En effet, l'interaction BIN1/DNM2 est déjà connue *in vitro*, et une interaction MTM1/BIN1 est envisageable (Figure 20). Le but est donc d'étudier ce possible lien en surexpression dans des cellules mais aussi *in vitro* par des techniques d'interactions.

Sur le plan physiopathologique, l'implication de BIN1 dans la formation des tubules-T, ainsi que les défauts de ces structures observés chez des patients atteints de XLCNM, d'ARCNM et d'ADCNM, laissent supposer que ce mécanisme commun déficient engage la formation/le maintien des tubules-T dans le muscle squelettique.

Toutes ces recherches ont pour but de faciliter le diagnostic chez les patients CNM, de mieux comprendre les défauts moléculaires induits par les mutations identifiées dans les protéines aussi bien chez les patients CNM, mais aussi DM et CMT. Ce travail va permettre d'initier un lien entre trois protéines dans un mécanisme commun afin de faciliter les recherches vers de nouvelles thérapies.

# RESULTATS

# RESULTATS

## **I. MTM1 : étude de l'impact des mutations grâce à un nouveau système**

**Publication 1: “Novel molecular diagnostic approaches for X-linked centronuclear (myotubular) myopathy reveal intronic mutations.”**

### **A.Contexte de l'étude : l'état initial des connaissances sur les myopathies centronucléaires liées au chromosome X**

La myopathie centronucléaire liée au chromosome X, aussi appelée myopathie myotubulaire, fait partie de la famille des myopathies centronucléaires. Trois formes de myopathies centronucléaires ont été décrites à ce jour : une forme liée au chromosome X pour laquelle des mutations dans le gène MTM1 ont été identifiées (Laporte, Hu et al. 1996), une forme autosomique récessive avec des mutations dans le gène BIN1 (Nicot, Toussaint et al. 2007) et une forme autosomique dominante avec des mutations dans le gène dynamine 2 (DNM2) (Bitoun, Maugendre et al. 2005). La myopathie centronucléaire liée au chromosome X est la forme la plus sévère et les patients présentent en générale une hypotonie généralisée dès la naissance qui requiert une aide ventilatoire due à une insuffisance respiratoire.

Un diagnostic de routine est aujourd'hui proposé aux patients diagnostiqués pour une XLCNM et dans 90% des cas la mutation dans le gène MTM1 est identifiée. Pourtant chez 10% des patients, aucune mutation n'est retrouvée dans ce gène par cette technique de routine. Ceci peut être du au fait que ce n'est peut être pas la myotubularine qui est touchée mais un des gènes qui la régule ou encore que le diagnostic XLCNM n'est pas le bon mais que le patient est plutôt atteint d'une de deux autres formes ARCNM ou ADCNM. Soit encore parce que la technique de routine utilisée ne permet pas de détecter certaines mutations présentes dans le gène MTM1 (par exemple : les mutations introniques).

## Résultats

---

Afin de pouvoir diagnostiquer plus rapidement et plus de mutations, nous avons donc développé un nouveau système de diagnostic.

### **B.Question biologique : comment mieux détecter les mutations responsables des myopathies centronucléaires liées au chromosome X et ainsi mieux diagnostiquer ces pathologies humaines ?**

La forme liée au chromosome X des myopathies centronucléaires (XLCNM) est causée par des mutations dans le gène de la myotubularine, MTM1. Des mutations du gène MTM1 ont été identifiées dans 90 % des cas diagnostiqués XLCNM et à ce jour, plus de 200 mutations différentes ont été retrouvées tout le long du gène MTM1. Ces mutations peuvent être de diverses natures : des mutations non-sens, faux sens, des insertions, des délétions ou encore des mutations des sites d'épissage.

La méthode routinière utilisée aujourd'hui pour détecter ces mutations est le séquençage de l'ADN du gène MTM1 chez les patients diagnostiqués XLCNM. Quelques analyses par RT-PCR ont été faites sur douze patients mais cette méthode d'analyse est encore peu utilisée. Enfin, l'analyse par Western Blot, du fait de la complexité de cette technique, est également peu utilisée jusqu'à présent. En effet, elle requiert une étape longue d'immunoprécipitation. Cependant, cette technique a déjà démontré que la plupart des mutations de MTM1 déjà identifiées sont responsables d'une diminution du niveau de la protéine (Laporte, Kress et al. 2001).

Afin d'élargir le spectre de détection des mutations du gène MTM1, j'ai mis au point une stratégie expérimentale afin de détecter des mutations introniques. Ceci va permettre de faciliter et de rendre plus rapide et efficace l'examen génétique.

### **C.Résultats**

Notre stratégie consistait, dans un premier temps, à élaborer de nouveaux anticorps de lapin dirigés contre la myotubularine humaine. De part leur affinité élevée, ces anticorps sont

## Résultats

---

capables de détecter le niveau de protéine sans étape d'immunoprécipitation. En effet, les anticorps préalablement produits n'étaient que peu utilisés car ils avaient l'inconvénient de nécessiter une étape d'immunoprécipitation afin d'enrichir la myotubularine. Or cette étape est longue et contraignante. Il était donc nécessaire de développer des anticorps, capables de détecter la myotubularine provenant de fibroblastes et de lymphoblastes humains sans cette étape. Ces nouveaux anticorps peuvent de plus être utilisés chez la souris puisqu'ils sont capables de détecter la protéine *mtm-1* de souris.

Grâce à ces anticorps, nous avons pu déterminer le niveau de la protéine, dans les lymphoblastes et les fibroblastes, chez sept patients avec un diagnostic de CNM liée au chromosome X posé. Parmi ces patients, le niveau cellulaire de myotubularine n'était normal que chez l'un d'entre eux (patient 3, préalablement caractérisé et servant donc de témoin). Chez un autre, le niveau de myotubularine était plus faible que chez des individus contrôles (patient 7, aucune mutation identifiée pour le moment) et ce niveau n'était pas détectable chez les cinq derniers patients (patient 1 et 2, déjà caractérisés et patient 4, 6 et 8). Parmi ces cinq patients, trois (patients 4, 6 et 8) n'avaient pas encore de mutations identifiées par séquençage des exons et des jonctions intron-exon du gène. La simple utilisation de ces nouveaux anticorps, nous a donc permis de conclure rapidement que ces patients devaient probablement être mutés soit dans MTM1 directement soit dans une protéine régulatrices de MTM1. Ils nous ont aussi permis de confirmer aux généticiens la suspicion de XLCNM chez les patients.

D'autre part, nous avons utilisé ces anticorps afin de détecter la myotubularine à partir de biopsies musculaires du patient 6 et de biopsies d'individus contrôles. Dans le cas du patient 6, la biopsie musculaire ne montre pas de niveau détectable de myotubularine dans ces fibres musculaires, alors que la myotubularine est détectable dans les biopsies des individus contrôles.

Ainsi ces nouveaux anticorps ont non seulement la propriété de ne pas nécessiter d'étape d'immunoprécipitation lors de western blot à partir de cellules, telles que les lymphoblastes et les fibroblastes, et donc de simplifier l'étude mais ils permettent en plus, de détecter la myotubularine à partir de biopsies musculaires de patients, directement.

Afin de déterminer les mécanismes responsables de la perte de la myotubularine chez les patients 4, 6 et 8, nous avons réalisé des RT-PCR à partir de cellules en culture. La RT-



## Résultats

---

PCR, ainsi que le séquençage du produit de cette RT-PCR du patient 8, ne montre aucune mutation dans l'ADNc, alors que l'amplification par PCR montre un niveau plus faible que chez des individus contrôles. Ce résultat suggère qu'une autre protéine que MTM1 pourrait être mutée chez ce patient et que cette protéine doit très certainement réguler le niveau de MTM1 puisque cette dernière est absente chez ce patient.

Dans le cas du patient 6, après la RT-PCR et le séquençage du produit de cette RT-PCR, une mutation intronique c.868-13T>A a été identifiée et pourrait créer un nouveau site accepteur d'épissage. L'analyse par RT-PCR, nous a permis de confirmer cette hypothèse puisque les lymphoblastes de patients présentaient des produits anormaux qui correspondaient à l'utilisation de trois sites accepteurs différents dans l'exon 10.

Chez le patient 4, nous avons pu observer une insertion d'environ 100 nucléotides dans la partie N-terminale de l'ADNc de MTM1 après RT-PCR. Le séquençage de ce transcrit aberrant a permis de révéler une insertion de 94 nucléotides se trouvant entre l'exon 7 et l'exon 8. Cette insertion est responsable de l'apparition d'un codon stop prématuré qui pourrait être responsable de la perte de la protéine. La comparaison de ces 94 nucléotides avec la séquence entière du gène MTM1, nous a permis de localiser cette insertion au milieu de l'intron 7. Le séquençage de cette région a mis en évidence une mutation A>G en position -1 du début de l'insertion. Cette mutation permettrait la création d'un site accepteur d'épissage, qui en collaboration avec un site donneur cryptique, autoriserait l'exonisation d'une séquence intronique conservée (c'est-à-dire qu'une partie de l'intron est alors considéré comme un exon par la cellule).

### **D. Conclusion de l'étude**

Ce travail propose l'utilisation de nouveaux anticorps spécifiques de la myotubularine afin de rechercher le niveau de la protéine à partir de cellules en culture et/ou de biopsies musculaires des patients. Ces nouveaux anticorps ne nécessitent pas d'étape d'immunoprécipitation afin d'enrichir la myotubularine, comme cela était le cas auparavant et permettent donc une analyse par western blot, rapide et efficace du niveau de MTM1.

## Résultats

---

Ces nouveaux anticorps ont permis de mettre en évidence que la plupart des mutations de MTM1 mènent à une diminution du niveau de la protéine. En effet, sur 22 mutations différentes testées, seules deux n'étaient pas corrélées avec une diminution du niveau de la myotubularine. Parmi ces deux mutations, on retrouve le missense p.Ser376-Asn. La serine et l'asparagine étant deux acides aminés polaires, cela pourrait expliquer l'absence de diminution du niveau de la protéine MTM1 dans les cellules du patient.

On retrouve aussi la délétion d'une glycine en position 294, sans changement du cadre de lecture. Cette délétion pourrait être trop petite pour pouvoir avoir un impact sur le niveau de la myotubularine et donc sur sa détection.

Ces résultats vont ainsi permettre d'accélérer le diagnostic génétique. En effet, la technique de Western Blot est plus rapide et moins coûteuse que la technique de routine de séquençage de l'ADN des patients par PCR, dans laquelle tout le gène MTM1 doit être séquencé puisque les mutations se retrouvent tout le long de ce gène. Dans notre laboratoire, plus d'une dizaine de couples de « primers » sont utilisés pour séquencer la totalité des exons et des jonctions intron-exon du gène MTM1. Pourtant cette technique de Western Blot a ses limites puisque dans 9% des cas (2/22), la myotubularine est présente à un niveau identique chez les patients comparé aux individus sains. Toutefois, il est à noter que ce pourcentage est équivalent à celui des 10% de cas pour lesquels aucune mutation de MTM1 n'est identifiée par séquençage de la totalité des exons et des jonctions intron-exon par la technique dite de routine. Dans les deux cas, par Western Blot ou par séquençage par PCR de l'ADN des patients, des analyses complémentaires doivent être effectuées. Dans le cas d'un Western Blot positif pour la myotubularine, aussi bien au niveau de biopsie que sur des extraits cellulaires, une PCR classique ou une analyse par RT-PCR doivent être réalisées pour rechercher dans un premier temps les deux mutations connues qui ne provoquent pas de perte de la myotubularine : le missense p.Ser376-Asn et la délétion d'une glycine en position 294. Puis tout le gène doit être séquencé si aucune de ces deux mutations n'est identifiée.

Ces nouveaux anticorps peuvent aussi différencier les différentes formes de myopathies centronucléaires et accélérer à nouveau le diagnostic si un doute persiste sur la forme de CNM dont le patient est atteint. En effet, si le niveau de la myotubularine est plus bas que la normale voir quasi absent, le diagnostic sera alors orienté vers une XLCNM, puisque le niveau de myotubularine est normal dans les formes ARCNM et ADCNM. Evidemment, la même limite qu'auparavant subsiste toujours et des analyses complémentaires

## Résultats

---

doivent être réalisées si le niveau de myotubularine est normal, afin d'identifier clairement la mutation en cause, car dans environ 9 % des cas, le niveau de myotubularine est normal alors que le gène est muté.

Nous avons de plus pu détecter, par RT-PCR, des mutations introniques ayant un effet sur l'épissage du gène, et des mutations exoniques. En effet, nous avons ainsi mis en évidence pour la première fois, une mutation intronique créant un site accepteur d'épissage qui avec un site donneur cryptique, résulte en l'exonisation d'un exon 7' et en la génération d'un codon stop prématuré.

Notre approche montre l'importance de l'utilisation des analyses par western blot et par RT-PCR des patients diagnostiqués XLCNM. Cela permettrait de confirmer le diagnostic de XLCNM, chez une bonne partie des 10% de patients pour lesquels aucune mutation exonique ou de la jonction intron-exon n'a été identifiée. Cette nouvelle approche pourrait ainsi permettre de ramener à environ 1% le nombre de patients dont aucune mutation dans le gène MTM1 ne pouvait être identifiée.

En conclusion, nous proposons que le séquençage de l'ADNc, résultant d'une RT-PCR, puisse être la nouvelle méthode de routine de détection des mutations dans le gène MTM1. Si les cellules sont traitées avec la puromycine, afin d'éviter la perte des ARNm détruits à cause de l'apparition d'un codon stop prématuré, cette technique de séquençage de l'ADNc pourrait permettre de détecter plus de mutations et particulièrement chez les femmes hétérozygotes qui transmettent la mutation à leurs fils. De plus, cette étude pourrait permettre d'orienter plus rapidement les généticiens vers le diagnostic de XLCNM en utilisant directement la technique de Western Blot à partir des cellules en culture de patients ou directement de biopsies musculaires. Récolter l'ensemble de ces données lors d'un premier examen génétique/biochimique permettraient ainsi de faciliter une prise en charge plus rapide des patients atteints de cette pathologie très invalidante qu'est la XLCNM.

**Publication 1:**

**« Novel molecular diagnostic approaches for X-linked centronuclear (myotubular) myopathy reveal intronic mutations. »**

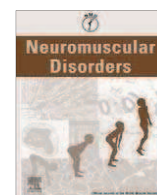
Tosch V, Vasli N, Kretz C, Nicot AS, Gasnier C, Dondaine N, Oriot D, Barth M, Puissant H, Romero NB, Bönnemann CG, Heller B, Duval G, Biancalana V, Laporte J.

Neuromuscul Disord. 2010 Jun;20(6):375-81



Contents lists available at ScienceDirect

## Neuromuscular Disorders

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/nmd](http://www.elsevier.com/locate/nmd)

## Novel molecular diagnostic approaches for X-linked centronuclear (myotubular) myopathy reveal intronic mutations

Valérie Tosch<sup>a,b,c,d,e,1</sup>, Nasim Vasli<sup>a,b,c,d,e,1</sup>, Christine Kretz<sup>a,b,c,d,e</sup>, Anne-Sophie Nicot<sup>a,b,c,d,e</sup>, Claire Gasnier<sup>f</sup>, Nicolas Dondaine<sup>f</sup>, Denis Oriot<sup>g</sup>, Magalie Barth<sup>h</sup>, Hugues Puissant<sup>h</sup>, Norma B. Romero<sup>i</sup>, Carsten G. Bönnemann<sup>j</sup>, Betty Heller<sup>b,c,d</sup>, Gilles Duval<sup>b,c,d</sup>, Valérie Biancalana<sup>a,b,c,d,e,f</sup>, Jocelyn Laporte<sup>a,b,c,d,e,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Neurobiology and Genetics, IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire), Illkirch, France

<sup>b</sup> Inserm, U964, Illkirch, France

<sup>c</sup> CNRS, UMR7104, Illkirch, France

<sup>d</sup> Université de Strasbourg, Illkirch, France

<sup>e</sup> Collège de France, chaire de génétique humaine, Illkirch, France

<sup>f</sup> Laboratoire Diagnostic Génétique, Faculté de Médecine, CHRU, Strasbourg, France

<sup>g</sup> Service de Réanimation et néonatalogie, CHU, Poitiers, France

<sup>h</sup> Service de génétique, CHU, Angers, France

<sup>i</sup> Unité de Morphologie Neuromusculaire, Institut de Myologie, Inserm UMRS 974, CNRS UMR 7215, Université Paris 6, CHU Pitié-Salpêtrière, Paris, France

<sup>j</sup> Division of Neurology, The Children's Hospital of Philadelphia, Pennsylvania Muscle Institute, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, PA, USA

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 16 October 2009

Received in revised form 20 February 2010

Accepted 30 March 2010

## Keywords:

Centronuclear myopathy

Myotubular myopathy

Myotubularin

Intronic mutations

MTM1

XLMTM

## ABSTRACT

X-linked centronuclear myopathy (XLMTM), also called myotubular myopathy, is a severe congenital myopathy characterized by generalized hypotonia and weakness at birth and the typical histological finding of centralization of myo-nuclei. It is caused by mutations in the *MTM1* gene encoding the 3-phosphoinositides phosphatase myotubularin. Mutations in dynamin 2 and amphiphysin 2 genes lead to autosomal forms of centronuclear myopathy (CNM). While XLMTM is the most frequent and severe form of CNM, no mutations are found in about 30% of patients by sequencing all *MTM1* exons. Moreover, the impact of *MTM1* sequence variants is sometimes difficult to assess. It is thus important to devise a complete molecular diagnostic strategy that includes analysis of the myotubularin transcript and protein expression. We therefore developed novel antibodies against human myotubularin and showed that they are able to detect the endogenous protein by direct Western blot from muscle samples and from cultured cells. In conjunction with RT-PCR analysis we validated the consequences of missense and splice mutations on transcript integrity and protein level. We also detected and characterized a novel deep intronic mutation consisting of a single nucleotide change that induces exonisation of a conserved intronic sequence. Patients with centronuclear myopathy and no molecular diagnosis should be investigated for *MTM1* defects at the cDNA and protein level.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

X-linked centronuclear myopathy (XLMTM), also called myotubular myopathy, is a rare congenital myopathy. XLMTM and more generally centronuclear myopathies (CNM) are characterized by muscle weakness associated with a predominance of type I hypotrophic fibers and numerous centrally located nuclei on muscle biopsy [1,2]. Patients with XLMTM display severe generalized hypotonia at birth accompanied by respiratory insufficiency

requiring ventilator support. While the life expectancy is usually strongly reduced, up to 40% of patients survive into childhood and even adulthood, most of them requiring some degree of respiratory support [3–6]. XLMTM primarily affects males, and myopathic manifestations in female carriers have been found to be associated with skewed X-inactivation, with or without chromosomal rearrangements [7–9]. XLMTM is due to mutation in the *MTM1* gene encoding the 3-phosphoinositides phosphatase myotubularin [10]. Phosphoinositides are second messengers that flag specific membrane subdomains. Myotubularin is thought to regulate membrane traffic and T-tubules maintenance in animal models like *Caenorhabditis elegans*, Zebrafish and mice [11–13]. About 400 patients with *MTM1* mutations widespread through the gene have been reported so far [4,14–19]. Myotubularin is ubiquitously

\* Corresponding author at: IGBMC, 1 rue Laurent Fries, B.P. 10142, 67404 Illkirch, France. Tel.: +33 388653412; fax: +33 388653201.

E-mail address: [jocelyn@igbmc.fr](mailto:jocelyn@igbmc.fr) (J. Laporte).

<sup>1</sup> Contributed equally to this study.

expressed and a specific protein isoform is present in muscles [10,20].

Other forms of centronuclear myopathies include autosomal dominant and recessive forms, and sporadic cases. Most autosomal dominant cases are associated with mutations in the large GTPase dynamin 2 (DNM2) while mutations in the *BIN1* gene encoding the membrane remodeling protein amphiphysin 2 have been associated with a few autosomal recessive consanguineous cases [21,22]. In addition, sequence variants in the Ryanodine receptor (RYR1) and in another 3-phosphoinositides phosphatase (hJUMPY, also called MTMR14) were recently associated with sporadic cases [23,24]. These autosomal forms are usually less severe than XLMTM [25,26] but it is to note that some specific *BIN1* and *DNM2* mutations can be associated with neonatal hypotonia and weakness [22,27].

As XLMTM is the most frequent and severe form of centronuclear myopathies, it is important to provide molecular diagnosis approaches that detect the largest number of mutations. The routine molecular diagnosis is done by sequencing exons and intron–exon junctions from genomic DNA. RT-PCR analysis from muscle cDNA has been also used to identify *MTM1* mutations and confirm the effect of splice mutations in 12 cases [18,19,28,29]. Monitoring of myotubularin level by Western blot using previously described antibodies necessitated an immunoprecipitation step to be able to detect the protein, and showed that most *MTM1* mutations including missense mutations are associated with a lower protein level compared to controls [30].

In order to facilitate the molecular diagnosis of XLMTM and detect and validate non-exonic mutations, we developed novel myotubularin antibodies and re-assess the status of patients without mutations in *MTM1* exons. We characterize here 5 patients with X-linked centronuclear myopathy. We identify the disease-causing mutations and their consequence on protein level and RNA splicing by combining direct Western blotting, RT-PCR and genomic DNA sequencing. We also report the characterization of a deep intronic mutation leading to abnormal exonisation.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Patients and murine cells and tissues

Six control cells (3 fibroblast and 3 lymphoblast cell lines) were derived from individuals unaffected by known neuromuscular disorders. Three previously characterized patient cells were used as mutated controls: lymphoblastoid cells from patients 1 (89-441; deletion of exons 1–13 in *MTM1*) and 3 (CF88; p.Ser376Asn in *MTM1*), and fibroblast cells from patient 2 (H31; complete genomic deletion of *MTM1*) [30]. Patients cells analyzed were from nine clinically diagnosed CNM patients, based on muscle weakness and a characteristic CNM histopathology (abnormal proportion of centralized nuclei, predominance of type I fibers and variation in size) and directed to us for molecular diagnosis. Myotonic dystrophy has been excluded in all patients by Triplet repeat primed-PCR, Quantitative Multiplex PCR of Short fluorescent Fragments (QMPSF) or Southern blot. Patients 4, 5 and 6 had severe neonatal hypotonia and deceased by one year of age, while patient 8 is a 6 years old boy able to sit and on night-time ventilatory support, and patient 7 is a 8 years old boy who had hypotonia at birth and respiratory assistance during 3 days, and later presented proximal weakness, walking difficulties, lordosis, strabismus and learning difficulties. Appropriate written consent was received from patients or their legal representant for molecular study in a diagnosis setting, and such molecular diagnosis investigations were validated by on-site ethical committees. Some cell lines were established by the DNA and Cell Bank of G en ethon (Evry, France). A summary of patients' clinical and molecular data is provided in Table 1.

Mouse C2C12 cells were from the European collection of cell cultures (ECACC, 91031101) and skeletal muscle biopsies taken from quadriceps of 5 weeks old wild-type and *Mtm1* knock-out mice [31].

### 2.2. Antibodies and Western blotting

New Zealand white female rabbits were immunized against two human myotubularin sequences: R2630 and R2631 against the N-terminal peptide MASASTSKYNSHSLE, R2826 and R2827 against the C-terminal peptide SQMMPHVQTHF. Peptides were coupled to ovalbumin as a protein carrier prior to immunization. Sera were immuno-purified using the immunizing peptides coupled to a Sulf-link column (Pierce, Rockford, IL, USA). For Western blot, cells and muscle extracts were prepared in extraction buffer (50 mM Tris pH 7.8, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 50 mM KCl, 1% SDS, 2% Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate), homogenized through 25G needles and cycles of liquid nitrogen freezing, then centrifuged. Aliquots were loaded onto 8% SDS–polyacrylamide gels, electrotransferred onto nitrocellulose and blotted with anti-myotubularin antibodies (dilutions ranging from 1:300 to 1:500) and mouse anti-GAPDH antibodies (diluted 1:10,000; Millipore, Billerica, MA, USA). Goat secondary antibodies were anti-mouse or anti-rabbit coupled to peroxidase (1:10,000; Jackson ImmunoResearch Inc., Baltimore, USA) and signals were detected with SuperSignal Pico (Pierce).

### 2.3. RT-PCR and genomic DNA sequencing

Total RNA was extracted from cultured cells using Tri reagent (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH, USA) and reverse transcribed using Superscript (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). *MTM1* and *HPRT* cDNAs were subsequently amplified by PCR. *MTM1* specific primers were ATGGCTTCTGCATCAACTTC (5'–3' direction) with TGGAATTCGATTCGGGAC for fragment 1 (678nt) while we also used the forward primer GCAGCCGAGCAGCTGGC in the non-coding exon 1 (729nt) for some PCR experiments, GTTCCGTATCGTGCTCAG with GGAGAACGGTCAGCATCGG for fragment 2 (698nt), AGAATGGATAAGTTTGGAC with TTATTTGCA GCTCTAATGCG for fragment 3 (622nt). *HPRT* primers were CCAA AGATGGTCAAGTTCGC and CTGCTGACAAAGATTCACCTGG (745nt).

Genomic DNA prepared from cultured cells or fresh blood using standard procedures was amplified by PCR with primers GCTTGAACAAAACAGTTCCTG and CCCATTCTCACAATGCACA located in intron 7. RT-PCR and PCR products were purified using Multiscreen HTS 96-wells plates (Millipore) and sequenced with ABI PRISM BigDye Terminator cycle kits on a 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA).

### 2.4. Sequence analysis

Reference sequences used were: human *MTM1* cDNA (U46024), human genomic *MTM1* (NG\_008199) and mouse genomic *Mtm1* (NT\_039706). The genomic structure of human *MTM1* was published elsewhere [32]. Sequence alignment was performed with BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and prediction of splice site strength with MaxEntScan (MES, [http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan\\_scoreseq.html](http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html)), NNSPLICE ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)), and Human Splicing Finder (<http://www.umd.be/HSF/>).

## 3. Results

### 3.1. Validation of novel myotubularin antibodies

Previously characterized anti-myotubularin antibodies allowed the detection of myotubularin from human cells after immunopre-



**Table 1**

Summary of clinical and molecular data.

Patients	Codes	Clinical severity	<i>MTM1</i> mutation	Cells/tissues <sup>a</sup>	<i>MTM1</i> protein level <sup>b</sup>	<i>MTM1</i> RNA analysis
1	89-441	Severe, additional hypospadias	Deletion exons 1–13	Lym	Not detectable	n.d.
2	H31	Severe, additional hypospadias	Deletion all <i>MTM1</i>	Fib	Not detectable	Absent
3	CF88	Severe	c.1127G>A (p.Ser376Asn)	Lym	Normal	n.d.
4	GU15	Severe	c.582+1334A>G	Lym	Not detectable	Intron 7 partial exonisation
5	AHW88	Severe	c.(1644+3)_(1644+6)delAAGT	Fib	n.d.	Exon 14 skipping
6	AEK28	Severe	c.868-13T>A	Muscle, Lym	Not detectable	Splicing defects of exon 10
7	AHY60	Mild, 8 years old	c.575A>G (p.Tyr192Cys)	Lym	Lower than controls	n.d.
8	AAS96	Intermediate, 6 years old	n.d.	Fib	Not detectable	Lower than controls <sup>c</sup>
9	AIF27	Prenatal diagnosis	c.1493T>A (p.Leu498Stop)	Chor villus	n.d.	c.1493T>A in RNA sequence

Patients 1–3 were reported elsewhere [16].

Classification of severity is based on ventilation support [6]. All patients with a severe phenotype died before one year of age.

*MTM1* mutations according to GenBank U46024.

n.d., not determined.

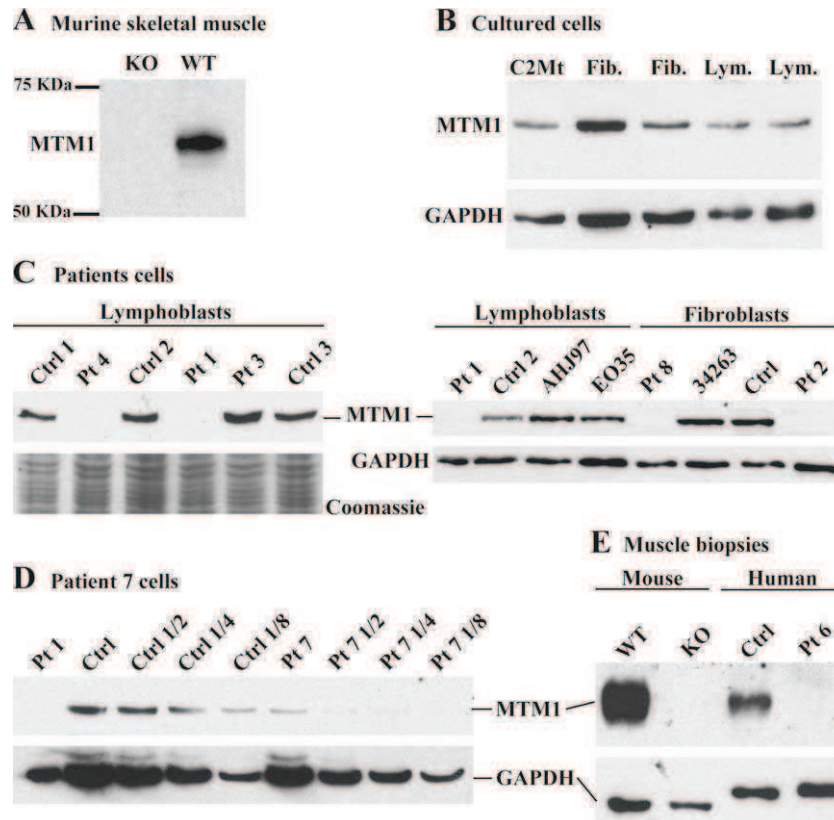
<sup>a</sup> Lym, lymphoblastoid cells; Fib, fibroblasts; Chor villus, chorionic villus.<sup>b</sup> Ref. [30] and this study. Not detectable means that the protein level is below the detection threshold of the method.<sup>c</sup> Semi-quantitative.

precipitation as an enrichment step [30]. Here we generated novel rabbit polyclonal antibodies against human myotubularin. Most of the depicted experiments are with the R2826 antibody while the other antibodies gave similar results. By direct Western blot on murine skeletal muscle extracts, these antibodies detect a band at the expected size (about 65 kDa), that is absent in *Mtm1* KO sample (Fig. 1A). We concluded they detect myotubularin and cross-react with the mouse protein. Myotubularin can also be detected from cell extracts of murine C2C12 myotubes, human fibro-

blasts, human lymphoblasts (Fig. 1B), human embryonic kidney epithelial cells, human mammary epithelial cells, culture of chorionic villi cells and amniotic cells (not shown), suggesting these antibodies can be used onto extracts from different cell origin.

### 3.2. Myotubularin level in cells and tissues from *XLMTM* patients

We monitored the level and size of myotubularin from lymphoblast and fibroblast cell lines derived from controls and CNM



**Fig. 1.** Detection of myotubularin by direct Western blot from cultured cells and muscle biopsies. (A) Skeletal muscle extract from wild-type (WT) and *Mtm1* knock-out (KO) mice immunoblotted with anti human myotubularin antibody. Myotubularin appears at 65 kDa. (B) Myotubularin immunoblot on different cell lines: murine C2C12 myotubes (C2Mt), human fibroblasts (Fib) and lymphoblasts (Lym). (C) Different controls cells (Ctrl) and CNM patients (Pt) cells were analyzed for the presence of myotubularin. Cells from patient 1 and patient 2 are derived from patients with *MTM1* deletions. Cells AHJ97, EO35 and 34263 are derived from CNM patients in whom no subsequent *MTM1* abnormalities or mutations were found. Note that myotubularin is not detectable in cells from patients 4 and 8. (D) Serial dilution of patient 7 cells extracts showing that myotubularin is still detectable at expected size although in a much lower amount, compared to controls cells. (E) Skeletal muscle biopsies from wild-type (WT) and *Mtm1* knock-out (KO) mice and from human control and patient 6 analyzed by immunoblotting: myotubularin is not detectable in *Mtm1* KO mouse and patient 6. Loading control was anti-GAPDH or a Coomassie staining for panel (C).

patients (Table 1 for a summary). Myotubularin was below detection level in cells from patients with large *MTM1* deletions (patients 1 and 2), while a missense mutation p.Ser376Asn in the phosphatase active site did not change the protein level (patient 3; Fig. 1C; [30]). Myotubularin was not detectable in cells from patient 4 and 8, in whom no *MTM1* mutation was previously identified by DNA sequencing of exons and intron–exon junctions, suggesting that the disease is nevertheless linked to myotubularin deficiency (Fig. 1C; [30]). Prior to DNA sequencing, we noted that myotubularin level was lower in cells from patient 7 compared to control. Semi-quantitative analysis compared to GAPDH level suggested a decrease of about 7 times compared to control (Fig. 1D). Subsequent DNA sequencing revealed a c.575A>G mutation leading to a missense change p.Tyr192Cys. Lastly, these antibodies can be used to detect myotubularin from muscle biopsies (Fig. 1E). Muscle biopsy from the CNM patient 6 with a c.868-13T>A sequence variant in intron 9 did not show any detectable myotubularin. Similar results were obtained on this muscle extract either with N-terminal or C-terminal directed antibodies, suggesting instability of RNA or protein as the molecular mechanisms, rather than production of a truncated protein.

In conclusion, novel anti-myotubularin antibodies allow a rapid detection of myotubularin from cell and muscle extracts by direct Western blot.

### 3.3. Detection of abnormal *MTM1* splicing

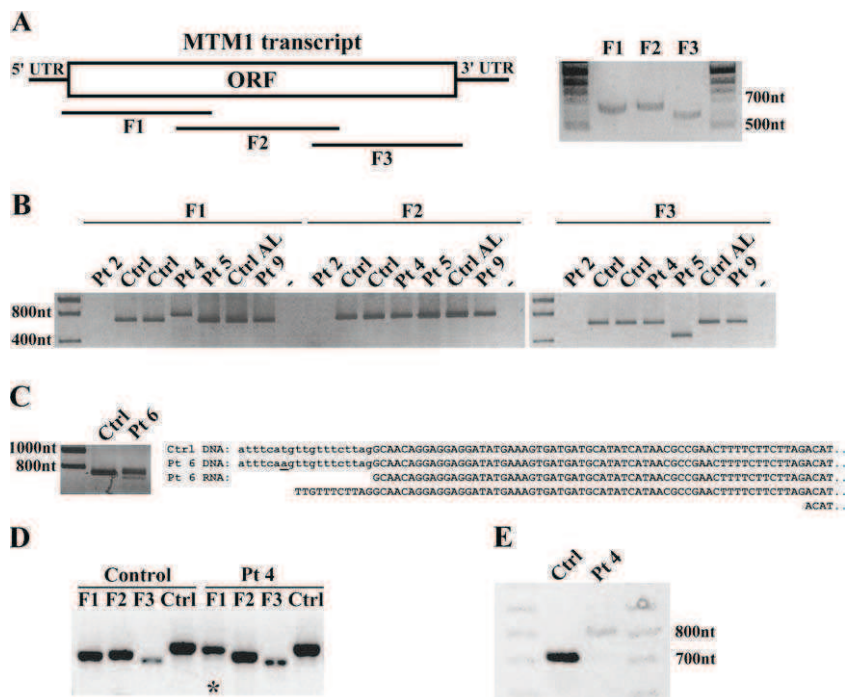
To analyze further the molecular mechanism leading to myotubularin deficiency in cells from patients 4, 6 and 8, we next established RT-PCR analysis from cultured cells, covering the *MTM1* coding sequence into three overlapping fragments (Fig. 2A). RT-PCR amplification for patient 8 and sequencing of the products

showed a normal *MTM1* cDNA sequence, although PCR amplification gave a much lower level compared to the control cells in two independent experiments (not shown). The intronic variant c.868-13T>A found in patient 6 is predicted to create an acceptor splice site with similar strength compared to the endogenous site, by Human Splicing Finder. RT-PCR analysis of lymphoblast cells from this patient showed abnormal products that correspond to the use of three different acceptor sites for exon 10, the normal site and two other sites leading to predicted out-of-frame translation (Fig. 2C). This experiment confirms that the intronic variant c.868-13T>A is the causative mutation leading to the lower protein level seen in Fig. 1E. Screening other patient cells, including chorionic villus and amniotic liquid cells, revealed abnormal PCR products for cells from patients 4 and 5 (Fig. 2B). Patient 5 DNA showed a c.(1644+3)\_(1644+6)delAAGT variation in intron 14 and sequencing of the RT-PCR products reveal skipping of exon 14 (not shown). In cells from patient 4, an insertion of about 100nt was predominantly present in the N-terminal part of the *MTM1* cDNA (Fig. 2D and E). Subsequent sequencing of the aberrant transcript from patient 4 revealed the insertion of a 94nt sequence between exon 7 and exon 8, bearing stop codons in all three possible frames; this abnormal sequence inclusion is responsible for the lack of myotubularin protein as seen on Fig. 1C.

RT-PCR followed by sequencing of the PCR products thus represents a useful approach to detect or/and confirm both exonic mutations and splice alterations due to intronic mutations.

### 3.4. Characterization of a deep intronic *MTM1* mutation

Comparison of the 94nt insertion in patient 4 *MTM1* cDNA showed that it matches a region located in the middle of *MTM1* intron 7. Sequencing this region on genomic DNA from both cultured



**Fig. 2.** Detection of *MTM1* transcript abnormalities in patients with X-linked centronuclear myopathy. (A) *MTM1* cDNA was amplified in three overlapping fragments (F1, F2, F3) covering the coding sequence, from cultured immortalized fibroblasts. (B) RT-PCR amplification products from control cells (Ctrl), control amniotic liquid cells (Ctrl AL), patient 2 (Pt 2; complete deletion of the *MTM1* gene) and several CNM cells. “–” is a control without cDNAs. Note aberrant products size from patients 4 and 5. Cells from patient 9 were from chorionic villus and sequencing lead to the identification of a c.1493T>A mutation (p.Leu498Stop). (C) RT-PCR from patient 6 lymphoblasts detected aberrant fragments. Sequencing of these products showed that the c.868-13T>A mutation (underlined) lead to the usage of three different acceptor sites, that were predicted with similar scores by Human Splicing Finder. Intronic and exonic sequences are in small and upper cases respectively. (D) and (E), a focus on patient 4 cells. (D) RT-PCR amplification products from control and patient 4 cells showing an aberrant size of fragment 1 (indicated by a star) while other fragments were found at expected size. RT-PCR control gene was HPRT (Ctrl). (E) A longer migration of PCR fragment 1 from control (Ctrl) and patient 4 cells: the insertion in patient 4 *MTM1* cDNA was estimated to be about 100nt in length.



cells and blood sample derived from the patient revealed a point mutation A>G at position –1 from the start of this insertion (Fig. 3A and B). This c.582+1334 A>G mutation is located 1.3 kb distal from exon 7 donor site and 0.9 kb proximal from exon 8 acceptor site. The sequence of this insertion, called exon 7', is well conserved in mouse intron 7 with 89% identity, a score similar to *MTM1* exons (ranging from about 87% to 90% identity), and the surrounding 400nt sequence shares about 84% identity between mouse and human. However, exon 7' is not conserved in human *MTMR1*, a close *MTM1* homologue located 20 kb distal on the X chromosome [33]. Together with our RT-PCR data, *in silico* analysis using MES and NNSPLICE demonstrated the creation of a functional acceptor splice site with very high score of 9.7 and 1.0, respectively. A cryptic donor site downstream of exon 7' is also predicted by these programs (AG/GTACA, NNSPLICE score of 0.9; Fig. 3C) but is used only in the context of the c.582+1334 A>G mutation. No EST that includes exon 7' sequence has been described.

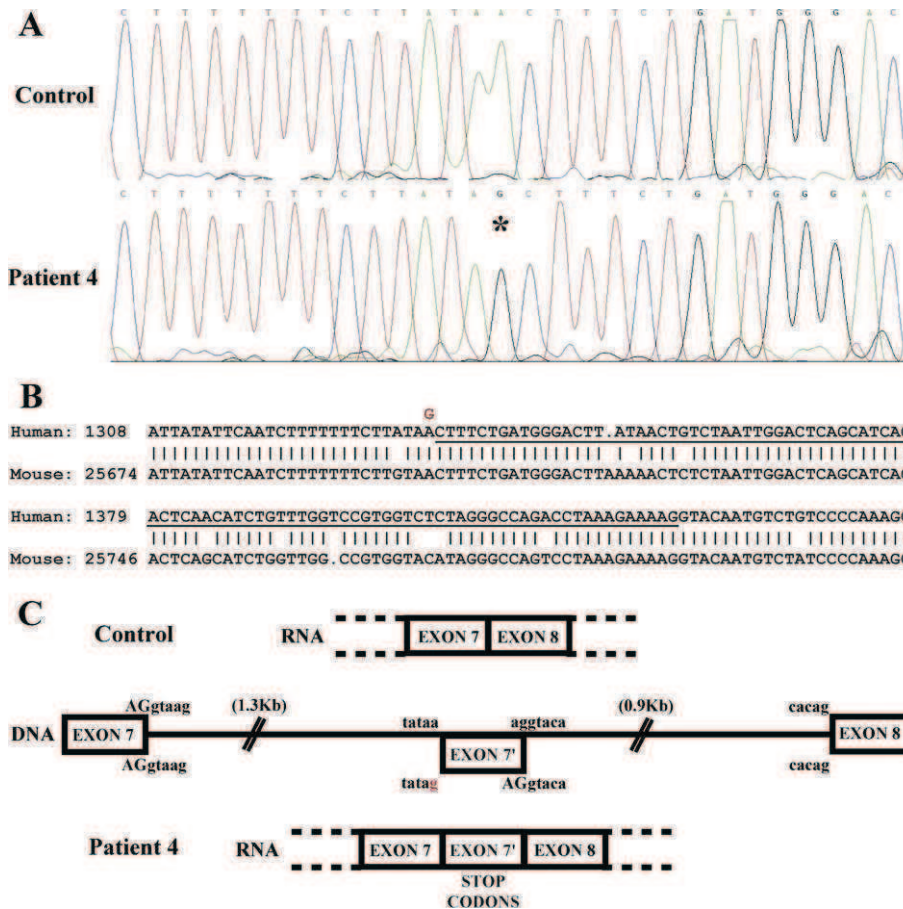
We conclude that a single intronic point mutation creates a functional acceptor site that was used together with an existing cryptic donor site to induce the exonisation of a conserved intronic sequence.

**4. Discussion**

We have characterized novel anti-myotubularin antibodies that have been used, in parallel with RT-PCR amplification, to assign

molecular diagnosis in XLMTM patients (Table 1 for a summary). For the 5 patients characterized here, we first detected *MTM1* defects by Western blotting and RT-PCR, prior to the identification of the mutation in 4 of them, by sequencing the RNA or the genomic DNA. Using these approaches, we validated several potential splice mutations and uncover a novel kind of disease-causing mutation for XLMTM, sequence exonisation.

We previously used specific myotubularin antibodies and immunoprecipitation to assess the level of myotubularin from cultured cell lines and showed that most of the mutations including missense correlate with a lower myotubularin level [30]. With these novel antibodies the enrichment step by immunoprecipitation is not required. They can be used for direct Western blotting to detect both exonic and non-exonic mutations and should be able to detect most patients using a variety of cell types and muscle tissue. Taken together the present study and published data, only two out of 22 different *MTM1* mutations tested did not correlate with a lower myotubularin level [30]. This was the case of the p.Ser376-Asn missense in patient 3 and of the in-frame deletion of the glycine at position 294. However, this approach does not provide information on the causative mutation. Indeed, for cells from patient 8 with no detectable myotubularin and no mRNA sequence abnormalities in fibroblasts, it is difficult to conclude between a non-exonic *MTM1* mutation that impacts on mRNA level or a mutation in another gene regulating *MTM1* expression. Nevertheless, Western blotting is useful to confirm the impact of splice muta-



**Fig. 3.** Intronic sequence exonisation in patient 4 cells. (A) Electropherograms of a region of intron 7 from control and patient 4 genomic DNA, showing an A to G transition indicated by a star. (B) The sequence variation is found within a conserved sequence in intron 7, when comparing human and mouse genomic sequences, numbered from the first base of intron 7. The intronic exonised sequence is underlined and the A to G transition in patient 4 is depicted. Note that a conserved donor splice consensus sequence is pre-existing while the transition A to G creates a sequence matching an acceptor splice site consensus. (C) Schematic representation of *MTM1* splicing at exons 7 and 8, in control (above) and patient 4 cells (below). Splice sites sequences are indicated; intronic and exonic sequences are in small and upper cases, respectively. The exonised sequence (exon 7' in patient 4) contains stop codons in all three frames.

tions, for example for patient 6, and can be used from cultured cells and muscle biopsies as a rapid approach to orient molecular diagnosis towards *MTM1* sequencing. Not all patients referred for *MTM1* testing may have XLMTM or any form of CNM. Myotubularin level is detectable in cells from 3 patients with *BIN1* mutations and 5 patients with *DNM2* mutations, linked to autosomal forms of CNM (unpublished). Further developments may address the use of circulating blood cells and ELISA or FACS analysis.

RT-PCR allowed the confirmation of intronic variant found by genomic DNA sequencing (for e.g. patient 5) and detect both exonic and intronic mutation, the later if they have an effect on splicing. Importantly, the specific mutation can be identified by sequencing the *MTM1* cDNA, allowing subsequent genetic counseling and pre-natal diagnosis.

In cells from patient 4, we detected the exonisation of a conserved intronic sequence. Such mutation mechanism was described for other diseases [34]. While RT-PCR analysis of *MTM1* was previously used efficiently to diagnose XLMTM [18,19], this study uncovered the first deep intronic mutation to our knowledge. In this case, a single point mutation was sufficient to create an acceptor site that activates a cryptic donor site. The high conservation of the exonised sequence and cryptic splice sites suggests that exon 7' may have been used but was lost during evolution both in human and mouse, and accumulated stop codons. Indeed, this mutation was not detectable by direct sequencing of exons and intron–exon junctions, the approach used in routine for diagnosis. While Western blotting oriented the diagnosis, RT-PCR analysis was necessary to confirm and characterize this mutation in *MTM1*.

This work underlies the importance of using Western blotting and RT-PCR analysis in addition to genomic DNA sequencing, as a number of XLMTM patients do have non-exonic *MTM1* mutations. Up to now, about 19% of intronic mutations were found in the *MTM1* gene. The vast majority were located in close proximity to the exons and detected by the routine sequencing of splice sites and coding exons. Our approach should allow the detection of deep intronic mutations that were not targeted by the routine sequencing; their proportion will be determined once this approach will be applied to a large cohort of patients. *MTM1* cDNA sequencing may replace genomic DNA analysis if cells are treated with puromycin to inhibit potential non-sense mRNA decay and allow the detection of premature stop codons, especially when applied to heterozygous female carrier. As female carriers also express a normal allele, puromycin treatment will be necessary to detect the mutated RNA in addition to the normal RNA. We propose that myotubularin detection and RNA analysis can be performed on suspected XLMTM patients prior to the classical exon sequencing, if cultured cells are available. This was the case for example in patients 6 and 7 for whom we first identified protein and RNA abnormalities before identifying the mutations. Concerning patients for whom the classical genomic DNA sequencing method did not identified an exonic mutation (as in patient 4), cells or muscle biopsies should be collected and myotubularin level and RNA integrity analyzed. In addition, such analysis can confirm the impact of intronic variants and thus the molecular diagnosis. These approaches should allow the molecular diagnosis of additional XLMTM patients.

#### Conflict of interest

None of the authors has any conflict of interest or financial disclosure to declare.

#### Acknowledgements

We thank Julie Kretz and Elodie Klein for technical assistance, Serge Vicaire and Ingrid Colas for DNA sequencing, and Jon Andoni

Urtizberea and Jean-Louis Mandel for help and support. Some cell lines were established by the Généthon DNA and Cell Bank (Evry, France). This study was supported by grants from the institute National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), University of Strasbourg (UdS), Collège de France, the Association Française contre les Myopathies (AFM), Fondation Recherche Médicale (FRM DEQ20071210538), Agence Nationale de la Recherche (ANR 06 MRAR 023) and the E-rare Program.

#### References

- [1] Jungbluth H, Wallgren-Petersson C, Laporte J. Centronuclear (myotubular) myopathy. *Orphanet J Rare Dis* 2008;3:26.
- [2] Pierson CR, Tomczak K, Agrawal P, Moghadaszadeh B, Beggs AH. X-linked myotubular and centronuclear myopathies. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005;64(7):555–64.
- [3] Bevilacqua JA, Bitoun M, Biancalana V, Oldfors A, Stoltenburg G, Claeys KG, et al. “Necklace” fibers, a new histological marker of late-onset *MTM1*-related centronuclear myopathy. *Acta Neuropathol* 2009;117(3):283–91.
- [4] Biancalana V, Caron O, Gallati S, Baas F, Kress W, Novelli G, et al. Characterisation of mutations in 77 patients with X-linked myotubular myopathy, including a family with a very mild phenotype. *Hum Genet* 2003;112(2):135–42.
- [5] Herman GE, Finegold M, Zhao W, de Gouyon B, Metzenberg A. Medical complications in long-term survivors with X-linked myotubular myopathy. *J Pediatr* 1999;134(2):206–14.
- [6] McEntagart M, Parsons G, Buj-Bello A, Biancalana V, Fenton I, Little M, et al. Genotype–phenotype correlations in X-linked myotubular myopathy. *Neuromuscul Disord* 2002;12(10):939–46.
- [7] Dahl N, Hu LJ, Chery M, Gilgenkrantz S, Nivelon-Chevallier A, Gouyon JB, et al. Myotubular myopathy in a girl with a deletion at Xq27–q28 and unbalanced X inactivation assigns the *MTM1* gene to a 600-kb region. *Am J Hum Genet* 1995;56:1108–15.
- [8] Kristiansen M, Knudsen GP, Tanner SM, McEntagart M, Jungbluth H, Muntoni F, et al. X-inactivation patterns in carriers of X-linked myotubular myopathy. *Neuromuscul Disord* 2003;13(6):468–71.
- [9] Tanner SM, Orstavik KH, Kristiansen M, Lev D, Lerman-Sagie T, Sadeh M, et al. Skewed X-inactivation in a manifesting carrier of X-linked myotubular myopathy and in her non-manifesting carrier mother. *Hum Genet* 1999;104(3):249–53.
- [10] Laporte J, Hu LJ, Kretz C, Mandel JL, Kioschis P, Coy JF, et al. A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast. *Nat Genet* 1996;13(2):175–82.
- [11] Al-Qusairi L, Weiss N, Toussaint A, Berbey C, Messaddeq N, Kretz C, et al. Tubule disorganization and defective excitation–contraction coupling in muscle fibers lacking myotubularin lipid phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(44):18763–8.
- [12] Dang H, Li Z, Skolnik EY, Fares H. Disease-related myotubularins function in endocytic traffic in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* 2004;15(1):189–96.
- [13] Dowling JJ, Vreede AP, Low SE, Gibbs EM, Kuwada JY, Bonnemann CG, et al. Loss of myotubularin function results in T-tubule disorganization in zebrafish and human myotubular myopathy. *PLoS Genet* 2009;5(2):e1000372.
- [14] de Gouyon BM, Zhao W, Laporte J, Mandel JL, Metzenberg A, Herman GE. Characterization of mutations in the myotubularin gene in twenty six patients with X-linked myotubular myopathy. *Hum Mol Genet* 1997;6(9):1499–504.
- [15] Herman GE, Kopacz K, Zhao W, Mills PL, Metzenberg A, Das S. Characterization of mutations in fifty North American patients with X-linked myotubular myopathy. *Hum Mutat* 2002;19(2):114–21.
- [16] Laporte J, Biancalana V, Tanner SM, Kress W, Schneider V, Wallgren-Petersson C, et al. *MTM1* mutations in X-linked myotubular myopathy. *Hum Mutat* 2000;15(5):393–409.
- [17] Laporte J, Guiraud-Chaumeil C, Vincent MC, Fardeau M, Samson F, Mandel JL. Mutations in the *MTM1* gene implicated in X-linked myotubular myopathy. ENMC International Consortium on Myotubular Myopathy. European Neuromuscular Center. *Hum Mol Genet* 1997;6(9):1505–11.
- [18] Tanner SM, Schneider V, Thomas NS, Clarke A, Lazarou L, Liechti-Gallati S. Characterization of 34 novel and six known *MTM1* gene mutations in 47 unrelated X-linked myotubular myopathy patients. *Neuromuscul Disord* 1999;9(1):41–9.
- [19] Tsai TC, Horinouchi H, Noguchi S, Minami N, Murayama K, Hayashi YK, et al. Characterization of *MTM1* mutations in 31 Japanese families with myotubular myopathy, including a patient carrying 240 kb deletion in Xq28 without male hypogonadism. *Neuromuscul Disord* 2005;15:245–52.
- [20] Laporte J, Blondeau F, Gansmuller A, Lutz Y, Vonesch JL, Mandel JL. The PtdIns3P phosphatase myotubularin is a cytoplasmic protein that also localizes to Rac1-inducible plasma membrane ruffles. *J Cell Sci* 2002;115(Pt. 15):3105–17.
- [21] Bitoun M, Maugeenre S, Jeannet PY, Lacene E, Ferrer X, Laforet P, et al. Mutations in dynam 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nat Genet* 2005;37(11):1207–9.

- [22] Nicot AS, Toussaint A, Tosch V, Kretz C, Wallgren-Pettersson C, Iwarsson E, et al. Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy. *Nat Genet* 2007;39(9):1134–9.
- [23] Jungbluth H, Zhou H, Sewry CA, Robb S, Treves S, Bitoun M, et al. Centronuclear myopathy due to a de novo dominant mutation in the skeletal muscle ryanodine receptor (RYR1) gene. *Neuromuscul Disord* 2007;17(4):338–45.
- [24] Tosch V, Rohde HM, Tronchere H, Zanoteli E, Monroy N, Kretz C, et al. A novel PtdIns3P and PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> phosphatase with an inactivating variant in centronuclear myopathy. *Hum Mol Genet* 2006;15(21):3098–106.
- [25] Jeannot PY, Bassez G, Eymard B, Laforet P, Urtizberea JA, Rouche A, et al. Clinical and histologic findings in autosomal centronuclear myopathy. *Neurology* 2004;62(9):1484–90.
- [26] Wallgren-Pettersson C, Clarke A, Samson F, Fardeau M, Dubowitz V, Moser H, et al. The myotubular myopathies: differential diagnosis of the X linked recessive, autosomal dominant, and autosomal recessive forms and present state of DNA studies. *J Med Genet* 1995;32:673–9.
- [27] Bitoun M, Bevilacqua JA, Prudhon B, Maugendre S, Taratuto AL, Monges S, et al. Dynamin 2 mutations cause sporadic centronuclear myopathy with neonatal onset. *Ann Neurol* 2007;62(6):666–70.
- [28] Nishino I, Minami N, Kobayashi O, Ikezawa M, Goto Y, Arahata K, et al. MTM1 gene mutations in Japanese patients with the severe infantile form of myotubular myopathy. *Neuromuscul Disord* 1998;8:453–8.
- [29] Tanner SM, Laporte J, Guiraud-Chaumeil C, Liechti-Gallati S. Confirmation of prenatal diagnosis results of X-linked recessive myotubular myopathy by mutational screening, and description of three new mutations in the MTM1 gene. *Hum Mutat* 1998;11(1):62–8.
- [30] Laporte J, Kress W, Mandel JL. Diagnosis of X-linked myotubular myopathy by detection of myotubularin. *Ann Neurol* 2001;50(1):42–6.
- [31] Buj-Bello A, Laugel V, Messaddeq N, Zahreddine H, Laporte J, Pellissier JF, et al. The lipid phosphatase myotubularin is essential for skeletal muscle maintenance but not for myogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(23):15060–5.
- [32] Laporte J, Guiraud-Chaumeil C, Tanner SM, Blondeau F, Hu LJ, Vicaire S, et al. Genomic organization of the MTM1 gene implicated in X-linked myotubular myopathy. *Eur J Hum Genet* 1998;6(4):325–30.
- [33] Kioschis P, Rogner UC, Pick E, Klauck SM, Heiss N, Siebenhaar R, et al. A 900-kb cosmid contig and 10 new transcripts within the candidate region for myotubular myopathy (MTM1). *Genomics* 1996;33(3):365–73.
- [34] Dehainault C, Michaux D, Pages-Berhouet S, Caux-Moncoutier V, Doz F, Desjardins L, et al. A deep intronic mutation in the RB1 gene leads to intronic sequence exonisation. *Eur J Hum Genet* 2007;15(4):473–7.

### **II. BIN1 : impact des mutations identifiées chez des patients atteints de myopathies centronucléaires autosomiques récessives**

**Publication 2: “Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy.”**

#### **A.Contexte de l'étude : l'état initial des connaissances sur les myopathies centronucléaires**

Trois formes de myopathies centronucléaires ont été décrites : une forme très sévère liée au chromosome X (mutations dans le gène MTM1), une forme intermédiaire autosomique récessive et une forme légère autosomique dominante (mutations dans le gène DNM2). A mon arrivée pour mon stage de master 2, aucun gène n'avait encore été identifié pour la forme intermédiaire autosomique récessive. Pourtant les phénotypes communs aux différentes formes de myopathies centronucléaires tels que la faiblesse musculaire généralisée, l'hypotonie et la présence de noyaux centraux dans les fibres musculaires des patients, suggéraient un mécanisme commun déficient pour ces trois formes. Ce mécanisme pourrait avoir un rapport avec le trafic membranaire, puisque MTM1 est localisée au niveau des endosomes précoces et tardifs et que la DNM2 est une protéine impliquée dans la fission des membranes.

Afin de pouvoir apporter un diagnostic génétique aux patients dont la transmission dans la famille est récessive et afin de pouvoir comprendre le mécanisme déficient, la recherche du gène impliqué dans la forme autosomique récessive présentait donc un intérêt majeur.

### **B. Question biologique : Impact des mutations dans le gène BIN1 sur la fonction cellulaire**

Afin d'identifier les gènes impliqués dans une maladie humaine, deux approches sont possibles. Soit par la méthode de clonage positionnel, qui consiste à repérer des marqueurs, tels que les microsatellites et les SNPs, dans de grandes familles comportant plusieurs personnes atteintes. On étudie alors la ségrégation des marqueurs par rapport à la maladie. Soit en utilisant la stratégie du candidat fonctionnel, la protéine recherchée pourrait alors avoir la même fonction que les autres protéines impliquées dans les CNM.

N'ayant pas la possibilité d'avoir d'assez grandes familles informatives pour pouvoir utiliser la technique de clonage positionnel, nous avons privilégié la technique du candidat fonctionnel afin d'identifier le gène impliqué dans la forme autosomique récessive des CNM. Les deux gènes impliqués dans la forme liée au chromosome X et la forme autosomique dominante des CNM sont impliqués dans le trafic membranaire et le remodelage des membranes. De plus, ces deux gènes ont un lien avec les phosphoinositides, puisque la myotubularine est une phosphatase à phosphoinositides et que la dynamine 2 est recrutée au niveau de membranes enrichies en phosphoinositides.

Parmi les gènes fonctionnels sélectionnés dans notre étude, le gène de l'amphiphysine 2/BIN1 paraissait être un très bon candidat. En effet, l'amphiphysine 2/BIN1 semble répondre à plusieurs critères. Tout d'abord l'amphiphysine 2 contient une isoforme musculaire spécifique : BIN1. Le produit de ce gène BIN1 est impliqué dans le trafic membranaire. En effet, il permet d'induire la tubulation de la membrane plasmique (Lee, Marcucci et al. 2002). De plus, cette isoforme spécifique du muscle squelettique est régulée par les phosphoinositides. Un autre avantage de cette famille de gène amphiphysine 2 est qu'elle est un interacteur de la dynamine 2 via leurs domaines SH3 et PRD respectivement.

### **C. Résultats**

Jocelyn Laporte et Anne Toussaint ont identifié trois mutations chez quatre patients de trois familles consanguines (Nicot, Toussaint et al. 2007). Deux de ces mutations induisent des changements d'acides aminés qui affectent le domaine N-BAR de la protéine BIN1,



## Résultats

---

p.K35N et p.D151N. Ce domaine N-BAR est impliqué dans le remodelage des membranes en permettant de sentir, de courber et finalement de tubuler les membranes. La dernière mutation est l'apparition d'un codon stop prématuré dans le domaine SH3 de la protéine, p.K575X. Ce domaine est responsable de l'interaction de l'amphiphysine 2/BIN1 avec des protéines qui comportent un domaine PRD telles que la dynamine 2. J'ai donc pu participer à l'étude de l'impact de ces mutations sur la fonction de la protéine.

Anne Sophie Nicot a montré que les mutations de BIN1 n'affectent pas le niveau de la protéine dans les lignées cellulaires de fibroblastes de patients. Ceci suggère que le phénotype des patients n'est pas du à une perte de la fonction de la protéine. Cependant, la mutation non-sens du domaine SH3 diminue fortement le recrutement de la dynamine 2, *in vitro*, par des expériences de GST « pull down » mais aussi *in vivo* par surexpression de BIN1 et de la dynamine 2 dans des cellules de mammifères en culture.

Cette mutation semble être responsable d'une perte de l'interaction de l'amphiphysine 2/BIN1 avec la dynamine 2. Cela suggère donc que cette mutation non-sens est responsable de la perte du lien fonctionnel entre ces deux protéines.

Parallèlement, Anne Toussaint a étudié l'impact protéique des mutants du domaine N-BAR et j'y ai également participé. BIN1 avait auparavant été montrée comme étant capable d'induire des tubules membranaires en surexpression dans des cellules de mammifères en culture (Lee, Marcucci et al. 2002). Nous avons montré que ces tubules membranaires sont absents ou fortement réduits lorsque les mutants du domaine N-BAR (p.K35N et p.D151N), identifiés chez les patients ARCNM sont surexprimés dans des cellules en culture. Ces mutations sont donc responsables d'une réduction de la fonction de tubulation des membranes de la protéine BIN1. Par contre, la tubulation des membranes ne semble pas affecter par la surexpression de la mutation non-sens du domaine SH3, p.K575X.

Ces résultats semblent en accord avec les anomalies des tubules-T observées par un clinicien sur une biopsie musculaire d'un patient ayant une mutation du domaine BAR et semblent donc confirmer l'implication du domaine BAR dans la fonction de tubulation membranaire de BIN1.

### **D. Ma contribution à l'étude**

Mon travail pour cette étude consistait à étudier de l'impact de mutations du gène BIN1 sur la fonction de la protéine et plus particulièrement sur la fonction de tubulation par le domaine BAR.

J'ai ainsi surexprimé dans des cellules COS en culture les différents variants identifiés chez les patients (du domaine N-BAR mais aussi du domaine SH3) ainsi que l'isoforme sauvage de BIN1. Puis j'ai comptabilisé les cellules qui présentaient des longs tubules, des petits tubules ou aucun tubule. Nous avons ainsi pu montrer que l'isoforme sauvage permettait d'induire principalement de longs tubules membranaires tout comme le mutant du domaine SH3, p.K575X. Tandis que les cellules surexprimant les mutants du domaine N-BAR, p.K35N et p.D151N, présentaient soit aucun tubule soit des petits tubules membranaires largement réduits par rapport à ceux formés par la surexpression de BIN1 sauvage.

En conclusion, nous avons montré que les mutants du domaine N-BAR perdaient leur capacité à induire des tubules membranaires de grandes tailles.

### **E. Conclusion de l'étude**

Grâce à la sélection de gène candidat fonctionnel, nous avons identifié le premier gène impliqué dans la forme autosomique récessive des myopathies centronucléaires : BIN1. Ces résultats permettent aujourd'hui de proposer un diagnostic moléculaire aux patients atteints d'ARCNM. L'identification de ce gène permet aussi de mieux comprendre les défauts physiologiques induits par les mutations, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives pour le traitement de ces maladies invalidantes en contrecarrant ces défauts.

Par contre, le peu de patients mutés dans BIN1 (trois familles identifiées sur 55 testées) dans la forme autosomique récessive suggère que d'autres gènes pourraient être impliqués dans ces formes et donc que BIN1 ne serait pas le seul gène à l'origine de la pathologie.



## Résultats

---

Sur le plan moléculaire et cellulaire, nous avons ainsi proposé que les mutations de BIN1 chez les patients atteints d'ARCNM pouvaient amener à une perte de la tubulation des membranes et donc à un défaut de structure des tubules-T ou encore à une perte de l'interaction fonctionnelle entre BIN1 et la dynamine 2. Il paraît cependant étonnant qu'aucune mutation dans le domaine PI, spécifique du muscle squelettique, n'ait été découverte. Pourtant ce domaine semble jouer un rôle très important pour la fonction de BIN1 dans le muscle puisqu'il permet de réguler la conformation de la protéine et qu'il permet de concentrer la protéine aux membranes en liant le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>.

De plus cette étude a permis, pour la première fois, de mettre en évidence un lien direct entre deux formes de myopathies centronucléaires puisque BIN1, mutée dans la forme ARCNM, interagit avec la dynamine 2, mutée dans la forme ADCNM. Cependant, le lien entre ces deux protéines et la myotubularine reste encore à être identifié.

Enfin, nos résultats ainsi que d'autres études menés au sein de l'équipe suggèrent que des défauts dans le mécanisme de formation des tubules-T ou de remodelage des membranes dans la voie d'endocytose dans le muscle squelettique pourraient expliquer les phénotypes pathologiques observés dans les CNM (Al-Qusairi, Weiss et al. 2009).

**Publication 2 :**

**« Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy. »**

Nicot AS, Toussaint A, Tosch V, Kretz C, Wallgren-Pettersson C, Iwarsson E, Kingston H, Garnier JM, Biancalana V, Oldfors A, Mandel JL, Laporte J.

Nat Genet. 2007 Sep; 39(9):1134-9.

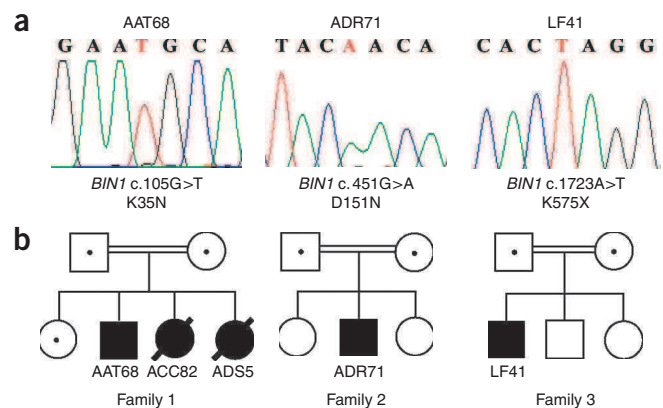
# Mutations in amphiphysin 2 (*BIN1*) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy

Anne-Sophie Nicot<sup>1,7</sup>, Anne Toussaint<sup>1,7</sup>, Valérie Tosch<sup>1</sup>, Christine Kretz<sup>1</sup>, Carina Wallgren-Pettersson<sup>2</sup>, Erik Iwarsson<sup>3</sup>, Helen Kingston<sup>4</sup>, Jean-Marie Garnier<sup>1</sup>, Valérie Biancalana<sup>5</sup>, Anders Oldfors<sup>6</sup>, Jean-Louis Mandel<sup>1,5</sup> & Jocelyn Laporte<sup>1</sup>

Centronuclear myopathies are characterized by muscle weakness and abnormal centralization of nuclei in muscle fibers not secondary to regeneration. The severe neonatal X-linked form (myotubular myopathy) is due to mutations in the phosphoinositide phosphatase myotubularin (*MTM1*)<sup>1</sup>, whereas mutations in dynamin 2 (*DNM2*) have been found in some autosomal dominant cases<sup>2</sup>. By direct sequencing of functional candidate genes, we identified homozygous mutations in amphiphysin 2 (*BIN1*) in three families with autosomal recessive inheritance. Two missense mutations affecting the BAR (Bin1/amphiphysin/RVS167) domain disrupt its membrane tubulation properties in transfected cells, and a partial truncation of the C-terminal SH3 domain abrogates the interaction with *DNM2* and its recruitment to the membrane tubules. Our results suggest that mutations in *BIN1* cause centronuclear myopathy by interfering with remodeling of T tubules and/or endocytic membranes, and that the functional interaction between *BIN1* and *DNM2* is necessary for normal muscle function and positioning of nuclei.

Centronuclear myopathies (CNMs) have been divided into three forms: the X-linked form (OMIM 310400) with severe hypotonia at birth; autosomal recessive forms with onset of weakness in infancy or early childhood with or without ophthalmoparesis (OMIM 255200); and a dominant form that usually appears in adulthood and is slowly progressive (OMIM 160150)<sup>3–5</sup>. Myotubularin dephosphorylates a subclass of phosphoinositides important for endocytosis and is probably involved in membrane trafficking<sup>6,7</sup>, suggesting that CNMs arise from membrane trafficking defects. Identification of mutations in the gene encoding dynamin 2 in individuals with the dominant

form has supported this hypothesis, as dynamin 2 is a large GTPase with important roles in endocytosis, membrane trafficking, actin assembly and centrosome function<sup>2,8</sup>. In a sporadic CNM case with childhood onset, we have reported an inactivating variant affecting a

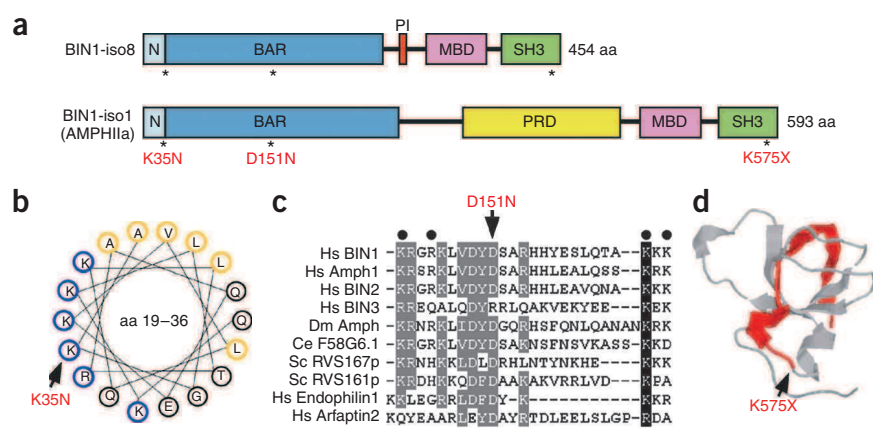


**Figure 1** *BIN1* mutations in patients with recessive centronuclear myopathy. (a) Chromatograms from index cases. Homozygous mutations are in red, numbered based on the reference sequence of *BIN1* isoform 1 (593 amino acid residues in length). These mutations lead to two amino acid changes (K35N and D151N) and one premature stop codon (K575X). (b) Pedigrees of consanguineous families 1–3 (with first-cousin consanguineous parents). Dots indicate heterozygous carriers; filled squares and circles, affected individuals. Except for ADS5 (for whom DNA was not available), all affected individuals are homozygous for the variants. The healthy sister of AAT68 is heterozygous for the K35N variant, and the healthy sisters of ADR71 do not carry the D151N variant; DNA was not available for the healthy brother and sister of LF41.

<sup>1</sup>Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Department of Molecular Pathology, F-67400 Illkirch, France; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U596, F-67400 Illkirch, France; the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR7104, F-67400 Illkirch, France; Université Louis Pasteur, F-67000 Strasbourg, France; and Collège de France, Chaire de Génétique Humaine, F-67400 Illkirch, France. <sup>2</sup>Department of Medical Genetics, University of Helsinki, and The Folkhälsan Institute of Genetics, Biomedicum, FIN-00014 Helsinki, Finland. <sup>3</sup>Clinical Genetics Unit, Department of Molecular Medicine and Surgery, Karolinska University Hospital, S-171 76 Stockholm, Sweden. <sup>4</sup>Academic Unit of Medical Genetics and Regional Genetic Service, Central Manchester and Manchester Children's University Hospitals, Manchester M13 0JH, UK. <sup>5</sup>Laboratoire de Diagnostic Génétique, CHRU-Faculté de Médecine et Laboratoire de Génétique Médicale EA3949, Université Louis Pasteur, Strasbourg F-67085, France. <sup>6</sup>Department of Pathology, Sahlgrenska University Hospital, SE-413 45 Göteborg, Sweden. <sup>7</sup>These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to J.L. (mtm@igbmc.u-strasbg.fr).

Received 23 December 2006; accepted 31 May 2007; published online 5 August 2007; doi:10.1038/ng2086

**Figure 2** Localization of amino acid changes in BIN1. **(a)** Protein domains of BIN1 isoforms. N, N-terminal amphipathic helix; BAR, BIN1/Amphiphysin/Rvs167; PI, phosphoinositide-binding domain, corresponding to a polybasic residue sequence encoded by exon 11; PRD, proline-rich domain binding to clathrin and AP-2; MBD, Myc-binding domain; SH3, Src homology 3. The muscle-specific BIN1 isoform 8 lacks the PRD present in the brain-enriched BIN1-iso1 (AMPHIIa) and contains an additional PI domain. Positions of the residues affected by mutations are indicated with asterisks. **(b)** Helical wheel projection of amino acid (aa) residues 19–36 of BIN1 showing the presence of an amphipathic helix and a stretch of polybasic residues (nonpolar residues in orange, basic residues in blue). There are thus two stretches of polybasic residues, one located on one side of the N-terminal amphipathic helix and the second encoded by exon 11.

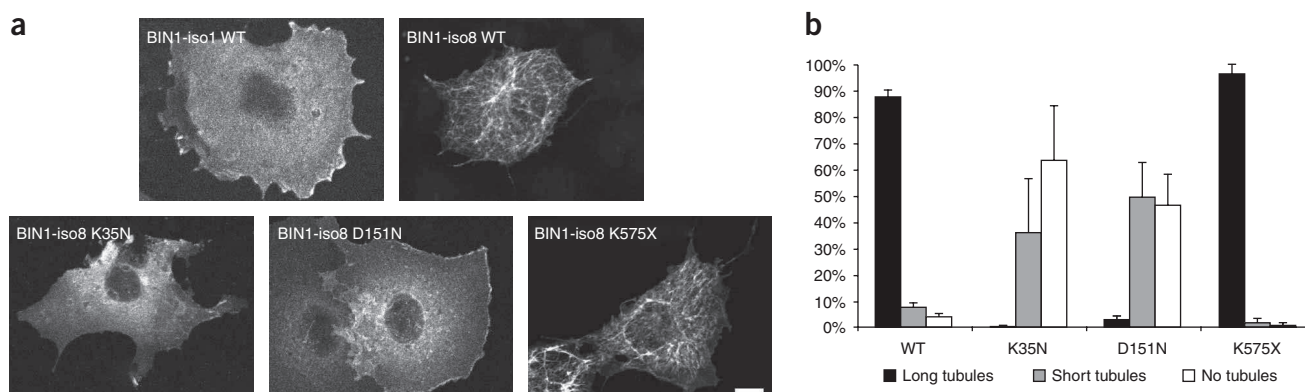


new phosphoinositide phosphatase, hJUMPY, which shares the same substrate specificity as myotubularin<sup>9</sup>.

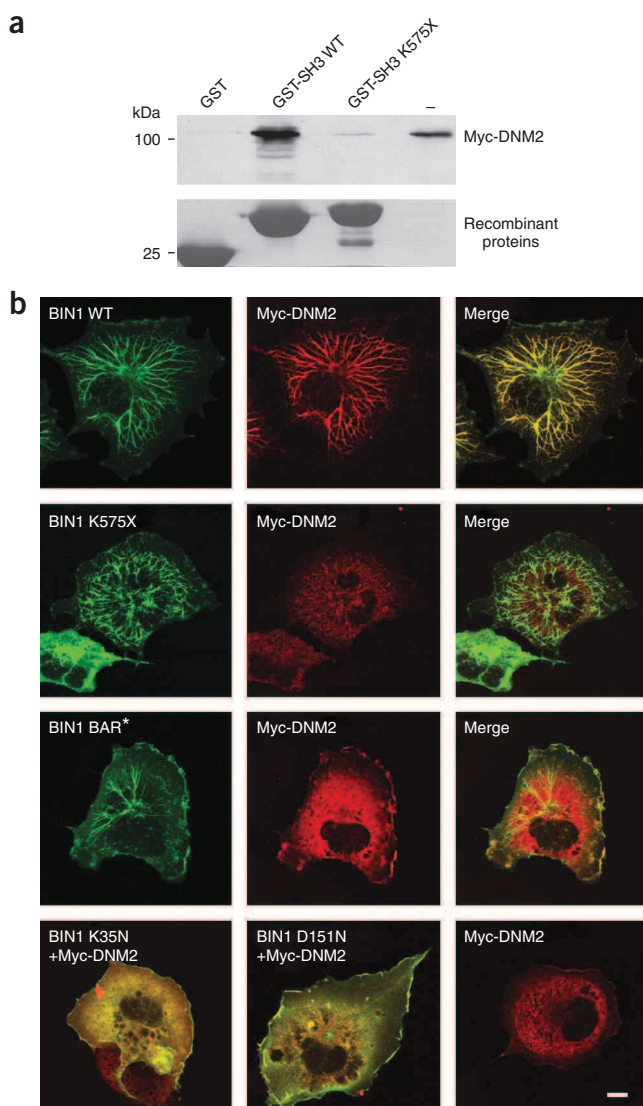
Thus far, the gene(s) implicated in recessive CNM have not been identified or even localized. As the lack of large families precluded positional cloning, we directly sequenced functional candidate genes in a panel of individuals with CNM, based on the assumption that implicated proteins have cellular functions related to myotubularin. BIN1 seemed to be a good candidate, as it is involved in membrane remodeling, is regulated by phosphoinositides<sup>10</sup> and has a role in the organization of T tubules<sup>11</sup>, which are thought to be altered in X-linked myotubular myopathy (XLMTM)<sup>12</sup>; in addition, defects of the *Drosophila melanogaster* ortholog lead to skeletal muscle alterations<sup>13</sup>. The *BIN1* gene encompasses 20 exons, some of which are alternatively spliced, leading to at least ten different isoforms<sup>14–16</sup>. We refer to the largest isoform, AMPHIIa, as BIN1-iso1, and to the muscle-specific M-amphiphysin isoform as BIN1-iso8.

Our collection of individuals with CNM includes families with probable recessive inheritance (offspring of consanguineous parents), sporadic cases and severe cases initially thought to have XLMTM but

lacking *MTM1* mutations (Supplementary Note online). All showed centralization of nuclei in muscle fibers. Direct sequencing of *BIN1* in samples from 55 affected individuals showed three homozygous variants in four affected individuals from three consanguineous families (Fig. 1; see also Supplementary Tables 1 and 2 online for primer sequences and the observed polymorphisms). The three variants, which include two amino acid changes (K35N and D151N) and a premature stop codon (K575X), were present in the homozygous state in all affected individuals tested within these families, whereas parents were heterozygous, and unaffected relatives were heterozygous or did not carry the variants (Fig. 1). These variants were absent in at least 280 genomic DNA samples from unaffected controls, including controls of the same geographic origin, and we confirmed that *MTM1* and *DNM2* were not mutated in these families by direct sequencing of exons and intron-exon boundaries. By whole-genome SNP analysis using DNA microarrays, we confirmed that affected individuals AAT68 and ADR71 were homozygous for the chromosomal region 2q14, where *BIN1* is located (Supplementary Fig. 1 online). Affected individual LF41 did not show a large



**Figure 3** *Ex vivo* membrane tubulation assays. COS-1 cells were transfected with cDNA constructs encoding BIN1-iso1, wild-type (WT) BIN1-iso8 or mutant BIN1-iso8. Overexpressed BIN1-iso1 was detected with C99D, and BIN1-iso8 constructs were fused to GFP. Constructs encoding wild-type BIN1-iso8 and BIN1-iso8 with the K575X change induce membrane tubulation, contrary to BIN1-iso1 and BAR domain mutants. **(a)** Representative images from confocal projections. Scale bar: 10 μm. **(b)** Quantification of three independent experiments. For each construct, we show the percentage of cells with long tubules (as in BIN1-iso8 wild-type in a), short tubules (with lengths of no more than about four times their width) or no tubules at all. At least 100 cells were assessed per experiment. Error bars indicate s.e.m.



**Figure 4** Dynamin 2–BIN1 interaction and recruitment to membrane tubules. **(a)** Interaction of dynamin 2 (DNM2) with the BIN1 SH3 domain. GST-tagged recombinant BIN1 SH3 domain proteins were used to pull down Myc-tagged dynamin 2 overexpressed in COS-1 cells. Lane marked “-” shows the crude cell extract before pull-down. Upper panel: protein blot hybridized with anti-Myc; lower panel: Coomassie staining of the recombinant proteins from the same acrylamide gel. The deleted GST-SH3 K575X recombinant protein migrates higher than the wild-type protein; their integrity was confirmed by peptide mass fingerprinting. Representative images of three different experiments are shown. **(b)** Dynamin 2 recruitment to BIN1-iso8-induced membrane tubules. COS-1 cells were transfected with Myc-tagged dynamin 2 and different GFP-tagged BIN1 constructs: wild-type and mutated full length BIN1-iso8 and wild-type BAR\* (amino acids 1–282, containing the phosphoinositide binding domain of exon 11 but lacking the SH3 domain). Dynamin 2 localization was detected with anti-Myc. Dynamin 2 recruitment to the membrane tubules induced by BIN1-iso8 was dependent on a wild-type SH3 domain. The bottom panel shows merged images of cells expressing DNM2 together with BAR domain mutants or dynamin 2 alone. Confocal single scan images are representative of several experiments. Scale bar, 10  $\mu$ m.

BIN1 protein domains are implicated in membrane tubulation and in protein–lipid and protein–protein interactions (Fig. 2). An N-terminal amphipathic helix is believed to insert into the plasma membrane and create curvature, and the BAR domain homodimerizes to form a banana shape that is able to sense and maintain the curvature<sup>17,18</sup>. The C-terminal SH3 domain mediates interactions with numerous proteins such as synaptojanin and dynamin. All isoforms have the BAR and SH3 domains and also a Myc-binding domain<sup>19,20</sup>. In addition, the neuronal isoforms have a clathrin- and AP-2-binding domain, and the so-called muscle-specific BIN1-iso8 has a polybasic residue sequence binding to phosphoinositides, located C-terminal of the BAR domain<sup>10,11</sup>.

Helical wheel projection of amino acid residues 19–36 suggested the presence of an amphipathic helix together with a stretch of polybasic residues. The latter may represent a new domain of interaction with negatively charged lipids N-terminal of the BAR domain (Fig. 2). The K35N missense change is predicted to alter the charge of this polybasic sequence, suggesting that it may lead to a defect in membrane curvature. The D151N missense change alters a residue conserved through evolution down to the yeast amphiphysin-like proteins, and in other BAR domains, and replacement of the four flanking residues has been shown to strongly reduce liposome tubulation<sup>18</sup>. Finally, we predicted that the K575X change removes the last alpha-helix and two beta-strands of the SH3 domain, a region highly conserved through evolution and implicated in the three-dimensional (3D) structure of the domain<sup>21</sup>. A missense mutation affecting a phenylalanine residue in this region, corresponding to F588, was sufficient to decrease the binding to dynamin<sup>21</sup>.

To test the impact of the mutations found in individuals with CNM, we monitored the membrane tubulation properties of wild-type and mutated BIN1 in cells and assessed binding to dynamin 2. As already described, overexpressed BIN1-iso8 was capable of tubulating membranes *ex vivo* (Fig. 3 and ref. 11). Introduction of the missense mutations found in families 1 and 2 abolished membrane tubulation (Fig. 3). As expected, the K575X change did not affect membrane tubulation. Dynamin 1 is well known to interact with the SH3 domain of amphiphysin 1 in the brain, and dynamin 2 also interacts with BIN1 (ref. 10). The SH3 domain of BIN1 was able to pull down dynamin 2 overexpressed in COS cells, and introduction of the premature stop codon K575X found in family 3 clearly weakened the binding (Fig. 4a). Taken together, these data show that mutations found in individuals with CNM have a strong impact on various functions of BIN1.

homozygous region at 2q14, although he has a homozygous mutation in *BIN1*, and we did not find a *BIN1* variant in the unrelated consanguineous affected individual ABJ25, who showed homozygosity not only at 2q14 but also at other chromosome regions. Our data also point to the heterogeneity of recessive CNM, as we found mutations in only 3 out of 12 families with some documentation of recessive inheritance.

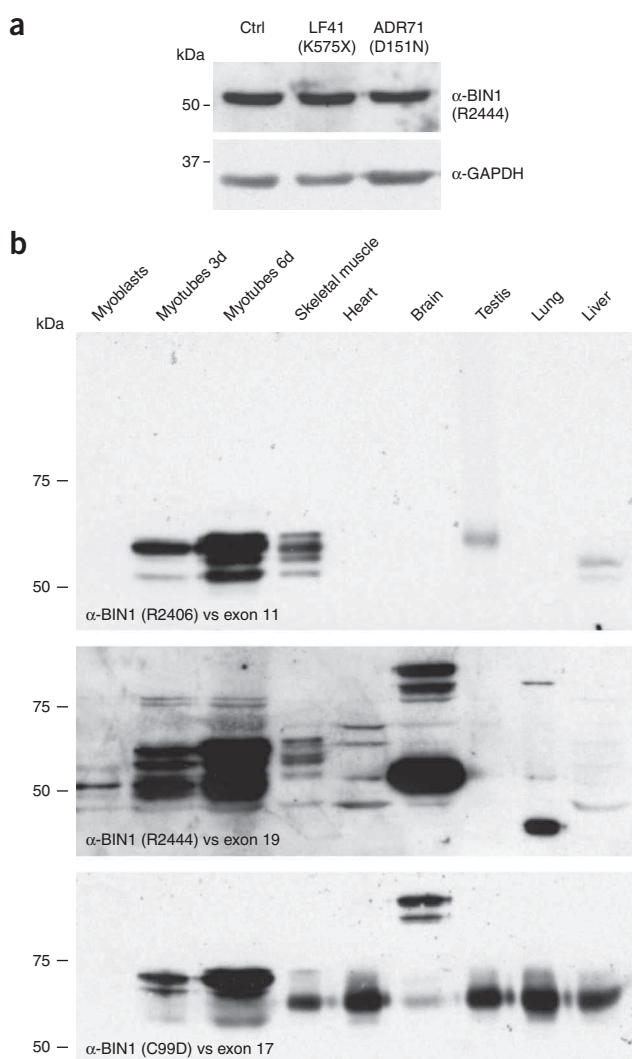
All affected individuals with mutations had the typical CNM muscle histology, showing numerous fibers with central nuclei (data not shown). Onset of the disease ranged from birth to childhood; three out of five affected individuals are still alive, showing mild, proximal, slowly progressive muscle weakness, and unlike in the X-linked severe form of the disease, assisted ventilation was not needed (Supplementary Table 3 online). The phenotype of these individuals is thus intermediate between the X-linked and dominant forms; individual LF41, carrying the K575X change leading to a premature stop codon, seems to be the most severely affected. Affected individuals from family 1 showed mild to severe congenital contractures. Apart from underdevelopment of both frontal lobes in ACC82, possibly linked to intrauterine growth retardation, we did not observe any effects in other tissues besides muscle, and there was no cognitive impairment.



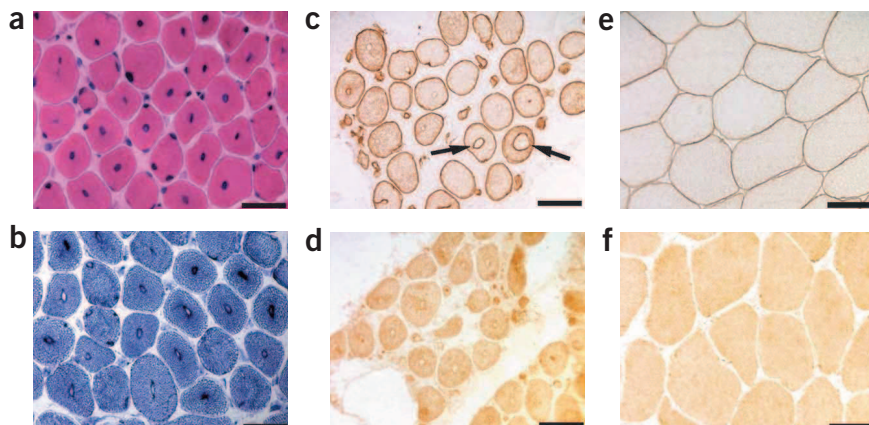
**Figure 5** BIN1 expression in normal and pathological conditions. (a) BIN1 protein expression in fibroblast cell lines from individuals LF41 and ADR71 and from a control. No cells were available for the K35N change. BIN1 was detected with antibody R2444 directed against the n-Src loop of the SH3 domain, and GAPDH was used as an internal loading control. (b) Mouse Bin1 expression and isoforms in mouse C2C12 muscle cells during differentiation (myoblasts, 3 d and 6 d after the start of differentiation into myotubes) and in mouse tissues. Bin1 was detected with antibody R2406 directed against exon 11, antibody R2444 against exon 19 and antibody C99D against exon 17. Equal loading was monitored by Ponceau red and Coomassie staining. Note the presence of at least four isoforms encompassing the polybasic residue sequence of exon 11 in skeletal muscle.

Notably, dynamin 2 mutations cause dominant CNM<sup>2</sup>, and our present work implicates mutations in *BIN1* in recessive CNM. Thus, we tested the recruitment of dynamin 2 to the membrane tubules induced by overexpression of BIN1-iso8. With wild-type constructs, we noted a marked recruitment of dynamin 2 (Fig. 4b and ref. 11). This recruitment was dependent on the SH3 domain, as the construct BIN BAR\* lacking this domain was able to tubulate membranes but did not recruit dynamin 2. Whereas K35N and D151N did not induce tubulation, the K575X mutant induced membrane tubulation but was not able to efficiently recruit dynamin 2 to these tubules (Fig. 4b). Our results suggest that mutations in *BIN1* found in individuals with CNM cause a loss of the functional link with dynamin 2.

Loss of BIN1 expression is a common feature in malignant cells. In particular, *BIN1* is widely downregulated or misspliced in cancers of the breast, prostate, colon, brain and other organs<sup>20,22–24</sup>. Moreover, *Bin1* knockout mice show perinatal death associated with cardiomyopathy<sup>25</sup>. However, neither cardiac dysfunction nor cancer history were noted in the three individuals with CNM still alive. The selective and highly specific skeletal muscle phenotype that is observed in the three families with *BIN1* mutations contrasts with these previously published data. We propose that this observation is due to a combination of two factors: (i) the mutations elicit only a partial loss of function, and (ii) BIN1 has an important role in skeletal muscle that may be sensitive to mutations whose effects can be compensated for in other tissues. Indeed, we have observed that the D151N and K575X changes do not have a detectable impact on the expression of BIN1 protein in affected individuals' fibroblasts (Fig. 5a). The nonsense K575X change occurs in the last exon of the gene; this does not lead to nonsense-mediated mRNA decay and truncates only the 19 most C-terminal



amino acid residues. Second, expression analysis of Bin1 in mouse tissues with three different antibodies showed that its expression and the number of isoforms present increased with muscle cell differentiation (from myoblasts to myotubes), supporting an important role for



**Figure 6** Biopsy from the deltoid muscle of individual ADR71. (a) Centrally located nuclei are present in virtually every fiber (see by hematoxylin-eosin staining). (b) NADH-tetrazolium reductase staining, demonstrating that centrally located nuclei are surrounded by a rim of densely stained material. Radial organization of the sarcoplasmic reticulum, a hallmark of dominant CNM with *DNM2* mutations, was not present. (c) Immunostaining of caveolin 3, showing positive immunoreactivity associated with centrally located vacuoles in some fibers (arrows). Numerous fibers showed increased caveolin 3 immunoreactivity associated with the intermyofibrillar network. (d) Immunostaining of the T tubule marker dihydropyridine receptor- $\alpha$  (DHPR $\alpha$ ), demonstrating marked immunoreactivity around centrally located nuclei. (e, f) Caveolin 3 (e) and DHPR $\alpha$  immunoreactivity in control muscle. Scale bar, 20  $\mu$ m.

it in skeletal muscle, consistent with previous studies (Fig. 5b and refs. 11,14,26). We detected at least four muscle isoforms containing exon 11; only isoform 8 had been previously characterized, suggesting the existence of additional muscle-specific isoforms (Fig. 5b).

A few studies have reported that BIN1 is implicated in the organization of T tubules<sup>11,13</sup>, a specialized membrane structure involved in excitation-contraction coupling<sup>27</sup>. Immunostaining of a muscle biopsy from individual ADR71 (with the D151N change) using markers associated with T tubules during development or in mature muscle showed increased caveolin 3 and DHPR $\alpha$  labeling inside the fibers and abnormal caveolin 3-positive vacuoles (Fig. 6). We hypothesize that perturbation of T tubule biogenesis and/or endocytic membranes by mutations in *BIN1* could be the primary cause of the muscle pathology in CNM. The most obvious pathological feature in CNM is the central location of nuclei. This does not seem to be related to a previously hypothesized defect in muscle maturation, because in the mouse model for XLMTM, the skeletal muscle fibers have subsarcolemmal nuclei at birth, whereas CNM pathology appears later<sup>28</sup>; however, this has not yet been confirmed in humans with CNM. Either nucleus centralization is a secondary consequence of abnormalities in membrane remodeling, or myotubularin, dynamin 2 and BIN1 have an independent role in the maintenance of skeletal muscle fiber organization and, in particular, positioning of nuclei.

## METHODS

**Mutation screening and haplotype analysis.** Exonic coding sequence and exon-intron boundaries for *BIN1*, *MTM1* and *DNM2* were sequenced after PCR amplification of genomic DNA using intronic primers<sup>1,2</sup> (Supplementary Table 1 online for *BIN1*). We observed segregation of the mutations in family members by direct sequencing of exons 2, 6 or 20. We checked for the absence of the variants in control DNA from nonmyopathic individuals by denaturing HPLC (exons 2 and 20) or by direct sequencing (exon 6). PCR products were purified using Multiscreen HTS 96-wells plates (Millipore) and were analyzed with an ABI PRISM BigDye Terminator cycle using a 3130XL genetic analyzer (Applied Bioscience). For whole-genome haplotype analysis, subjects' genomic DNA was hybridized to Affymetrix 10K SNP arrays according to the manufacturer's instructions, and loss of heterozygosity was analyzed with GeneChip DNA Analysis and Chromosome Copy Number Analysis software (Affymetrix).

**Amino acid sequence analysis.** We used CLUSTAL\_X<sup>29</sup> for amino acid alignment of the following proteins: human BIN1, AMPH1, BIN2, BIN3, *Drosophila melanogaster* amphiphysin, *Caenorhabditis elegans* amphiphysin, *Saccharomyces cerevisiae* RVS167p and RVS161p and human endophilin 1 and arfaptin 2.

**cDNA constructs.** cDNAs corresponding to BIN1-iso8 (454 amino acid residues long), BIN1 BAR\* (residues 1–282) and BIN1 SH3 domain (residues 497–593) were gifts (see Acknowledgments), and cDNA corresponding to BIN1-iso1 (AMPH1a, 593 residues long) was obtained from the Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung (clone DKFZp547F068Q). The dynamin 2 cDNA, obtained from Geneservice (IMAGE clone 5722134), was cloned into a pENTR1A Gateway entry vector (Invitrogen) and recombined into the pTL1 destination vector, a derivative of the pSG5 vector<sup>30</sup>, for C-terminal Myc-His tag fusion. Mutations were introduced by primer-directed PCR mutagenesis, and all constructs were verified by sequencing. For GST pull-down, cDNAs cloned into the pGEX-2T vector (GE Healthcare) were used to produce the relevant proteins with N-terminal GST tags. For eukaryotic cell transfection, BIN1-iso8 cDNA was cloned into pEGFP-C1 (Clontech) and overexpressed as an N-terminally EGFP-tagged protein, and BIN1-iso1 was cloned into pCDNA3.1 (Invitrogen) and overexpressed without any protein tag.

**Expression analysis.** Two rabbit antibodies were generated: R2406 antibodies raised against a peptide corresponding to exon 11 of BIN1

(RKSKLFSRLRRKKN) and R2444 antibodies raised against the n-src loop of the SH3 domain in exon 19 (peptide VIPFQNPEEQDEG). Sera were purified on peptide-coupled SulfoLink columns (Pierce) and were validated on COS-1 cells transfected with BIN1 isoforms and using peptide competition. Mouse monoclonal antibody C99D (Upstate) is directed against the Myc-binding domain in exon 17.

After obtaining informed consent from participants, and using procedures approved by the Regional Ethical Review Board in Gothenburg and the North Manchester Research Ethics Committee, we cultured control and CNM fibroblasts from their skin biopsies in DMEM containing 1g/l glucose, supplemented with 10% FCS and 40 mg/l gentamicin (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Proteins were extracted with TGEK50 buffer (50 mM Tris (pH 7.8), 10% glycerol, 1 mM EDTA, 50 mM KCl) with 0.1% SDS, 2% Triton and a cocktail of protease inhibitors (PIC) containing 2.5  $\mu$ g/ml of each of the following: leupeptin (Euromedex), pepstatin A (Euromedex), aprontin (Euromedex), antipain (Chemicon) and chymostatin (Sigma). We boiled 30  $\mu$ g of each protein in loading buffer (8% SDS, 0.4 M DTT, 240 mM Tris pH 6.8, 0.004% bromophenol blue, 40% glycerol) and subjected them to electrophoresis on an 8% SDS-polyacrylamide gel. Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes that were blocked with 3% BSA in PBS with 0.1% Tween-20 and incubated with R2444 antibody for 2 h. For detection, we used secondary antibody coupled with HRP with Supersignal Substrate (Pierce), followed by autoradiography.

Total proteins were extracted from skeletal muscle, heart, brain, testis, lung and liver of adult mice and from C2C12 cells at several differentiation stages. Undifferentiated C2C12 cells were cultured in DMEM containing 1g/l glucose supplemented with 20% FCS and 40 mg/l gentamicin. Differentiation of myoblasts into myotubes was induced at 80% confluence by addition of DMEM containing 1g/l glucose supplemented with 5% horse serum (HS) and 40 mg/l gentamicin. Cells or tissues were incubated for 5 min on ice in 10 mM NaHCO<sub>3</sub> and 2 mM CaCl<sub>2</sub> supplemented with PIC. Cells were scraped and tissues crushed in an Ultra Thurax homogenizer, and an equal volume of a second solution (500 mM sucrose, 300 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 60 mM histidine, pH 7.4) was added. After centrifugation (500g, 20 min, 4 °C), the total protein extracts were separated on a 10% SDS-polyacrylamide gel and were transferred onto nitrocellulose membranes that were blocked with 5% nonfat dry milk in TBS-T buffer (TBS plus 0.1% Tween-20). Membranes were incubated with primary antibodies for 1 h for the polyclonal antibody to BIN1 (R2406; 1:10,000) or 2 h for the polyclonal antibody to BIN1 (R2444; 1:400) and for the monoclonal antibody to BIN1 (C99D from Upstate; 1:200) in TBS-T buffer containing 5% nonfat dry milk. Secondary antibodies (anti-rabbit horseradish peroxidase (HRP) or anti-mouse HRP, Jackson ImmunoResearch) were incubated for 1 h.

**Pull-down assays.** Whole-cell extracts from COS-1 cells transfected with Myc-DNM2 were obtained by lysis with a buffer containing 20 mM HEPES-NaOH pH 7.4, 300 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 10% glycerol, 4 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM sodium orthovanadate and PIC. Extracts were passed through a 25G needle five times to disperse aggregates, and insoluble material was removed by centrifugation at 10,000g for 10 min. GST fusion proteins were expressed in *Escherichia coli* strain CodonPlus BL21. Bacteria were lysed by sonication in lysis buffer (PBS with 2 mM EDTA and PIC) and then centrifuged at 10,000g for 10 min. GST fusion proteins were purified from bacterial lysates by incubation with glutathione Sepharose 4B beads (GE Healthcare) in lysis buffer with 1% Triton for 2 h followed by extensive washing with PBS plus 1 mM EDTA, 300 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1% Tween-20 and PIC (pH 7.3). We then incubated 2.5 mg of the purified fusion proteins coupled to glutathione beads for 6 h with transfected COS-1 cell extracts (prepared as described above). After washing beads three times with a buffer containing 20 mM HEPES, 400 mM NaCl, and 1 mM DTT (pH 7.3), we analyzed 5  $\mu$ l of the beads (300  $\mu$ g of GST-fused proteins bound to the beads) by electrophoresis on an 8% SDS-polyacrylamide gel. Bound dynamin 2 was detected by a monoclonal antibody to Myc, 9E10 (1:1,000; IGBMC). The entire procedure was carried out at 4 °C.

**Ex vivo tubulation and subcellular localization.** COS-1 cells were grown in DMEM containing 1g/l glucose supplemented with 5% FCS and 40 mg/l



gentamicin. Cells were grown on 22-mm<sup>2</sup> cover slips and were transfected at 80% confluence with 1 µg of DNA constructs using the Eugene-6 reagent, following the manufacturer's instructions (Roche). Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min and then washed in PBS. For immunolabeling, cells were subsequently permeabilized in PBS with 0.2% Triton X-100 and washed with PBS. Nonspecific sites were blocked in PBS with 10% FCS and 0.1% Triton X-100.

The subcellular localization of proteins was assessed by incubation for 1 h with monoclonal antibodies diluted in PBS with 3% FCS and 0.1% Triton X-100. BIN1-iso1 was detected with an antibody to BIN1 (C99D, Upstate) diluted at 1:200; Myc-DNM2 was detected with an antibody to Myc (9E10; IGBMC) diluted at 1:400. After washing with PBS with 0.1% Triton X-100, we detected immunostaining by incubation for 45 min with a Cy3 mouse secondary antibody. Fluorescence was examined with a Leica SP2-AOBS confocal microscope. Pictures were processed with Tcstk software (Jean-Luc Vonesch, IGBMC) and edited using Dvrtk software (Jean-Luc Vonesch, IGBMC) and Photoshop 7.0 (Adobe).

**Immunohistochemistry.** Cryostat sections of fresh frozen skeletal muscle (8 µm thick) were incubated with an antibody to caveolin 3 (A-3) (Santa Cruz Biotechnology) diluted 1:1,000 in 1% BSA or with antibody to dihydropyridine receptor-α (DHPRα) (Abcam) diluted 1:3,000 in 1% BSA. Immunoreactivity was visualized by Novolink Polymer Detection System (Novocastra).

**Accession numbers.** GenBank: *BIN1* isoform 1 mRNA, NM\_139343; *BIN1* isoform 1 protein, NP\_647593; *BIN1* isoform 8 mRNA, NM\_004305; *BIN1* isoform 8 protein, NP\_004296; human *BIN1*, O00499; amphiphysin 1, P49418; *BIN2*, Q9UBW5; *BIN3*, Q9NQY0; *Drosophila melanogaster* amphiphysin, Q7KLE5; *Caenorhabditis elegans* amphiphysin, Q21004; *Saccharomyces cerevisiae* RVS167p, P39743; *S. cerevisiae* RVS161p, P25343; human endophilin 1, Q99962; human arfapatin 2, P53365. Protein Data Bank: three-dimensional structure of the rat Bin1 SH3 domain, 1BB9.

**URLs.** Helical wheel projection was performed online at <http://kael.net/helical.htm>.

Note: Supplementary information is available on the Nature Genetics website.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank the affected individuals and their families for participation in this study. We also thank J. Wahlström for providing samples from one of the families, P. De Camilli (Yale University) for providing the BIN1-iso8 and BIN1-BAR\* cDNA constructs, P. McPherson (McGill University) for providing the BIN1 SH3 domain cDNA construct, M. Argentini for peptide mass fingerprinting, G. Duval for generation of antibodies, S. Vicaire for DNA sequencing, C. Thibault for DNA microarray analysis and H. Rohde, N. Dondaine and E. Klein for experimental help. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Collège de France, the Agence Nationale de la Recherche and the Association Française Contre les Myopathies (AFM). A.-S.N. is the recipient of an ATER from Collège de France, and A.T. is the recipient of a fellowship from AFM.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

Experiments were performed by A.-S.N., A.T., V.T., C.K., J.-M.G., V.B., A.O. and J.L. A.-S.N., A.T. and J.L. analyzed the data. C.W.-P., E.I. and H.K. contributed clinical samples and patient data. The study was designed and coordinated by J.-L.M. and J.L., and the paper was written by J.L.

#### COMPETING INTERESTS STATEMENT

The authors declare no competing financial interests.

Published online at <http://www.nature.com/naturegenetics/>

Reprints and permissions information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions>

1. Laporte, J. *et al.* A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast. *Nat. Genet.* **13**, 175–182 (1996).

2. Bitoun, M. *et al.* Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nat. Genet.* **37**, 1207–1209 (2005).
3. Jeannet, P.Y. *et al.* Clinical and histologic findings in autosomal centronuclear myopathy. *Neurology* **62**, 1484–1490 (2004).
4. Pierson, C.R., Tomczak, K., Agrawal, P., Moghadaszadeh, B. & Beggs, A.H. X-linked myotubular and centronuclear myopathies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **64**, 555–564 (2005).
5. Wallgren-Petersson, C. *et al.* The myotubular myopathies: differential diagnosis of the X linked recessive, autosomal dominant, and autosomal recessive forms and present state of DNA studies. *J. Med. Genet.* **32**, 673–679 (1995).
6. Dang, H., Li, Z., Skolnik, E.Y. & Fares, H. Disease-related myotubularins function in endocytic traffic in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biol. Cell* **15**, 189–196 (2004).
7. Laporte, J., Bedez, F., Bolino, A. & Mandel, J.-L. Myotubularins, a large disease-associated family of cooperating catalytically active and inactive phosphoinositides phosphatases. *Hum. Mol. Genet.* **12**, R285–R292 (2003).
8. Praefcke, G.J. & McMahon, H.T. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 133–147 (2004).
9. Tosch, V. *et al.* A novel PtdIns3P and PtdIns(3,5)P2 phosphatase with an inactivating variant in centronuclear myopathy. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 3098–3106 (2006).
10. Kojima, C. *et al.* Regulation of Bin1 SH3 domain binding by phosphoinositides. *EMBO J.* **23**, 4413–4422 (2004).
11. Lee, E. *et al.* Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science* **297**, 1193–1196 (2002).
12. Mandel, J.-L., Laporte, J., Buj-Bello, A., Sewry, C. & Wallgren-Petersson, C. Developmental disorders: X-linked myotubular myopathy. in *Structural and Molecular Basis of Skeletal Muscle Diseases* (ed. Karpati, G.) 124–129 (ISN Neuropath Press, Basel, Switzerland, 2002).
13. Razaq, 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.* **15**, 2967–2979 (2001).
14. Butler, M.H. *et al.* Amphiphysin II (SH3P9; BIN1), a member of the amphiphysin/Rvs family, is concentrated in the cortical cytomatrix of axon initial segments and nodes of ranvier in brain and around T tubules in skeletal muscle. *J. Cell Biol.* **137**, 1355–1367 (1997).
15. Ramjaun, A.R., Micheva, K.D., Bouchelet, I. & McPherson, P.S. Identification and characterization of a nerve terminal-enriched amphiphysin isoform. *J. Biol. Chem.* **272**, 16700–16706 (1997).
16. Wechsler-Reya, R., Sakamuro, D., Zhang, J., Duhadaway, J. & Prendergast, G.C. Structural analysis of the human BIN1 gene. Evidence for tissue-specific transcriptional regulation and alternate RNA splicing. *J. Biol. Chem.* **272**, 31453–31458 (1997).
17. Itoh, T. & De Camilli, P. BAR, F-BAR (EFC) and ENTH/ANTH domains in the regulation of membrane-cytosol interfaces and membrane curvature. *Biochim. Biophys. Acta* **1761**, 897–912 (2006).
18. Peter, B.J. *et al.* BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science* **303**, 495–499 (2004).
19. Ren, G., Vajjhala, P., Lee, J.S., Winsor, B. & Munn, A.L. The BAR domain proteins: molding membranes in fission, fusion, and phagy. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 37–120 (2006).
20. Sakamuro, D., Elliott, K.J., Wechsler-Reya, R. & Prendergast, G.C. BIN1 is a novel MYC-interacting protein with features of a tumor suppressor. *Nat. Genet.* **14**, 69–77 (1996).
21. Owen, D.J. *et al.* Crystal structure of the amphiphysin-2 SH3 domain and its role in the prevention of dynamin ring formation. *EMBO J.* **17**, 5273–5285 (1998).
22. Ge, K. *et al.* Mechanism for elimination of a tumor suppressor: aberrant splicing of a brain-specific exon causes loss of function of Bin1 in melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9689–9694 (1999).
23. Ge, K. *et al.* Losses of the tumor suppressor BIN1 in breast carcinoma are frequent and reflect deficits in programmed cell death capacity. *Int. J. Cancer* **85**, 376–383 (2000).
24. Korshunov, A., Sycheva, R. & Golanov, A. Recurrent cytogenetic aberrations in central neurocytomas and their biological relevance. *Acta Neuropathol. (Berl)* (2006).
25. Muller, A.J. *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.* **23**, 4295–4306 (2003).
26. Wechsler-Reya, R.J., Elliott, K.J. & Prendergast, G.C. A role for the putative tumor suppressor Bin1 in muscle cell differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 566–575 (1998).
27. Engel, A.G. & Franzini-Armstrong, C. *Myology, Basic and Clinical* (McGraw-Hill New York, 2004).
28. 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. USA* **99**, 15060–15065 (2002).
29. Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4876–4882 (1997).
30. Green, S., Issemann, I. & Sheer, E. A versatile in vivo and in vitro eukaryotic expression vector for protein engineering. *Nucleic Acids Res.* **16**, 369 (1988).

**Supplementary Figure 1** SNP haplotype analysis of 4 unrelated consanguineous CNM patients for the 2q14 region containing the *BIN1* gene. Patients AAT68, ADR71 and LF41 have mutations in *BIN1*, while we did not find nucleotide variant in ABJ25 by sequencing all exons and intron-exon boundaries. A and B denote the 2 alleles of each SNP: AA and BB, homozygous alleles, AB, heterozygous. Homozygous regions were considered significant from 25 consecutive homozygous SNPs.

SNPs	Chromosomal regions	AAT68	ADR71	LF41	ABJ25
		rs725139	2 q13		AB
rs724496	2 q13	AB	AA		
rs1374161	2 q13	BB	...		
...	...	...	...		
rs951431	2 q14.1	AA	AA	AA	AB
rs959031	2 q14.1	BB	BB	AB	BB
rs332704	2 q14.2	BB	BB	AA	BB
rs1534100	2 q14.2	BB	AA	AB	BB
rs874816	2 q14.2	AA	BB	AB	AA
rs959111	2 q14.2	BB	BB	AA	BB
rs2311398	2 q14.2	AA	AA	AA	AA
rs724691	2 q14.3	BB	AA	BB	AA
rs724692	2 q14.3	AA	AA	AA	BB
rs1368107	2 q14.3	AA	AA	AA	BB
rs723839	2 q14.3	BB	BB	BB	AA
rs1371494	2 q14.3	BB	BB	AB	BB
rs1607327	2 q14.3	BB	AA	AB	BB
rs294665	2 q14.3	AA	AA	AA	AA
rs167164	2 q14.3	AA	AA	AA	AA
rs951528	2 q14.3	BB	BB	BB	BB
rs2203772	2 q14.3	AA	AA	AA	AA
rs2419559	2 q14.3	AA	BB	AA	BB
rs1980356	2 q14.3	AA	AA	AB	AA
rs1405090	2 q14.3	AA	AA	AB	AA
rs1589908	2 q14.3	BB	BB	AB	BB
rs1343822	2 q14.3	BB	BB	AA	BB
rs2090030	2 q14.3	AA	BB	BB	AA
rs779991	2 q14.3	AA	AA	AA	BB
rs1186396	2 q14.3	AA	AA	AA	BB
rs1170578	2 q14.3	BB	BB	BB	AA
rs1367244	2 q14.3	AA	AA	BB	AA
rs2421084	2 q14.3	AA	BB	AA	AA
rs717601	2 q14.3	BB	BB	AB	BB
rs1583471	2 q14.3	BB	BB	BB	BB
rs763829	2 q14.3	BB	BB	BB	BB
rs1820556	2 q14.3	AA	BB	AA	BB
rs2404175	2 q14.3	AA	AA	AA	AA
rs1370229	2 q14.3	BB	AA	BB	BB
rs1316775	2 q14.3	BB	BB	BB	AA
rs1404073	2 q21.1	AA	AA	AA	AA
rs1097703	2 q21.1	BB	BB	BB	BB
rs1349734	2 q21.1	AA	AA	BB	AA
rs1946798	2 q21.2	AA	AA	AB	AA
rs2320399	2 q21.2	BB	BB	AB	BB
rs2321201	2 q21.2	AA	AA	AB	AA
rs3886664	2 q21.2	BB	BB	BB	BB
rs1867898	2 q21.2	BB	BB	AA	BB
rs1564935	2 q21.2	AB	AA	BB	AA
...	...	...	...	...	...
rs1357157	2 q22.1		...		BB
rs1395010	2 q22.1		...		AB
...	...	...	...	...	...
rs1384662	2 q22.1		AA		
rs2217964	2 q22.1		AB		

← *BIN1*

Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy

Anne-Sophie Nicot, Anne Toussaint, Valérie Tosch, Christine Kretz, Carina Wallgren-Pettersson, Erik Iwarsson, Helen Kingston, Jean-Marie Garnier, Valérie Biancalana, Anders Oldfors, Jean-Louis Mandel, Jocelyn Laporte.

### **Supplementary information :**

#### **Supplementary Note**

Human patients were recruited based on their family history, which indicated autosomal recessive inheritance, and their clinical phenotype, which was based on clinical examination and analysis of muscle biopsies taken by the Paediatric Neurologist as part of their routine clinical evaluation. The patients presented with an early onset neuromuscular disorder and muscle biopsy showed features consistent with centronuclear myopathy with numerous fibers with central nuclei. Muscle biopsy for histology and blood samples for DNA analysis were obtained with informed consent from the patients, or from the parents, on behalf of themselves and their children (minors). Approvals to perform research on congenital myopathies, including genetic analyses, have been granted from local ethic committees (Regional Ethical Review Board in Gothenburg, North Manchester Research Ethics Committee).

Experiments on mice were performed in the animal house of IGBMC (Illkirch, France). The IGBMC complies with National laws and European Directives governing Animal housing and welfare, dissection and experimentation. The animal facility is approved by the French Ministry of Agriculture and Fisheries' veterinary services. Animal experimentation is carried out under the general supervision of licensee, Prof. Jean-Louis Mandel. Prior to dissection, mice were anesthetized by i.p. injection of ketamine followed by cervical dislocation.

**Supplementary Figure 1** SNP haplotype analysis of 4 unrelated consanguineous CNM patients for the 2q14 region containing the *BIN1* gene.

**Supplementary Table 1** Primers for mutation screening.

**Supplementary Table 2** Polymorphisms detected in the human *BIN1* gene.

**Supplementary Table 3** Clinical and genetic data of the affected individuals of the three CNM families.

**Supplementary Table 1 Primers for mutation screening (sequences from 5' to 3')**

Exons	Wechsler-Reya et al. J. Biol. Chem. 1997		Forward	Reverse
1	1		GTCAGTTGGCTCCGCTGT	AGGATAGGGGGACAGGTG
2	2		TGGTGA CTGAGCACTCTTGG	CTCCACAAATTCAGCTCGTG
3 and 4	3 and 4		GAGAGCAGCCTGGTTCATTC	CAGAGAGGCTTGTCCCAGAG
5	5		ACATTTGCCCCATCTTACA	GTCCTAGGCCCTGTCCTCTC
6	6		GATCCACTGGACCTGGAGTC	CACAAGGGCCTCTCACTCAC
7	6a	alternative	CCTAATTCTCTCGGCCTCAA	AGCAGAGCTCTCCCAGCA
8	7		ATGGGTGTCCACATCCAGTT	CACTCAGGCTGGACACTGC
9	8		CTGGTTTGTGCCTCTGATGA	CCTCCACGACTCTGACTCT
10	9		ATGGGGAAAGAGGAGCTTGT	ACCAACAGGGTCACAGGAAG
11	10	alternative	TCCTCTGAGCAGAAGGGTTG	CACTGCACACAGAGCCAGAT
12	11		TGCACACACCTCTTCACACA	ATGGAGGACAACAGCAAAGC
13	12a	alternative	TGTGACTAACCGTGGCTTTG	TGGCTCTTGAGACAGAAGCA
14	12b	alternative	GTGTATGTGCGCTTGCTCTG	AGGTGATGAGGGCTGAAGG
15	12c	alternative	TGAAGCTCCCTGAGAGGTGT	CTGTGAACAGGCTAGGAGCA
16	12d	alternative	CCGCTGGTGACATTTTCTCT	CTGTCCTCACCTCACATCC
17	13	alternative	GTTTCCTGTGTCCTGGCTGT	TCCAGCTTCTCAACAGGAG
18	14		CTCCTGTTGAGGAAGCTGGA	AGTAGCGCCTGCACAACCTT
19	15		GCATCTGAGCCCCATACTGT	GCCAGGATGCCTGTGGTC
20	16		CCTGGAGGAGGTGTTCTCAA	GGGGTCTCCTCTTGATTCC

**Supplementary Table 2 Polymorphisms detected in the human *BINI* gene**

Position	Nucleotide change	Frequency (%)
exon1	c.1-27C>T	7,6
exon4	c.318+70C>T	2,0
exon5	c.319-19C>A	1,6
exon6	c.412-25T>C	19,7
exon6	c.487T>C	27,9
exon7	c.520-110G>A	1,8
exon8	c.699+10A>G	36,6
exon8	c.699+56C>T	8,0
exon8	c.699+57G>A	8,0
exon9	c.716C>T	6,3
exon10	c.775-4A>A	10,7
exon12	c.856-12C>A	18,3
exon12	c.893G>A	10,0
exon12	c.856+51C>T	5,0
exon12	c.956C>T	13,6
exon13	c.1004-61C>T	8,0
exon13	c.1004-41G>A	4,0
exon13	c.1004-15G>A	2,0
exon14	c.1134-92C>G	6,5
exon14	c.1239+50A>C	1,9
exon15	c.1240-21C>T	3,8
exon18	c.1400-94C>T	1,8
exon18	c.1400-44C>T	33,6
exon19	c.1573-72C>T	21,2
exon19	c.1573-63C>T	14,4
exon19	c.1573-29G>C	5,1
exon19	c.1573-18G>C	4,2
exon20	c.1675-88G>A	1,0

Exonic polymorphisms do not change the aminoacid.

Nucleotide numbering from the A of the ATG start codon in *BINI-iso1* reference sequence (NM\_139343).

Supplementary Table 3 Clinical and genetic data from affected individuals of the three CNM families.

Patients (1)	Sex	Mutation	Aminoacid change	Origin	Onset	Age (yrs)	Central nuclei	Pregnancy	Ventilation	Muscle weakness (2)	Facial weakness	Prosis	Ophthalmoplegia	Ophthalmoparesis	Other phenotypes	Cognitive development	Cardiac function	Tumors
<b>Family 1</b> AAT68	male	c.105G>T	K35N	India	birth	12	++	reduced fetal movements, oligohydramnios, IUGR (3)	normal	proximal, slowly progressive	no	yes	yes	no	contractures at birth	normal	normal	no
ACC82	female	c.105G>T	K35N		birth	died at 1yr	+	reduced fetal movements, oligohydramnios, IUGR (3)	normal	proximal	no	no	no		contractures at birth	hypodevelopment of both frontal lobes	die from viral myocarditis	no (post mortem)
ADS5	female	no DNA available			birth	died at 18hrs		reduced fetal movements, oligohydramnios, IUGR (3), premature	lung hypoplasia, ventilated from birth, die from respiratory failure	no spontaneous movement					severe joint contractures at birth		prenatal heart enlarged on scan, postnatal echocardiogram normal	
<b>Family 2</b> ADR71	male	c.451C>A	D151N	Iraq	8yrs	35	++	normal	normal	proximal		no	no	no	no	normal	normal	no
<b>Family 3</b> LE41	male	c.1723A>T	K575X	Iraq	birth	14	++	normal	normal	proximal, slowly progressive	yes	yes	no	yes	no	normal	normal	no

(1) All parents have first cousin consanguinity and all sequenced patients are homozygous for the mutation.

(2) Muscle weakness appears mostly proximal, but not restricted.

(3) IUGR = Intra-Uterine Growth Retardation.

### **III. Identification de nouvelles mutations dans BIN1**

#### **A. Contexte de l'étude : après la découverte du gène BIN1**

Après l'identification des trois premières mutations retrouvées dans quatre familles atteintes de myopathies centronucléaires autosomiques récessives, BIN1 était le seul gène impliqué dans cette forme récessive. Nous avons donc continué à séquencer l'ADN des patients dont le diagnostic de myopathie centronucléaire autosomique récessive était posé.

Johann Boehm qui s'occupe de la partie séquençage dans l'équipe de Jocelyn Laporte, a donc utilisé le séquençage à haut débit afin de détecter de nouvelles mutations chez des patients dont le diagnostic de CNM semblait fort probable mais dont aucune mutation n'avait été identifiée dans le gène MTM1 ou le gène DNM2.

#### **B. Question biologique : Les mutations de BIN1 pourraient-elles avoir d'autres impacts cellulaire et moléculaire ?**

Dans notre première étude, nous avons mis en évidence un défaut de tubulation de la protéine du à des mutations dans le domaine N-BAR, p.K35N et p.D151N, ainsi qu'un découplage quasi-total de l'interaction avec la dynamine 2 du à une mutation non sens dans le domaine SH3, p.K575X. Or ces mutations se trouvent dans les domaines non spécifiques de l'isoforme musculaire. En effet, ces domaines sont communs à toutes les isoformes de l'amphiphysine 2 ainsi qu'à l'amphiphysine 1. Le seul domaine spécifique de BIN1 qui est retrouvé uniquement dans le muscle squelettique est le domaine PI. Ce domaine peut interagir avec des phosphoinositides membranaires et plus particulièrement avec le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, mais il a aussi la particularité de réguler la conformation tridimensionnelle de la protéine (Kojima, Hashimoto et al. 2004). En effet, ce domaine PI est capable d'interagir avec son propre domaine SH3, ce qui bloque alors l'interaction du domaine SH3 avec la dynamine 2. L'amphiphysine se retrouve alors dans une conformation « fermée ». Pour lever ce blocage, le domaine PI doit interagir avec le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, libérant ainsi son domaine SH3, qui peut alors interagir avec des protéines contenant un domaine PRD telles que la dynamine 2. La protéine



## Résultats

---

BIN1 se retrouve alors dans une conformation dite « ouverte » (Kojima, Hashimoto et al. 2004).

Je me suis donc intéressée à l'impact des mutations de BIN1 sur les interactions intramoléculaire, ce qui pourrait traduire un dysfonctionnement de BIN1 dans le muscle squelettique des patients ARCNM.

### C. Matériel et méthodes

#### 1. Production d'ADN plasmidique

L'équipe possédait avant mon arrivée, l'ADN plasmidique de BIN1 sauvage ainsi que celle des mutants p.K35N, p.D151N et p.K575X que nous avons utilisés pour les travaux précédents, dans des vecteurs de sortie GFP, et GST. Johann Boehm a donc réalisé pendant ma thèse, des mutagénèses afin de produire les nouvelles mutations identifiées dans les vecteurs de sortie GFP et GST. Il a ainsi produit l'amphiphysine 2/BIN1 p.R154Q et p.Q575X GFP et GST.

#### 2. Culture de cellules et transfection

Des fibroblastes de reins de singe (COS-1) ont été cultivés jusqu'à atteindre 50 à 80% de confluence. Les cellules ont alors été traitées avec de la trypsine diluée à 37°C. La digestion par la trypsine diluée a été arrêtée avec du milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 1g/L glucose / 5% Fœtal Calf Serum (FCS) / Gentamicine. Après une dilution au 1/5, les cellules ont été déposées dans des boîtes 24 puits (Multiwell 24 wells, #353046, Falcon) contenant des lamelles (de diamètre 12 mm). Après un minimum de 4h d'incubation à l'étuve, les cellules ont été transfectées en utilisant le réactif Fugène. Un mélange constitué de 50 µl de milieu dépourvu de FCS (DMEM 1g/l glucose), 1,5µl de Fugène-6 (#11814443001 ; Roche Applied Science) et de 0,5 µg d'ADN a été préparé pour chaque puits et laissé 10 min à température ambiante. Il a ensuite été déposé sur les cellules COS rincées avec leur milieu. Les cellules traitées ont été incubées pour la nuit à 37°C.

## Résultats

---

Les cellules ont ensuite été rincées au PBS avant d'être fixées au PFA 4% dans le but d'être marquées par immunocytofluorescence.

### 3. Immunofluorescence et microscopie

Les cellules (COS-1) ont été cultivées sur lamelles, lavées brièvement au PBS (KCl 3 mM /  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5 mM / NaCl 140 mM /  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8 mM), puis fixées au PFA 4% à 4°C durant la nuit. A température ambiante, les cellules ont été incubées avec 50 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  pendant 15 min puis perméabilisées 10 min avec une solution de PBS additionnée de 0,2% de Triton (PBS-T 0,2%). Les sites de liaison aspécifique ont ensuite été saturés 1 heure grâce à une solution contenant du PBS-Triton (PBS-T) 0,1% et du FCS (Fœtal Calf Serum) 10%. Un rinçage de 5 min avec du PBS a alors été effectué. Les cellules ont été incubées 1 h avec l'anticorps primaire adéquat dilué dans du PBS-T 0,1% contenant 3% de FCS. Après trois lavages de 10 min avec du PBS-T 0,1%, les cellules ont été incubées 45 min avec l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome dilué dans du PBS-T 0,1% contenant 3% de FCS. Les cellules ont été lavées trois fois avec du PBS-T 0,1%, puis une fois avec du PBS. Les cellules ont enfin été montées sur des lames avec un agent empêchant l'extinction de la fluorescence (propylgalate 5% / glycérol 80% / PBS1X 20%) puis scellées. Les cellules ont été observées au microscope à épifluorescence conventionnelle (Leica, DMLB, Ex: 543nm/ Em : 568-634nm), le microscope confocal (Leica SP2-UV, Ex : 543nm/ Em : 568-634nm) ayant été utilisé pour certaines cellules.

### 4. Etude d'interaction par GST« pull down »

#### a. Extraction cellulaire

Les extraits cellulaires de cellules COS-1 transfectées avec différentes constructions liées à la GFP, ont été obtenus par lyse grâce à un tampon d'extraction (50 mM Tris HCl pH 7,4 ; 50 mM KCl ; 50 mM NaCl ; 0,1% Triton ; 1 mM  $\text{MgCl}_2$  ; 1 mM DTT ; 1 mM PMSF : 1 mM EDTA ; une tablette d'inhibiteur de protéase PIC (Roche)). Les extraits ont été passés cinq fois dans une seringue 25G afin de disperser les agrégats et le matériel insoluble a été

## Résultats

---

éliminé par centrifugation à 10 000 rpm pendant 10 min. Les extraits sont testés alors par Western Blot afin de vérifier la transfection et sont stockés à -20°C jusqu'à l'étape d'immunoprécipitation.

### **b. Production de protéines de fusion liées à la GST**

Le principe de cette technique repose sur le principe de la chromatographie d'affinité (Figure 21). Ainsi afin de détecter une interaction protéique, un support solide constitué de billes de sépharose, sur lesquelles ont été liées un ligand fusionné à une protéine X, est incubé avec un extrait cellulaire dans lequel notre protéine d'intérêt Y a été surexprimée (cette protéine peut être liée ou non à tag). Si les deux protéines X et Y interagissent, la protéine Y va venir se fixer à la protéine X et donc au complexe GST-billes. Les lavages suivants permettront d'enlever les autres protéines présentes dans les extraits. Les billes seront sédimentées par centrifugation et l'analyse se fera sur gel SDS page en utilisant un anticorps dirigé contre la protéine Y ou contre son tag si elle en a un.

Une réaction de transformation est dans un premier temps réalisée : 50 à 100 ng de l'ADN plasmidique choisie sont incubés avec 50 µl de bactéries compétentes (Rosetta 2 BL21, Stratagène) pendant 30 minutes sur glace. La réaction subit alors un choc thermique pendant 1 minute à 45°C et 150 µl de milieu LB stérile sont ajoutés. La réaction est incubée pendant 1 heure à 37°C puis 100 µl du mélange réactionnel sont étalés sur des boîtes de Pétri contenant du LB agar et l'antibiotique adéquate (Ampiciline). Les boîtes de Pétri sont incubées une nuit à 37°C. Puis deux colonies bactériennes sont repiquées des boîtes de Pétri et placées dans 4 ml de milieu 2X LB avec l'antibiotique adéquate et sont incubées une nuit à 37°C.

Le lendemain, les bactéries sont diluées au 1/25<sup>ième</sup> (4 ml dans 96 ml de 2X LB) et laissées dans un incubateur jusqu'à une DO (à 600 nm) de 0.5 environ, cela pouvant prendre entre 2h et 4h.

Un aliquot de 1 ml de la culture de bactéries avant l'induction est récupéré dans un eppendorf. Cet aliquot est alors centrifugé et est conservé à -20°C, il servira de contrôle négatif de l'induction avant l'ajout de l'IPTG (isopropyl β-D thiogalactoside).

## Résultats

---

Le reste de l'Erlenmeyer est alors induit avec 1mM d'IPTG puis la croissance bactérienne se poursuit pendant une nuit dans un incubateur à 16°C sous agitation, afin de minimiser la formation des corps d'inclusions.

Le lendemain, un aliquot de 1 ml est prélevé, dans un eppendorf, est centrifugé puis est conservé à -20°C, il servira de contrôle positif de l'induction par l'IPTG. Le reste de l'erien est alors centrifugé à 4 000 rpm pendant 10 min à 4°C.

Délicatement, les bactéries sont resuspendues avec 3 à 5 ml par gramme de culot (10 ml pour 100 ml de culture environ) de tampon d'extraction 1X (Tampon d'extraction 5X : 250 mM Tris-HCl (pH 8.0) ; 500 mM NaCl ; 5mM EDTA. Stocker à température ambiante le 5X et à +4°C la solution 1X en ajoutant 1mM de DTT) en décollant doucement le culot par flux et reflux avec une pipette. La lyse est plus efficace si la suspension est homogène et pas trop visqueuse. Le lysozyme à 1 mg/ml et le PMSF à 1mM, en concentration finale, sont alors ajoutés à la préparation et le mélange est laissé à incuber sur glace pendant 30 à 60 min en mixant par inversion de temps en temps. Puis le sarcosyl à 1% du 10% stock est ajouté et le tout est mélangé par inversion pendant 1 heure à 4°C. Le triton X-100 à 1% de la solution stock à 20% (20 ml de Triton X100 dans 80 ml de ddH<sub>2</sub>O) est ajouté et le tout est à nouveau mélangé par inversion toute la nuit à 4°C. Enfin, le lysat de bactérie est centrifugé pendant 30 min à 16 000 rpm à 4°C.

Pendant ce temps, les billes de glutathion sépharose sont préparées de la manière suivante :

- a. Les billes sont à 80% slurry (dans 1 ml il y a 800µl de billes) dans de l'EtOH. Mettre la quantité nécessaire (200 µl par échantillon) dans un falcon de 14 ml.
- b. Centrifuger doucement à 2 000 rpm pendant 5 min à 4°C.
- c. Enlever le surnageant.
- d. Laver la résine avec 1.5 ml de tampon d'extraction 1X froid.
- e. Centrifuger pendant 2 min à 2 000 rpm à 4°C et enlever le surnageant.
- f. Répéter les étapes d. et e. encore 5 fois de plus.
- g. Stocker sur glace.

Le surnageant de bactéries est filtré si nécessaire et ajouté aux billes de Glutathion Sépharose pour être incubé toute la nuit sous agitation à 4°C. Le lendemain, les billes sont centrifugées pendant 1 min à 2 000 rpm à 4°C et le surnageant est enlevé sans perturber les billes. Les billes doivent alors avoir lié les protéines fusionnées à la GST et le surnageant ne

## Résultats

---

contient que les protéines incapables de lier notre protéine d'intérêt liée à la GST. La résine est lavée avec 5 à 10 ml de tampon d'extraction 1X avec 0.1 % de triton X-100 et 1 mM de PMSF (Préparer 100 mM de PMSF (attention produit très toxique) dans de l'isopropanol et stocker à -20°C). Le tout est alors centrifugé à 2 000 rpm pendant 1 min à 4°C. Le surnageant est enlevé et l'opération doit être renouvelée 2 fois de plus. La résine est lavée avec 5 à 10 ml de tampon d'extraction avec 0.1 % de TritonX100 et 400 mM de NaCl puis le tout est centrifugé à 2 000 rpm pendant 1 min. On enlève le surnageant et l'opération est alors répétée une fois de plus. Finalement, la résine est lavée avec 5 à 10 ml de tampon d'extraction 1X seul. Le surnageant est enlevé et les billes lavées sont transférées dans un eppendorf et lavées encore une fois avec du tampon d'extraction 1X (500 µl). Le tout est centrifugé à 2 000 rpm pendant 1 min à 4°C.

### c. Immunoprécipitation

2,5 mg de protéines liées à la GST et aux billes de Sépharose sont alors incubées avec les extraits cellulaires transfectés et préalablement préparés pendant 6 heures à toute la nuit à 4°C. Après avoir lavé trois fois les billes avec un tampon d'extraction puis trois fois avec du milieu PBS 1X, 10 µL de billes sont alors analysés par électrophorèse sur un gel 10 % SDS-polyacrylamide. Les protéines surexprimées dans les extraits cellulaires sont alors révélées par un anticorps polyclonal anti-GFP dilué au 1 : 5000. Des billes fixant la GST seule (non fusionnée à une protéine) sont utilisées comme control négatif. Une étape de lavage avec le tampon d'extraction plus stringent (400-500 mM NaCl) est parfois nécessaire, afin d'affiner l'interaction entre les protéines fusionnées à la GST et les protéines surexprimées dans les cellules.

## D. Résultats

Johann Boehm a identifié deux nouvelles mutations dans les domaines BAR, p.R154Q, et SH3, p.Q573X chez des patients atteints d'ARCNM (Figure 22a.).

## Résultats

---

La première mutation p.R154Q se trouve dans le domaine BAR à trois acides aminés de l'ancienne mutation p.D151N. Elle a été identifiée chez un patient né en 1988, présentant des difficultés à la marche, une amyotrophie diffuse, des problèmes respiratoires et une dysmorphie faciale (Figure 22b.).

La deuxième mutation est un codon stop prématuré p.Q573X, situé deux acides aminés avant le codon stop déjà identifié, p.K575X. Elle a été retrouvée chez un garçon né en 1995 et chez sa cousine née en 1996. Les deux enfants présentaient une hypotonie à la naissance, des problèmes respiratoires et une faiblesse musculaire (Figure 22c.).

Les deux acides aminés dans ces mutations sont conservés à travers les espèces et semblent donc jouer un rôle important dans la fonction de la protéine (Figure 22d.).

J'ai par la suite étudié l'impact de ces nouvelles mutations sur la fonction de la protéine. La première mutation p.R154Q est un changement d'acides aminés dans le domaine BAR, la deuxième mutation p.Q573X est un codon stop prématuré dans le domaine SH3 (Figure 22a.). Ces deux nouvelles mutations se situant proches de deux mutations identifiées préalablement par l'équipe de Jocelyn Laporte, j'ai tout d'abord reproduit les expériences précédemment réalisées puis j'ai essayé de voir l'impact de ces mutations sur d'autres fonctions de BIN1 déjà décrites dans la littérature comme l'homodimérisation du domaine BAR et la régulation du domaine SH3 par le domaine PI.

### **1. Impact sur la tubulation**

Dans un premier temps, j'ai donc reproduit les mêmes expériences que nous avons menées dans les cellules en culture pour les trois premières mutations décrites dans l'article précédent (Figure 23a.). J'ai donc étudié l'impact de ces deux nouvelles mutations sur la fonction de tubulation des membranes de BIN1.

La surexpression des constructions sauvages et contenant les deux mutations, p.R154Q et p.Q573X, dans des cellules COS-1 en culture montre que la mutation dans le domaine BAR, p.R154Q, empêche la tubulation des membranes de BIN1 puisque les cellules ne présentent soit aucun tubule soit uniquement des tubules membranaires de petites tailles (Figure 23b. et c.). Par contre, la mutation du domaine SH3, p.Q573X, est toujours capable de tubuler les membranes (Figure 23b.).

## Résultats

---

Grâce à ces résultats et à l'étude précédente sur l'impact des mutations de BIN1 (Nicot, Toussaint et al. 2007), nous avons montré que les mutations du domaine N-BAR, p.K35N, p.D151N et p.R154Q, semblent être responsables d'une perte quasi-totale de la fonction de tubulation des membranes de BIN1, tandis que les mutations du domaine SH3, p.Q573X et p.K575X, semblent être responsables d'un découplage presque total de leur capacité à lier la dynamine 2.

Contrairement à l'étude menée par Lee et collègues (Lee, Marcucci et al. 2002), des travaux semblent montrer que le domaine N-BAR seul est capable de tubuler les membranes *in vitro* et *in vivo* (Takei, Slepnev et al. 1999; Lee, Marcucci et al. 2002; Masuda, Takeda et al. 2006; Rao, Ma et al. 2010). En effet, Takei et collègues ont montré que le domaine N-BAR est capable de tubuler les membranes de liposomes lorsque ce domaine recombinant est incubé avec ces membranes artificielles. De plus, Masuda et collègues ont montré que le domaine BAR de l'endophiline A1 est capable à lui seul de tubuler les membranes en surexpression dans des cellules HUVECs (Masuda, Takeda et al. 2006). Enfin, Rao et collègues ont montré il y a peu, que le domaine F-BAR de la syndapine-1 est capable de tubuler les membranes tandis que la protéine sauvage entière n'en est pas capable (Rao, Ma et al. 2010). En accord avec ces études, nous avons donc pensé que les protéines BAR devaient réagir de la même façon. BIN1 faisant partie de la famille des amphiphysines qui possèdent un domaine BAR la même conclusion pourrait s'adapter à cette protéine, sauf que BIN1 possède en plus un domaine spécifique capable d'accentuer le pouvoir de tubulation, le domaine PI (Lee, Marcucci et al. 2002).

En surexprimant le domaine N-BAR seul dans des cellules en culture, j'ai constaté que ces cellules transfectées avaient des tubules semblables à ceux observés auparavant avec la protéine BIN1 sauvage entière (Figure 24). J'ai de plus observé que les mutations de ce domaine N-BAR diminuaient fortement la fonction de tubulation des membranes de ce domaine puisque dans ce cas, aucun ou uniquement des petits tubules sont observés. Ces résultats semblent donc en accord avec l'hypothèse émise par Rao et collègues sur la tubulation du domaine BAR des amphiphysines (Rao, Ma et al. 2010).



### **2. Impact des mutations de BIN1 sur le recrutement de la dynamine 2 aux tubules membranaires**

J'ai ensuite surexprimé les constructions sauvages et mutantes de BIN1 avec une construction de la dynamine 2 sauvage afin d'évaluer l'impact de ces mutations sur le recrutement de la dynamine 2 aux tubules membranaires. J'ai pu observer que la présence de la mutation p.Q573X, tout comme la mutation p.K757X, abolissait presque totalement le recrutement de la dynamine 2 aux tubules membranaires (Figure 25a. et b.).

Dans notre première étude, nous n'avions pas recherché si les mutations du domaine BAR étaient encore capables de recruter la dynamine 2 au niveau des petits tubules membranaires qu'ils formaient. En effet, le domaine SH3 capable de recruter la dynamine 2, n'étant pas atteint, nous avons supposé que ces mutants étaient toujours capables de recruter la dynamine 2. En surexprimant ces mutations du domaine BAR dans les cellules en co-expression avec la dynamine 2, j'ai pu observer que, tout comme nous le supposions, la mutation p.R154Q, comme la mutation p.D151N, était toujours capable de recruter la dynamine 2 au niveau des petits tubules membranaires produits par ces constructions mutantes (Figure 26).

J'ai ainsi démontré que les mutations du domaine BAR sont encore capables de recruter la dynamine 2 bien qu'elles ne soient pratiquement plus capables de tubuler les membranes.

En effet, ces mutations qui forment de petits tubules membranaires, sont capables de recruter la dynamine 2 au niveau de ces petits tubules. Tandis que les mutations du domaine SH3 semblent donc être responsables d'un découplage du lien BIN1/dynamine 2.

### **3. Impact des mutations de BIN1 sur la régulation de la protéine**

#### **a. L'homodimérisation BAR-BAR**

Le domaine N-BAR de BIN1 est composé d'une hélice amphipatique en N-terminale de la protéine qui lui permet de s'insérer dans les membranes et de créer ainsi une courbure. Cette hélice est suivie d'un domaine BAR capable de s'assembler en homodimère en forme

## Résultats

---

de banane ce qui lui permet ainsi de détecter/maintenir la courbure membranaire et de tubuler les membranes. J'ai donc voulu étudier l'impact des mutations du domaine N-BAR sur cette homodimérisation et pour cela, j'ai utilisé la technique de GST « pull down » *in vitro*.

J'ai ainsi observé que les mutations du domaine N-BAR ne semblent pas affecter l'homodimérisation de la protéine et sont capables d'interagir avec le domaine N-BAR WT (Figure 27).

En conclusion, ces mutations du domaine N-BAR semblent être responsables d'une perte quasi-totale de leur fonction de tubulation des membranes, mais ne semblent pas avoir d'impact sur l'homodimérisation de BIN1. Ces résultats sont cohérents avec les défauts de structure des tubules-T observés chez un patient ARCNM avec une mutation dans le domaine BAR de BIN1, puisque chez ce patient des anomalies des tubules-T sont observées mais ces structures musculaires sont toujours présentes (Toussaint, Cowling et al. 2010).

### **b. L'interaction moléculaire PI-SH3**

Le domaine PI, spécifique de l'isoforme musculaire de l'amphiphysine 2 : BIN1, est capable d'interagir avec le domaine SH3 de cette même protéine. Cette interaction pourrait inhiber alors l'interaction avec la dynamine 2. En effet, les sites d'interaction du domaine SH3 avec le domaine PI et avec le domaine PRD se chevauchent en grande partie (Figure 28a. et b.) (Kojima, Hashimoto et al. 2004). Cette inhibition ne peut être levée que par la liaison du domaine PI avec le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>.

J'ai donc cherché à estimer l'impact des mutations de BIN1, identifiées chez les patients ARCNM, sur l'interaction du domaine PI avec son domaine SH3. Pour cela, j'ai utilisé la technique de GST « pull down » afin de vérifier cette interaction et d'étudier les mutations du domaine SH3. Ainsi ces expériences permettent de vérifier si les mutations du domaine SH3, responsables de la perte du lien fonctionnel entre BIN1 et la dynamine 2, pouvaient aussi empêcher la liaison avec le domaine PI.

Mes résultats montrent que le domaine SH3 est bien capable d'interagir avec le domaine PI de BIN1 et que cette interaction est abolie par les mutations du domaine SH3, aussi bien la mutation p.Q573X que la mutation p.K575X (Figure 29a. et b.).

## Résultats

---

Le fait que la mutation du domaine SH3, p.K575X, n'abolisse pas totalement le recrutement de la dynamine 2 (Nicot, Toussaint et al. 2007) et que cette même mutation ainsi que la mutation, p.Q573X, abolissent totalement le recrutement du domaine PI, semble indiquer que l'impact des mutations du domaine SH3 ne soit pas, dans un premier temps, d'abolir l'interaction avec la dynamine 2, mais plutôt d'empêcher la liaison du domaine PI avec le domaine SH3. La protéine serait alors dans une conformation « ouverte » tandis qu'à l'état sauvage, BIN1 est dans une conformation « fermée » en se repliant sur elle-même.

### **E. Conclusion de l'étude**

Nous avons identifié le gène BIN1 comme le premier gène impliqué dans la forme autosomique récessive des myopathies centronucléaires. Pourtant, nous n'avons identifié que trois variants différents dans quatre familles consanguines : deux changements d'acides aminés qui affectent le domaine N-BAR, p.K35N et p.D151N, et un codon stop prématuré dans le domaine SH3 C-terminal de la protéine, p.K575X. Cette avancée est un premier pas dans l'amélioration du diagnostic génétique pour les patients. C'est pourquoi le laboratoire met beaucoup d'efforts dans la recherche de mutations dans les gènes déjà impliqués dans les myopathies centronucléaires comme ce nouveau gène BIN1. C'est ainsi que nous avons identifié deux nouvelles mutations dans ce gène chez trois patients de deux familles différentes. Ces mutations, p.R154Q et p.Q573X, sont proches des mutations déjà identifiées et caractérisées dans notre étude précédente. Ainsi, dans cette étude nous proposons que la perte du lien fonctionnel entre BIN1 et la dynamine 2 puisse être une des causes primaires de la pathologie musculaire des myopathies centronucléaires, en plus des défauts de structure des tubules-T dues à des anomalies dans la fonction de tubulation de la protéine BIN1.

L'identification de ces nouvelles mutations nous a poussé à chercher et à caractériser encore un peu plus les défauts moléculaires induits par ces mutations.

Ces nouveaux résultats semblent indiquer, tout comme auparavant, que les mutations du domaine N-BAR peuvent être responsables d'un défaut de structure des tubules-T, puisque la protéine est toujours capable de s'homodimériser mais n'est quasiment plus capable de tubuler les membranes en surexpression dans des cellules.

## Résultats

---

En ce qui concerne les mutations du domaine SH3, aussi bien la mutation p.K575X précédemment décrites que la mutation p.Q573X nouvellement découverte, ces mutations ne semblent pas avoir pour conséquence première une perte partielle du lien avec la dynamine 2, comme nous l'avions proposé auparavant (Nicot, Toussaint et al. 2007). Elles semblent plutôt être responsables d'une perte de la conformation de la protéine, due à la perte de l'interaction de ce domaine SH3 avec le domaine PI, spécifique du muscle squelettique.

Ces observations pourraient donc proposer une nouvelle vision sur l'impact moléculaire des mutations de la protéine BIN1. En effet, elles montrent l'importance de la structure tridimensionnelle de la protéine. Ainsi dans le cas normal, le domaine SH3 de BIN1 se lie au domaine PI afin de réguler son interaction avec les protéines à domaine PRD telles que la dynamine 2, se traduisant ainsi par une conformation « fermée » de la protéine. Les mutations auront donc un effet d'ouverture de cette conformation de la protéine, exposant ainsi le domaine SH3 à certains de ces interacteurs. Cependant, si ce domaine est sous une conformation libre, nous aurions pu penser qu'il serait alors disponible pour lier directement la dynamine 2. Pourtant ce n'est pas totalement voir quasiment pas le cas (Nicot, Toussaint et al. 2007) car le site de liaison du domaine PI et celui du domaine PRD se chevauchent en grande partie. Cette conformation libre pourrait permettre à d'autres protéines, qui se lient au domaine SH3 de BIN1, d'interagir directement et en continue avec BIN1, la synaptojanine pourrait être un candidat, par exemple.

De nouvelles études doivent donc être menées afin de savoir si cette conformation « ouverte » permet la liaison en continue de protéine qui ne se lient pas normalement à BIN1 à cause de sa conformation « fermée ».

### **IV. BIN1 : impact d'un épissage alternatif défectueux dans les dystrophies myotoniques de Steinert et de type 2**

**Publication 3: “Misregulation of alternative splicing of BIN1 is associated with T-tubules and muscle alterations in myotonic dystrophy.”**

#### **A.Contexte de l'étude : l'état initial des connaissances sur les dystrophies myotoniques**

Trois types de dystrophies myotoniques sont connus à ce jour : la dystrophie myotonique de Steinert, la dystrophie myotonique de type 2 et la dystrophie myotonique de type 3 (cf. chapitre dans l'introduction).

Les trois formes de DM de Steinert sont dues à une expansion anormale de répétitions CTG dans le gène DMPK (Brook, McCurrach et al. 1992; Buxton, Shelbourne et al. 1992). Par contre, la DM de type 2, qui fut découverte plus récemment, est due à une expansion d'un quadruplet de nucléotides CCTG dans l'intron 1 du gène ZNF9 (Liquori, Ricker et al. 2001).

Toutes ces expansions anormales, dans le cas des DM de Steinert et de type 2, forment alors des agrégats CUG ou CCUG d'ARN nucléaires, respectivement, qui vont retenir des facteurs d'épissage tel que muscleblind (MBLN). En séquestrant ces facteurs d'épissage, la cellule n'est plus capable d'épisser correctement de nombreux ARN messagers tels que l'ARNm du canal chlore ou encore de MTMR1. Cependant les protéines touchées par ces défauts d'épissage et les acteurs et mécanismes à l'origine des différents symptômes observés chez les patients sont encore mal définis.

La forme congénitale de dystrophie myotonique de Steinert (cDM) a une particularité assez surprenante puisqu'elle présente les mêmes caractéristiques histologiques que la forme sévère, liée au chromosome X des myopathies centronucléaires (XLCNM). En effet, sur les biopsies de patients cDM, on peut observer une atrophie des myofibres et la présence de noyaux centraux non associés à un mécanisme de régénération excessive.

Le seul moyen de différencier ces deux formes sur un plan histologique, est de rechercher la présence ou l'absence de MBLN dans les cDM ou les XLCNM respectivement.

## Résultats

---

En effet, ce facteur d'épissage MBLN ainsi que d'autres tels que CUG-BP, ETR-3 sont séquestrés dans le noyau chez les patients atteints de cDM, alors qu'ils sont transcrit et traduit correctement dans les cas de XLCNM.

### **B.Question Biologique : pourquoi observe-t-on une faiblesse musculaire et/ou des noyaux centraux chez les patients atteints de DM?**

Comme il avait été montré que l'épissage alternatif du canal chlore est défectueux chez les patients DM, et que ce défaut semble être responsable de la myotonie observée (Mankodi, Takahashi et al. 2002), Jocelyn Laporte s'est interrogé sur la faiblesse musculaire observée chez ces patients. En effet, nous avons montré que des mutations de BIN1 se retrouvent chez des patients atteints d'ARCNM et que l'exon 11 de BIN1 est spécifiquement exprimé dans le muscle. Jocelyn Laporte a donc suggéré qu'une anomalie d'épissage de BIN1 pourrait conduire au phénotype de faiblesse musculaire et/ou de noyaux centraux observés chez les patients atteints de cDM.

En effet l'expression du domaine PI de l'isoforme BIN1 provient de l'insertion de l'exon 11 par épissage alternatif lors de la biogénèse du muscle squelettique. En collaboration avec l'équipe de Nicolas Charlet-Berguerand, qui travaille à l'IGBMC sur les anomalies d'épissage des DM, nous avons donc émis l'hypothèse qu'un épissage alternatif aberrant de BIN1 pourrait expliquer les liens physiopathologiques communs entre les DM et les CNM.

### **C.Résultats**

L'équipe de Nicolas Charlet-Berguerand a ainsi mis en évidence une anomalie d'épissage de l'isoforme BIN1 dans les cellules musculaires de patients atteints de dystrophies myotoniques de Steinert et de type 2. En effet, ils ont découvert que les patients atteints de cDM présentaient, au niveau de cultures primaires de cellules musculaires ainsi qu'au niveau de tissus de muscle squelettique, une isoforme BIN1 sans exon 11 (alors qu'il est présent chez les sujets sains) tandis que 50 % de ces isoformes musculaires contenaient l'exon 7 (normalement absent chez des sujets sains). Ils ont ainsi démontré une

## Résultats

---

exclusion anormale lors de l'épissage de l'isoforme BIN1 dans les cellules musculaires de patients atteints de DM. Ils ont également démontré que le taux d'exclusion de l'exon 11 est corrélé avec la sévérité de la maladie, puisque l'exclusion de cet exon 11 est totale chez les patients cDM tandis qu'elle est partielle chez les autres patients DM de type 1 et chez les patients DM de type 2.

De plus, ils ont montré par des expériences d'interaction protéine-lipides (« fat-blot ») *in vitro* que le domaine PI, spécifique de cette isoforme musculaire, est capable de lier des phosphoinositides et plus particulièrement le PtdIns(3)P et le PtdIns(5)P. Cette interaction avec le PtdIns(5)P a été confirmée par une expérience de liaison au liposomes contenant du PtdIns(5)P et dont la liaison est abolie lorsque l'exon 11 de BIN1 est épissé anormalement comme chez les patients DM de Steinert et de type 2. Cette liaison étant abolie lorsque l'exon 11 est mal épissé, cela suggère que l'exclusion de l'exon 11 chez les cDM est responsable d'une perte d'interaction de BIN1 avec le PtdIns(5)P et que cette perte pourrait être responsable du phénotype musculaire observé chez ces patients. En effet, l'analyse histologique de biopsies musculaires de patients a montré des défauts d'organisation des tubules-T et de la localisation de BIN1.

### **D. Ma contribution à l'étude**

Au cours de cette étude sur l'implication de BIN1 dans les dystrophies myotoniques, j'ai réalisé des transfections des différentes constructions soit sans l'exon 11, représentant l'isoforme présente chez les patients cDM, soit une construction sauvage, dans des cellules COS, C2C12 différenciées ou non (myotubes ou myoblastes respectivement). Pour tester l'impact des différents variants, j'ai utilisé la propriété de l'isoforme musculaire de BIN1 à pouvoir tubuler les membranes. La construction sauvage comporte l'exon 11 spécifique du muscle et a donc été utilisée comme témoin positif. Ce témoin est bien capable de tubuler les membranes dans tous les types cellulaires. L'autre construction sans exon 11 n'est plus capable de tubuler les membranes dans aucun type cellulaire et montre une localisation cytoplasmique. Cette deuxième construction qui reflète l'isoforme présente chez les patients perd donc sa fonction de tubulation des membranes *in vivo*.



### E. Conclusion de l'étude

Cette étude a décrit pour la première fois un défaut d'épissage de BIN1 chez les patients atteints de DM de Steinert et de DM de type 2. Ce défaut d'épissage résulte en la production d'une isoforme musculaire qui est sans domaine PI et donc similaire à l'isoforme 1 de l'amphiphysine 2. Cette isoforme 1 est une isoforme neuronale incapable de tubuler les membranes, comme nous avons pu le voir dans cette étude.

Comme BIN1 est impliquée dans la formation des tubules-T dans le muscle squelettique (Lee, Marcucci et al. 2002) et que cette étude a montré que les patients DM de Steinert et de type 2 présentent des défauts de structure ou d'organisation des tubules-T, tout comme dans le cas des patients ARCNM, elle montre l'implication de ce domaine PI dans le maintien de ces structures tubulaires.

Cette découverte pourrait ainsi expliquer la faiblesse musculaire et/ou les noyaux centraux communs aux patients atteints de DM et de CNM.

De plus, l'isoforme musculaire de l'amphiphysine 2 : BIN1, contient un domaine spécifique, PI liant les phosphoinositides. Il avait déjà été montré que cette protéine est capable de lier le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> et le PtdIns(4)P, mais cette étude montre pour la première fois qu'elle est capable de lier le PtdIns(3)P et le PtdIns(5)P.

Ces résultats doivent encore être confirmés car les résultats de « fat-blot » sont parfois contradictoires et que ces résultats ne semblent pas coïncider avec les résultats de Lee et collègues (Lee, Marcucci et al. 2002). Il faut noter que les deux constructions de BIN1 dans cette étude et celle de Lee et collègues, ne sont pas les mêmes. En plus, dans l'étude de Lee et collègues, le lien avec le PtdIns(5)P n'avait pas été testé. En effet, nos travaux montrent que cette isoforme musculaire de l'amphiphysine 2, BIN1, colocalise avec le PtdIns(5)P dans des cellules musculaires en culture et est capable de se lier à des liposomes contenant ce PtdIns(5)P.

Enfin, ces résultats ont permis en plus, de mettre en évidence l'implication d'une protéine : BIN1, dans deux maladies musculaires : les dystrophies myotoniques et les myopathies centronucléaires. L'amphiphysine 2/BIN1 pourrait donc être une cible dans les pathologies musculaires. Ils pourraient de plus, pour la première fois, faire le lien entre BIN1 mutée dans les ARCNM et MTM1 mutée dans les XLCNM, puisque nous venons de montrer

## Résultats

---

que BIN1 est capable de lier le PtdIns(3)P et surtout le PtdIns(5)P, un substrat et un produit de MTM1, respectivement.

### **Publication 3:**

**« Misregulation of alternative splicing of BIN1 is associated with T-tubules and muscle alterations in myotonic dystrophy. »**

Caroline Hammer\*, Ludovic Guigou\*, Arnaud Klein\*, Charlotte Fugier, Anne Toussaint, Valérie Tosch, Alban Vignaud, Arnaud Ferry, Pierre de la grange, Charlotte Boulade-Ladame, Yosuke Kokunai, Doulaye Dembele, Marie-Christine Hummel, Virginie Francois, Nadia Messaddeq, Nicolas Sergeant, Annie Laquerrière, Bjarne Udd, Guillaume Bassez, Francois Deryckere, Christelle Thibault, Didier Auboeuf, Luis Garcia, Masanori P. Takahashi, Jocelyn Laporte, Denis Furling et Nicolas Charlet-Berguerand.

**Misregulation of alternative splicing of BIN1 leads to T-tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy.**

Caroline Hammer<sup>1\*</sup>, Arnaud Klein<sup>2\*</sup>, Charlotte Fugier<sup>1\*</sup>, Anne Toussaint<sup>1</sup>, Valérie Tosch<sup>1</sup>, Alban Vignaud<sup>2</sup>, Arnaud Ferry<sup>2</sup>, Pierre de la Grange<sup>3</sup>, Charlotte Boulade-Ladame<sup>4</sup>, Yosuke Kokunai<sup>13</sup>, Doulaye Dembele<sup>1</sup>, Marie-Christine Hummel<sup>1</sup>, Virginie Francois<sup>2</sup>, Nadia Messaddeq<sup>1</sup>, Nicolas Sergeant<sup>5</sup>, Annie Laquerrière<sup>6</sup>, Benedikt Schoser<sup>7</sup>, Bjarne Udd<sup>8-10</sup>, Guillaume Bassez<sup>11</sup>, François Deryckere<sup>4</sup>, Christelle Thibault<sup>1</sup>, Didier Auboeuf<sup>12</sup>, Luis Garcia<sup>2</sup>, Masanori P. Takahashi<sup>13</sup>, Jocelyn Laporte<sup>1</sup>, Denis Furling<sup>2</sup>, Nicolas Charlet-B.<sup>1#</sup>

1 IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire), INSERM U964, CNRS UMR7104, Strasbourg University, 67400 Illkirch, France.

2 Université Pierre et Marie Curie-Paris6, Institut de Myologie, UM76 and INSERM, U974 and CNRS, UMR 7215, Paris, F-75013, France.

3 GenoSplice technology, Hôpital Saint-Louis, 75010 Paris, France.

4 CNRS UMR7175, Université Louis Pasteur, Oncoprotéines, ESBS, 67400 Illkirch, France.

5 INSERM U837-1, JPARC, Alzheimer and Tauopathies, 59045 Lille, France.

6 Pathology Laboratory, University Hospital of Rouen, 76031 Rouen, France.

7 Department of Neurology, Friedrich Baur Institute, Ludwig Maximilian University Munich, 80336 Munich, Germany.

8 Neuromuscular Research Center, Tampere University, Tampere, Finland.

9 Folkhälsan Institute of Genetics, Department of Medical Genetics, Helsinki University.

10 Department of Neurology, Vasa Central Hospital.

11 INSERM U841, Mondor Biomedical Research Institute, Paris XII University, France.

12 INSERM U590, Centre Léon Bérard, 69008 Lyon, France.

13 Department of Neurology, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan

\* These authors contributed equally to the work

# Correspondence to: Nicolas Charlet-Berguerand, Department of Neurobiology and Genetics, IGBMC, 1 rue Laurent Fries, Illkirch, F-67400, France. Tel: +33 388 653 309, Fax : +33 388 653 201, Email : ncharlet@igbmc.fr

## INTRODUCTORY PARAGRAPH

Myotonic dystrophies (DM), the most common adult muscular dystrophy, are the first recognized examples of RNA-mediated diseases in which expression of mutant RNAs containing expanded CUG or CCUG repeats interfere with the splicing of other mRNAs. Using whole-genome microarrays, we found that alternative splicing of the *BIN1* mRNA is altered in DM skeletal muscle tissues, resulting in the expression of an inactive form of BIN1 deprived of phosphoinositide-binding and membrane-tubulating activities. BIN1 is involved in tubular invaginations of the plasma membrane and is essential for biogenesis of the muscle T-tubules, which are specialized skeletal muscle membrane structures essential to correct excitation-contraction (E-C) coupling. Mutations in the *BIN1* gene cause centronuclear myopathy (CNM) that shares some histopathological features with DM, and both diseases are characterized by muscle weakness. Consistent with a loss-of-function of BIN1, muscle T-tubules were altered in DM patients, and membrane tubulation was restored upon expression of the correct splicing form of BIN1 in DM muscle cells. By deciphering the mechanism of *BIN1* splicing mis-regulation we demonstrate that the splicing regulator, MBNL1, which is sequestered by expanded CUG and CCUG in DM, binds the *BIN1* pre-mRNA and regulates directly its alternative splicing. Finally, reproducing *BIN1* splicing alteration in mice is sufficient to reproduce the DM features of T-tubule alterations and muscle weakness. We propose that alteration of *BIN1* alternative splicing regulation leads to muscle weakness, a predominant pathological feature of DM.

## TEXT

Myotonic dystrophies (DM), the most common adult-onset muscular dystrophy, comprise two genetically distinct forms: type 1 (DM1) is caused by a CTG-repeat expansion ranging from ~50 to 1000 repeats in the 3' non-coding region of the *DMPK* gene<sup>1-3</sup>, and type 2 (DM2) is caused by expansions of CCTG repeats in the first intron of the *ZNF9* gene<sup>4</sup>. Furthermore, CTG expansions over 1000 repeats are associated with the severe congenital CDM1 form.

DM is caused by the expression of RNAs containing expanded CUG or CCUG repeats that interfere with the splicing of other pre-mRNAs through dysfunction of two classes of RNA binding proteins<sup>5-7</sup>. Members of the muscleblind-like (MBNL) family are sequestered within nuclear RNA aggregates formed by expanded CUG and CCUG repeats<sup>8-10</sup>, whereas the expression and phosphorylation of the CUG-binding protein 1 (*CUGBP1*) were reported to be increased in DM1 patients<sup>11-13</sup>. MBNL1 and CUGBP1 are antagonistic RNA splicing factors, and altering their functional levels in DM tissues results in reversion to embryonic splicing patterns for various mRNAs, such as the muscle chloride channel *CLCN1* and the insulin receptor *INSR*, resulting in myotonia and insulin resistance, respectively<sup>13-15</sup>.

However, the cause of the progressive muscle weakness, which is a cardinal symptom of DM, remains ill-defined. Strikingly, the histopathological features of early DM1 and CDM1 patients (ie: muscle fiber atrophy with centrally located nuclei in absence of regeneration) are similar to those of centronuclear myopathy (CNM)<sup>16</sup>. CNM's are caused by mutations in myotubularin (*MTM1*), dynamin 2 (*DNM2*) and Bridging integrator 1 (*BINI*/ Amphiphysin 2) genes<sup>17-19</sup>. BIN1 is a protein specialized in membrane curvature<sup>20</sup>, whose function is regulated by alternative splicing<sup>21-23</sup> (Fig. 1a and S1b). In skeletal muscles, inclusion of the muscle-specific exon 11, which encodes a phosphoinositide-binding (PI) domain<sup>24</sup>, generates an isoform of BIN1 that induces tubular invaginations of the plasma membrane and is implicated in T-tubules biogenesis<sup>24</sup>. The muscle T-tubule network is a specialized membrane structure fundamental for correct excitation-contraction (E-C) coupling, and the disruption of *BINI* in *Drosophila melanogaster* leads to severely disorganized T-tubules and defects of the E-C coupling machinery of skeletal muscles<sup>25</sup>.

Using whole-genome microarrays, we identified a robust mis-regulation of *BINI* mRNA

alternative splicing in primary cultures of CDM1 muscle cells (Fig. S1a). We confirmed by RT-PCR that exon 11 of *BINI* is skipped in skeletal muscles of DM patients, and found that *BINI* mis-regulation is correlated with disease severity since inclusion of the exon 11 is more mis-regulated in the severe congenital DM1 form (CDM1) than in the milder adult DM1 and DM2 forms (Fig. 1b-c). As described for other mis-regulated splicing events identified in DM, alteration of *BINI* exon 11 splicing reproduces an embryonic situation (Fig. S1e-f). Mis-regulation of *BINI* exon 11 was not a result of global splicing alterations since we found no splicing alterations in *MTM1*, *DNM2* or of brain-specific exons 13 to 16 of *BINI* in DM (data not shown). Western blot analysis validated the reduction in BIN1 protein form expressing exon 11 in CDM1 patients and confirmed that this splicing mis-regulation did not alter the global level of BIN1 protein expression (Fig. 1d).

CUG and CCUG repeats alter RNA splicing through dysfunction of the splicing factors MBNL1 and CUGBP1. To determine the mechanisms underlying alterations in *BINI* splicing, we constructed a minigene containing *BINI* exon 11 with its bordering intronic regions and co-expressed it with expanded CUG or CCUG repeats (Fig. 2a and S2a-b). Co-expression of expanded CUG or CCUG repeats reproduced DM situation and repressed exon 11 inclusion. In contrast, co-expression of a plasmid expressing the 3'UTR of DMPK containing no CTG repeats has no effect indicating that expression of CUG or CCUG repeats is sufficient to induce *BINI* splicing alteration. Next, we found that depletion of MBNL1 by siRNA mimicked the effect of CUG or CCUG repeats and promoted exon 11 exclusion whereas over-expression of MBNL1 stimulated exon 11 inclusion (Fig. 2a). In contrast, over-expression or depletion of CUGBP1 had little or no effect on exon 11 inclusion, suggesting that the depletion of MBNL1 alone is sufficient to reproduce the alteration of *BINI* splicing (Fig 2a and S2b). Consistent with the recently established crystal structure of MBNL1<sup>26</sup>, we found that MBNL1 binds a 20 nt-long single stranded RNA located downstream of the exon 11 and containing four YGC motifs regularly spaced (Fig. 2b and Fig. S2c). This MBNL1 binding site is functional as mutations of two of the four YGC motifs abrogated MBNL1 binding and abolished the effects of MBNL1 over-expression or depletion (Fig. 2c). Importantly, this mutated *BINI* minigene, which no longer responds to MBNL1, is insensitive to over-expression of expanded CUG or CCUG repeats (Fig. 2c), demonstrating that the trans-dominant effect of CTG and CCTG repeats on splicing mis-regulation requires a functional MBNL1 binding site. Finally, the binding of MBNL1 on this sequence could be competed by excess of non-labeled expanded CUG repeats (Fig. 2d), reproducing *in vitro* the



proposed model of DM pathogenesis in which excess of expanded CUG or CCUG repeats reduced the quantity of free MBNL1 and consequently, the binding of MBNL1 to its physiological targets.

BIN1 protein is involved in membrane curvature and T-tubule biogenesis in muscle<sup>19,24</sup>. To investigate the consequences of *BIN1* splicing alteration found in DM patients, we first examined the effect of exon 11 exclusion on the tubulating activity of BIN1. As previously observed<sup>19,24</sup>, over-expression of normal muscle BIN1 (+ex11) isoform in muscle cells induced numerous narrow tubular membrane structures. In contrast, no tubular structures were observed with the DM splicing isoform (-ex11) (Fig. 3a and S3a). Next, we found that BIN1 deprived of its exon 11 has lost its ability to bind to membrane in liposome binding assay (Fig. S3b), demonstrating that the splicing form of BIN1 expressed in DM patients has lost most of its membrane binding and tubulating properties. The muscle-specific exon 11 encodes a phosphoinositide-binding domain<sup>24</sup>, thus, we tested the phosphoinositide-binding activities of control and DM BIN1 isoforms. The normal muscle BIN1 isoform (+ex11) recognized mostly phosphatidylinositol-5-phosphate (PtdIns5P) in lipid dot-blot assays, whereas the DM isoform of BIN1 (-ex11) has lost most of its ability to bind to phosphoinositides (Fig. 3b and S3c). We confirmed preferential binding of BIN1 (+ex11) to PtdIns5P in muscle cells (Fig. S3d). Since mutations in the MTM1 phosphatase, the enzyme responsible of PtdIns5P production<sup>27</sup>, cause CNM<sup>17</sup>, we propose that this phosphoinositide may constitute a functional link between BIN1 and MTM1 (Fig. S6).

In skeletal muscle, BIN1 is involved in the organization of the T-tubule network, a specialized membrane structure fundamental for correct excitation-contraction coupling. Thus, we have tested whether endogenous BIN1 and T-tubule organizations are altered in skeletal muscles of DM patients. We found that BIN1 is organized in transversal projections that overlie sarcomeres periodically in non-DM individuals, whereas such organization is lost and BIN1 is mostly diffuse in age-matched CDM1 patients (Fig. 4a and S4a). Furthermore, immunofluorescence analysis of DHPR, a major component of T-tubules, show alteration of its organization in CDM1, while the localization of the Z-disk markers desmin was normal (Fig. 4a). Next, ultrastructural analysis confirmed that T-tubules are altered in muscles of DM1 patients with the presence of irregular and/ or longitudinally orientated tubules (Fig. 4b). Furthermore, large vesicles adjacent to T-tubules were also observed (Fig. S4b). Finally, consistent with a loss of function of BIN1, very few tubular membrane structures were

observed in differentiated myoblasts isolated from CDM1 patients, whereas numerous tubules were observed in control myotubes (Fig. 4c). To test whether tubulation defects observed in DM can be restored, CDM1 myotubes were transduced with an adenovirus expressing either the normal (+ex11) or DM (-ex11) BIN1 isoform. BIN1+ex11 induced numerous tubular membrane structures in CDM1 myotubes whereas expression of the DM splicing variant of BIN1 (-ex11) did not (Fig. 4d), suggesting that tubules are mis-organized in DM muscles and that expression of the correct splice form of BIN1 is sufficient to induce normal tubulation.

Various altered splicing events have been reported in DM, questioning the importance of BIN1 mis-regulation. To test the contribution of *BIN1* splicing alteration in the DM muscular phenotype, we artificially forced exon 11 skipping in mouse skeletal muscle using an exon-skipping strategy<sup>28</sup>. An antisense oligonucleotide that specifically promotes the skipping of exon 11 of *Bin1* was cloned into a modified U7-snRNA/ adeno-associated virus (AAV)-based vector<sup>28</sup> (Fig. 5a and S5a). The tibialis anterior muscles of wild-type newborn mice were transduced by AAV and analyzed 4 months later. U7-exon 11 antisense (U7-ex11AS) injected muscles reproduced the splicing alteration of *BIN1* observed in DM patients, with specific skipping of *Bin1* exon 11, but no alteration of the global expression of *Bin1* (Fig. 5b, S5g). Importantly, alteration of *Bin1* splicing reproduced the loss of BIN1 organization in transversal projections (Fig. 5c), the alteration of T-tubules (Fig. 5d and S5d) and the muscle weakness (Fig. 5e) observed in DM patients. We noted that the extent of muscle weakness correlated with the degree of exon 11 skipping (Fig. S5c), suggesting a direct link between *Bin1* splicing mis-regulation and muscle alteration. Importantly, muscle weakness was apparent while no major degeneration of the muscle fibers (Fig. S5d) and no muscle mass loss (Fig. 5f) were observed, suggesting that muscle weakness precede muscle atrophy. Next, we observed similar muscle weakness when TA muscle of adult mice were injected (Fig. S5e), suggesting that BIN1 is not only required for the correct organization of the T-tubule network during its maturation in newborn mice, but also to maintain correct T-tubule structures during adult life. Finally, we found that DHPR $\alpha$ 1, RYR1 and SERCA1 expressions were downregulated in TA muscles injected with the exon 11 antisense virus (Fig. S5g), suggesting that mis-regulation of *Bin1* splicing is sufficient to mis-organize the T-tubule network, leading to alteration of key regulators of the excitation-contraction coupling process, which ultimately results in muscle weakness.

In conclusion, our results suggest a model (Fig. S6) in which alternative splicing of the *BIN1*

mRNA is regulated by the MBNL1 splicing factor. Sequestration of MBNL1 by expanded CUG or CCUG repeats in CDM1, DM1 and DM2 patients results in expression of a splicing form of *BIN1* unable to bind and to tubulate the plasma membrane. Expression of this inactive form of BIN1 disorganized the T-tubule network and altered the excitation-contraction coupling machinery, which ultimately lead to skeletal muscle weakness in DM patients.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Tom Cooper for the gift of the  $\beta$ -globin 4.11.12, DMPKS, DT960 and tgCUGBP1 plasmids, Laura Ranum for the gift of the CCTG300 expression plasmid, Christiane Branlant for the gift of the pGEX-MBNL1- $\Delta$ 101 vector, Maurice Swanson for the gift of the pGEX-6P-MBNL1-His vector, Karen Anderson and Phill Hawkins for the gift of the GFP-PLC $\gamma^{(PH)}$  and GFP-P40 $^{(PX)}$  constructs, Or Gozani for the gift of the GFP-ING2 $^{(PHD)}$  vector, Zhigang Xue for the gift of the synemin antibody and all members of the French DM Network for fruitful discussion.

This work was supported by INSERM AVENIR (NCB), ANR GENOPAT (P007942) (NCB), AFM funding (MNM1-12982) (NCB), JSPS KAKENHI (20590998) (MPT).

## **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

Experiments were performed by H.C., L.G., K.A., F.C., T.A., T.V., V.A., F.A., B.C., Y.K., H.MC., F.V. and M.N. Bioinformatic analysis were performed by H.C., D.D. and LG.P. Clinical samples and patient data were obtained from S.N., L.A., U.B., B.G., T.M. and D.F. Data were collected and analyzed by U.B., D.F., T.C., A.D., G.L., T.M., L.J., F.D. and CB.N. The study was designed and coordinated by F.D. and CB.N. The paper was written by CB.N.

## FIGURE LEGENDS

### Figure 1.

*BINI* exon 11 is skipped in DM skeletal muscle. (a) Exon structure and protein domains of human BIN1. N, N-terminal amphipathic helix; BAR: BIN1/ Amphiphysin/Rvs167; PI: PhosphoInositide-binding domain; CLAP: CLathrin-Associated Protein binding domain; MBD: Myc-Binding Domain; SH3, Src Homology 3. The skeletal muscle-specific splicing form of BIN1 lacks the brain-specific CLAP domain, but includes the muscle-specific PI-binding domain that is encoded by the exon 11<sup>21, 22, 23, 24</sup>. (b) Representative RT-PCR analysis of endogenous *BINI* mRNA from human skeletal muscle biopsies of normal individuals (Control), CDM1, DM1 and DM2 patients. Total RNA isolated from homogenized skeletal muscle was subjected to RT-PCR analysis using primers located within *BINI* exon 10 (FWD: 5'-agaacctcaatgatgtgctgg-3') and *BINI* exon 12 (REV: 5'-tcgtggttgactctgatctcgg-3'). PCR products from *BINI* plus and minus exon 11 mRNAs, which are 208 and 163 bp, respectively, were electrophoretically separated on 6% nondenaturing polyacrylamide gels and quantified using a PhosphorImager. (c) Graphical representation of RT-PCR analysis depicting percentage of *BINI* mRNA + exon 11 of normal, non-DM myopathies (Amyotrophic Lateral Sclerosis), CDM1, DM1 and DM2 individuals. (d) Representative western-blotting analysis of endogenous BIN1 protein from skeletal muscle samples of normal and age-matched CDM1 fetuses. Upper panel, BIN1 was detected with antibody R2406 directed against exon 11<sup>19</sup>. Middle panel, BIN1 was detected with pan-isoform antibody 99D (Upstate) directed against exon 17. Lower panel, equal loading was monitored by Coomassie staining. Similar results were obtained in four independent experiments.

## Figure 2.

Overexpression of expanded CUG repeats reproduces the mis-regulation of *BINI* alternative splicing. **(a)** A human *BINI* minigene containing the exon 11 bordered by 235 nts of its upstream intron 10 and 226 nts of its downstream intron 11 was co-expressed in C2C12 cells with plasmids expressing a *DMPK* minigene lacking CTG repeats (control) or containing 960 CTG repeats (CUG)<sup>960x</sup>, MBNL1, CUGBP1, or with siRNA directed against *MBNL1* or against *CUGBP1*. C2C12 were differentiated 48 hours and total RNA was isolated and subjected to RT-PCR analysis using primers (FWD: 5'-cattcaccacattggtgtgc-3', REV: 5'-aagtgatcctagactagccgcc-3') specific to the *BINI* minigene. PCR products of mRNAs including and excluding exon 11 are 345 and 300 bp, respectively. The means of at least three independent transfections is depicted as the percentage of mRNAs including exon 11. Error bars indicate s.e.m. **(b)** MBNL1 specifically binds to a region downstream of exon 11. Upper panel, the RNAs derived from *BINI* minigene include non-overlapping segments (A–E) of 58, 45, 43, 51 and 63 nucleotides, respectively. Middle panel, UV-cross-linking assays were performed using 0,5 µg purified bacterial recombinant GST-MBNL1-HIS and uniformly <sup>32</sup>P-labeled RNAs. Lower panel, sequences of wild-type (D) and mutant (Dmut) RNA. The four YGC motifs recognized by MBNL1 are indicated in bold upper-case (Fig. S2c-g). Mutations are indicated in grey lower-case. **(c)** Mutation of the MBNL1 binding sites within the *BINI* minigene abolishes its sensitivity to expanded CUG transcripts and to MBNL1. *BINI* minigene was mutated such as fragment D was replaced by Dmut and analyzed as in (a). **(d)** UV-cross-linking binding of MBNL1 to uniformly <sup>32</sup>P-labeled RNA D is competed by increasing amounts of unlabeled RNA containing 95 CUG repeats, which is consistent with similar affinity for CUG repeats (~2 nM) and *BINI* RNA (~7 nM) as measured by gel-shift assays (Fig S2d).

**Figure 3.**

The splicing form of BIN1 expressed in DM patients is unable to bind phosphoinositides and to tubulate membranes. **(a)** Representative images from confocal projections of differentiated C2C12 cells transfected with cDNA constructs encoding control (+ex11) or DM (-ex11) isoform of BIN1 fused to GFP. Scale bar: 10  $\mu$ m. Similar results were obtained in COS1 cells and in non-differentiated C2C12 cells (Fig. S3a). **(b)** Binding of purified bacterial recombinant full-length GST-tagged BIN1 control (+ex11) and DM (-ex11) isoform to PIP arrays (Echelon Biosciences) containing the serial dilutions of the indicated PtdInsPs. BIN1 was detected by immunoblot using the pan-isoform antibody 99D (Upstate). Similar results were obtained using recombinant full-length HIS-tagged BIN1 (Fig. S3c).



**Figure 4.**

BIN1 localization and T-tubule structures are altered in DM patients. **(a)** Representative confocal images of longitudinal frozen sections of skeletal muscles from control and CDM1 fetus. Immunofluorescence labeling shows that the normal organization of both BIN1 (99D, Upstate) and of DHPR (Chemicon) in transversal-orientated structures is altered in CDM1, while control immunofluorescence shows normal or near-normal localization of the Z-disk marker desmin, suggesting specific alterations of T-tubules in DM. Scale bars: 10  $\mu\text{m}$ . **(b)** Electron microscopy of longitudinal sections of skeletal muscle biopsies obtained from adult control and DM1 patients demonstrates presence of abnormal T-tubule structures in DM1. Scale bars: 200 nm. **(c)** Representative confocal images of FISH coupled to immunofluorescence microscopy of 6 days differentiated human skeletal muscle cells originating from control and CDM1 patients. FISH using a Cy3-(CAG)<sub>7</sub>x PNA probe shows multiple discrete nuclear aggregates of expanded CUG repeats (red labeling) in CDM1 cells. Immunostaining of BIN1 (99D antibody) shows that BIN1 organization in tubular membrane invaginations is lost in CDM1 cells. Nuclei are labeled in blue (DAPI). Scale bars: 10  $\mu\text{m}$ . **(d)** Expression of the control (+ex11) splicing form of BIN1 induces tubular membrane invaginations in CDM1 cells. Representative confocal images of FISH/ IF labeling of CDM1 differentiated skeletal muscle cells transduced (MOI of 1500) with recombinant adenovirus expressing cDNA constructs of control (+ex11) or DM (-ex11) isoform of BIN1 fused to GFP. Scale bars: 10  $\mu\text{m}$ .

**Figure 5.**

Forced skipping of *Bin1* exon 11 in control mice reproduces the alteration of T-tubules observed in DM patients and induces muscle weakness. **(a)** Schematic representation of the U7-exon 11 antisense construct (U7-ex11AS). Tibialis anterior (TA) muscle of wild-type newborn mice were injected with AAV2/1 ( $1.8 \times 10^{13}$  vg/ml) expressing a control or the U7-ex11AS construct and analyzed 4 months after injection. **(b)** RT-PCR analysis using primers located within *Bin1* exon 10 (FWD: 5'-tcaatgatgtcctggtcagc-3') and exon 12 (REV: 5'-gctcatggttcaactctgac-3') demonstrates specific exon 11 skipping in antisense injected mice. PCR products are of 207 (+ex11) and 162 (-ex11) bp, respectively. **(c)** Confocal microscopy analysis of longitudinal frozen sections of TA muscle injected with control- or U7-ex11AS-AAV followed by immunofluorescence labeling of Bin1 (99D antibody) shows that the normal organization of Bin1 in transversal-orientated structures is lost in antisense injected mice, while localization of the Z-disk marker synemin is normal. Scale bars: 10  $\mu$ m. **(d)** Electron microscopy analysis of longitudinal sections of TA muscle from control- or U7-ex11AS-AAV injected mice shows abnormal T-tubule structures in antisense injected mice. **(e-f)** Measures of the absolute maximal isometric tetanic force and of the muscle weight of isolated TA muscle from control- or U7-ex11AS-AAV injected mice demonstrates a significant 20% decrease of the muscle force in antisense injected mice, but no significant changes in the muscle mass.

## METHODS

**Human Exon 1.0 ST Array profiling and analysis.** Total RNA of control and CDM1 primary culture of muscle cells differentiated into myotubes was extracted using RNeasy columns (Qiagen). RNA quality was verified by analysis on the 2100 Bioanalyzer (Agilent). All samples displayed a 28S/18S ratio >1.5 and RNA Integrity Number > 9.0. Biotinylated cDNA targets were prepared and hybridized according to the GeneChip® Whole Transcript (WT) Sense Target Labeling Assay Manual (P/N 701880 Rev.2, Affymetrix, Santa Clara, USA), using 2 µg of total RNA as starting material. Hybridization was performed on GeneChip® Human Exon 1.0 ST array using 5 µg of biotinylated target at 45°C for 16 hours. The chips were washed and stained in the GeneChip® Fluidics Station 450 (Affymetrix) using the FS450-0001 script. The arrays were scanned with the GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix) and raw data (.CEL Intensity files) were extracted from the scanned images using the Affymetrix GeneChip® Operating Software (GCOS) version 1.4. Data were analyzed using Xray (biotique Systems) and the EASANA visualization module (GenoSplice technology). Data are available in the GEO database <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo> under the accession number ---.

**BIN1 minigenes construction and analysis.** 229 nucleotides of upstream intron 10, BIN1 exon 11 and 220 base pairs of downstream intron 11 (NT\_022135.16) were PCR amplified from human DNA (Clontech), and inserted between the HincII and BamHI restriction sites of the beta-globin 4.11.12 vector (gift from Tom Cooper). Next, the last 325 base pairs of intron 11 followed by BIN1 exon 12 were similarly amplified and inserted between the BamHI and NcoI restriction sites to replace the last beta-globin exon. Mutations in BIN1 intron 11 were introduced by primer-directed PCR mutagenesis. C2C12 cells plated in 6-well plates were co-transfected using JetPei (Polyplus Transfection) according to the manufacturer's instructions with the BIN1 minigene and DMPKS, DT960, tgCUGBP1 (NM\_006560), pcDNA-MBNL1 40 kDa (NM\_207292), siRNA (Eurogentec) directed against MBNL1 (5'-aacacggaauguaaaauugcadttdt-3') or against CUGBP1 (5'-guuacgacaauccuguuucdttdt-3') in DMEM medium containing 1g/l glucose supplemented with 2% horse serum and gentamycin (37°C, 5%CO<sub>2</sub>) during 24 hours. Total RNAs were extracted using RNeasy kit (Qiagen) and subjected to reverse-transcription using SuperScriptII Reverse Transcriptase (Invitrogen). PCR were performed using Taq polymerase (Roche), one denaturation step at 94° C for 2 min,

23 cycles of amplification 94°C for 1min, 58°C for 1 min, 72°C for 1 min, and a final step at 72°C for 7 min using the forward primer 5'-cattcaccacattggtgtgc-3' and the reverse primer 5'-aagtgatcctagactagccgcc-3' specific to the  $\beta$ -globin-*BINI* minigene. PCR products were precipitated, analyzed by eletrophoresis on a 6,4 % polyacrylamide gel, BET labelled and quantified using a Typhoon scanner (Molecular Dynamics).

***In vivo* gene transfert.** All animal procedures were performed according to institution-approved protocol and under appropriate biological containment. The U7-ex11AS construct and AAV production were done as previously described<sup>28</sup>. The tibialis anterior (TA) muscles of newborn (10 days-old) or adult (2 months-old) C57/B6 mice were injected with respectively 10 or 50  $\mu$ l of physiological solution containing the AAV2/1 vectors ( $1.8 \times 10^{13}$  vg/ml). For each mouse, one TA muscle was injected with AAV (U7-ex11AS) and the contra-lateral muscle was injected with control AAV containing any transgene or vehicule alone. 4 months after injections, mice were sacrificed, muscles were collected, snap-frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane and stored at -80°C.

***In situ* force measurement.** The isometric contractile properties of tibialis anterior muscles (TA) were studied *in situ* as previously described (Mouisel E. et al., 2006). Mice were anesthetised with pentobarbital (60 mg/kg). The knee and foot were fixed using clamps and pins. The distal tendon of the TA muscle was attached to a lever arm of a servomoteur system (305B, Dual-Mode Lever, Aurora, Canada). All data provided by the servomoteur system were recorded and analysed on a microcomputer, using PowerLab system (4SP, ADInstruments, Paris, France) and software (Chart 4, ADInstruments). The sciatic nerve (proximally crushed) was stimulated by bipolar silver electrode using 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 25-150Hz, train of stimulation of 500 ms). Specific P0 (P0) was calculated by dividing P0 by muscle weight.

## REFERENCES

1. Brook, J.D. et al. Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 68, 799–808 (1992).
2. Fu, Y.H. et al. An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* 255, 1256–1258 (1992).
3. Mahadevan, M. et al. Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science* 255, 1253–1255 (1992).
4. Liquori, C.L. et al. Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science* 293, 864–867 (2001).
5. Philips, A.V., Timchenko, L.T. & Cooper, T.A. Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science* 280, 737–741 (1998).
6. Mankodi, A. et al. Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science* 289, 1769–1773 (2000).
7. Seznec, H. et al. Mice transgenic for the human myotonic dystrophy region with expanded CTG repeats display muscular and brain abnormalities. *Hum. Mol. Genet.* 10, 2717–2726 (2001).
8. Miller, J.W. et al. Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)<sub>n</sub> expansions associated with myotonic dystrophy. *EMBO J.* 19, 4439–4448 (2000).
9. Kanadia, R.N. et al. A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science* 302, 1978–1980 (2003).
10. Ho, T.H. et al. Muscleblind proteins regulate alternative splicing. *EMBO J.* 23, 3103–3112 (2004).
11. Kuyumcu-Martinez, N.M., Wang, G.S. & Cooper, T.A. Increased steady-state levels of CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation. *Mol Cell.* 28, 68–78 (2007).
12. Timchenko, N.A. et al. RNA CUG repeats sequester CUGBP1 and alter protein levels and activity of CUGBP1. *J. Biol. Chem.* 276, 7820–6 (2001).
13. Savkur, R.S., Philips, A.V. & Cooper, T.A. Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat. Genet.* 29, 40–47 (2001).
14. Mankodi, A. et al. Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of ClC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. *Mol. Cell* 10, 35–44 (2002).

15. Charlet, B.N. et al. Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol. Cell* 10, 45–53 (2002).
16. Jungbluth, H., Wallgren-Pettersson, C. & Laporte, J. Centronuclear (myotubular) myopathy. *Orphanet J Rare Dis.* 3, 1-13 (2008).
17. Laporte, J. et al. A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast. *Nat. Genet.* 13, 175–182 (1996).
18. Bitoun, M. et al. Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nat. Genet.* 37, 1207–1209 (2005).
19. Nicot, A.S. et al. Mutations in amphiphysin 2 ( BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy. *Nat Genet.* 39, 1134-9 (2007).
20. Peter, B.J. et al. BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science* 303, 495–499 (2004).
21. Butler, M.H. et al. Amphiphysin II (SH3P9; BIN1), a member of the amphiphysin/Rvs family, is concentrated in the cortical cytomatrix of axon initial segments and nodes of ranvier in brain and around T tubules in skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 137, 1355–1367 (1997).
22. Ramjaun, A.R., Micheva, K.D., Bouchelet, I. & McPherson, P.S. Identification and characterization of a nerve terminal-enriched amphiphysin isoform. *J. Biol. Chem.* 272, 16700–16706 (1997).
23. Wechsler-Reya, R., Sakamuro, D., Zhang, J., Duhadaway, J. & Prendergast, G.C. Structural analysis of the human BIN1 gene. Evidence for tissue-specific transcriptional regulation and alternate RNA splicing. *J. Biol. Chem.* 272, 31453–31458 (1997).
24. Lee, E. et al. Amphiphysin 2 ( BIN1) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science* 297, 1193–1196 (2002).
25. 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.* 15, 2967–2979 (2001).
26. Teplova, M. & Patel, D.J. Structural insights into RNA recognition by the alternative-splicing regulator muscleblind-like MBNL1. *Nat Struct Mol Biol.* 15, 1343-51.(2008).
27. Tronchère, H. et al. Production of phosphatidylinositol 5-phosphate by the phosphoinositide 3-phosphatase myotubularin in mammalian cells. *J Biol Chem.* 279, 7304-12 (2004).
28. Goyenvallé A. et al., Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science.* 306, 1796-9 (2004).

## Misregulation of alternative splicing of BIN1 leads to T-tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy.

### SUPPLEMENTAL FIGURE 1.

(a) Skeletal muscle cell cultures derived from control and age-matched CDM1 patients were differentiated into myotubes for 10 days, RNA was extracted from three independent cultures and hybridized on Human Exon 1.0 ST Array (Affymetrix), data were analyzed using XRAY software (Biotique systems) and visualized using FAST-DB database (<http://www.fast-db.com/>). Top 5 predicted splicing alterations (*BIN1*, *MYOM1*, *NCAM1*, *DOCK11*, *KIF1B*) were tested by RT-PCR, and we confirmed robust splicing alteration of *BIN1*, *MYOM1* and *NCAM1* pre-mRNAs. Among the various predicted mis-regulated targets, we also tested and confirmed splicing alteration of *ATP2A2* (top 30) and *PDLIM5* (top 50) pre-mRNAs.

✓ Myomesin (*MYOM1*) is a 185 kDa muscle protein which binds to myosin and titin, and is one of the main structural component of the sarcomeric M-band. Myomesin alternative exon 18 (also called exon EH) is included in embryonic heart and in slow skeletal muscle fibers (Agarkova et al., 2004), where it increases the elasticity of the myomesin protein (Bertoncini et al., 2005).

✓ Neural cell adhesion molecule 1 (*NCAM1*) is found predominantly during development in nervous tissue and in developing muscle where it participates in muscle innervation and myogenesis through myoblast fusion (Dickson et al., 1990). Inclusion of the alternative exon 20 introduces a polyadenylation signal, which results in a shorter 125-kDa *NCAM1* isoform, the expression of which correlates with muscle differentiation, and when overexpressed in transgenic mice, enhances myoblast fusion (Fazeli et al., 1996).

✓ PDZ and LIM domain 5 (*PDLIM5*) belong to a family of adaptor proteins that interact with alpha-actinin and have an important role in maintaining Z-disc stability in striated muscle (Zhou et al., 2001). Alternative splicing of the exon 9 introduces a polyadenylation signal, resulting in a shorter *PDLIM5* isoform. Note that alterations of the alternative splicing of *APL* (*PDLIM3*) and of *ZASP/Cypher/Ldb3* (*PDLIM6*) pre-mRNAs in DM patients or CUG expressing mice have been reported previously (Lin et al., 2006), suggesting a coordinated mis-regulation of the *PDLIM* family by alternative splicing in DM.

✓ *ATP2A2* (*SERCA2*) encodes an ion pump that translocates calcium from the cytosol into the sarcoplasmic reticulum lumen of muscle cells, and is involved in regulation of the excitation-contraction coupling. Alternative splicing of the intron 20 introduces a



polyadenylation signal, resulting in a shorter ATP2A2 isoform. Alterations of the alternative splicing of both *ATP2A1* and *ATP2A2* pre-mRNAs in Myotonic Dystrophic patients have been reported previously (Kimura et al., 2005; Lin et al., 2006). Mis-regulation of the splicing of *ATP2A1*, *ATP2A2* and *RYR1* pre-mRNAs in DM results in subtle modifications of the channel-properties of these proteins (Kimura et al., 2005), which are probably not sufficient to explain the muscle weakness in DM, but point toward an alteration of the calcium homeostasis and/or of the excitation-contraction coupling in DM. A model consistent with an alteration of BIN1 and the t-tubule network in DM patients (see below and Figure S6).

**(b)** Lastly and topic of this study, BIN1 is involved in membrane remodeling, has a role in organization of muscle T-tubules and is mutated in autosomal recessive centronuclear myopathy (Nicot et al., 2007). Mammals possess two amphiphysin genes, amphiphysin 1 and amphiphysin 2 (*BINI*). Amphiphysin 1 is a neuronal protein enriched in nerve terminals and is involved in endocytosis (David et al, 1996). In contrast, amphiphysin 2 (BIN1) is widely present in various tissues, but most highly expressed in the brain and striated muscle (Butler *et al*, 1997). *BINI* is extensively regulated by alternative mRNA splicing. All *BINI* splicing forms possess a common NH<sub>2</sub>-terminal BAR domain, by which BIN1 induces membrane curvature, and a common COOH-terminal SH3 domain (Ramjaun and McPherson, 1998), by which BIN1 binds to canonical PxxP sequences of other proteins, such as synaptojanin and dynamin 2 (Wigge and McMahon, 1998). In brain, the splicing form of *BINI* excludes the exon 11, includes the exon 7 (also called exon 6B) of unknown function and the brain-specific exons 13 to 16 (also named exon 12A to 12D) encoding a CLathrin-Associated Protein binding region (CLAP) bearing the clathrin- and AP-2-binding sites, which was why BIN1 has been suggested to be involved in endocytosis (Butler *et al*, 1997; Wigge and McMahon, 1998). In contrast, in skeletal muscle, the splicing form of *BINI* (also called isoform 8) excludes the exon 7 and the exons 13 to 16 (clathrin- and AP-2-binding sites), but includes the muscle-specific exon 11 (named exon 10 in some studies) encoding the basic amino-acid sequence RKKSKLFSRLRRKKN (Ramjaun and McPherson, 1998; Wechsler-Reya *et al*, 1998), which binds to phosphoinositides and is involved in skeletal muscle transverse tubule (T-tubule) biogenesis (Lee *et al.*, 2002). T-tubules are specialized invaginations of the muscle plasma membrane that serve to propagate action potentials to the interior of muscle fibers (Flucher, 1992), ultimately resulting in muscle contraction through Ca<sup>2+</sup> release from the sarcoplasmic reticulum. Therefore, structural alteration of the T-tubule network leads to excitation-contraction coupling dysfunction, ultimately resulting in muscle weakness

(Oddoux et al., 2009; Brotto et al., 2004; Ito et al., 2001).

(c) RT-PCR analysis using primers located within *BINI* exon 6 and 8 confirms Exon 1.0 ST Array prediction and demonstrates a slight increase of the inclusion of the exon 7 in skeletal muscle biopsies of CDM1, DM1 and DM2 patients.

(d) Further RT-PCR experiments using primers located within *BINI* exon 6 and 12 demonstrate that the aberrant inclusion of the exon 7 is independent of the abnormal skipping of the muscle-specific exon 11, thus, resulting in expression of three abnormal splicing forms of *BINI* in skeletal muscles of DM patients: *BINI* plus exon 7 (+ex7+ex11), *BINI* plus exon 7 and minus exon 11 (+ex7-ex11), and *BINI* minus exon 11 (-ex7-ex11). All three isoforms plus the normal *BINI* muscle form (-ex7+ex11) were cloned and tested for tubulation *in cellulo* and for phosphoinositides binding *in vitro* (data not shown). All tests were consistent with no function of the exon 7 for tubulation and phosphoinositides binding, while presence of the exon 11 is required for BIN1 to tubulate membrane and to bind to PtdIns5P. Furthermore, isoforms including the exon 7 were rare in CDM1 to barely detectable in DM1 and DM2, whereas the splicing forms excluding exon 11 were the major forms expressed in CDM1 and early-onset DM1. Therefore we focused our study on *BINI* exon 11.

(e-f) Skipping of the *BINI* exon 11 in DM recapitulates an embryonic situation. RT-PCR analyses demonstrate that the alternative splicing of exon 11 is developmentally regulated with progressive inclusion of the exon 11 during human skeletal muscle development. Similar results were obtained using an antibody directed specifically against exon 11 (data not shown). Finally, progressive inclusion of exon 11 during normal muscle development but not in age-matched CDM1 patients, was confirmed by real-time RT-PCR using primers in the ubiquitous exon 1 (fwd: 5'-gagatgggcagtaaagg-3') and 2 (Rev: 5'-cttggtgaaattctggacgca-3') to quantify the total amount of *BINI*, and primers in exon 10 (Fwd: 5'-aatgatgtgctggtcggcct-3') and exon 11 (Rev: 5'-gttcttcttctgcgagcc-3') to quantify *BINI* exon 11.

(g) Skipping of *BINI* exon 11 in DM1 patients correlates with abnormal splicing of Dystrophin exon 78, an exon previously shown to be skipped in embryonic muscle and in DM patients (Nakamori et al., 2007), suggesting that a common mechanism may contribute to their splicing alterations.

## SUPPLEMENTAL FIGURE 2.

(a) Illustration of the human *BINI* minigene and sequence of the fragments tested for MBNL1 binding by UV-crosslinking assays. *BINI* exon 11 (fragment B, in capital letters) is bordered by 58 nts of its upstream intron 10 (fragment A) and 157 nts of its downstream intron 11 (fragment C, D and E).

(b) Overexpression of expanded CUG or CCUG repeats, cause of DM1 and DM2, respectively, reproduce the splicing mis-regulation observed in DM, suggesting that both CUG and CCUG act through a similar mechanism. *BINI* minigene was co-transfected in C2C12 cells with control plasmid expressing the 3'UTR of the DMPK gene with no CTG repeats (Control, gift from Tom Cooper), a plasmid expressing 300 CCTG repeats (gift from Laura Ranum), a plasmid expressing 960 CTG repeats (DT960, gift from Tom Cooper), a plasmid expressing MBNL1 or CUGBP1 or with siRNA directed against these mRNAs. We confirmed validity of the MBNL1 and CUGBP1 expressing vectors and siRNA by western-blotting and all regulate alternative splicing of an *INSR* exon 11 minigene (data not shown). However, while expanded CUG, expanded CCUUG and MBNL1 also regulate *BINI* exon 11 inclusion, expression of validated CUGBP1 expression vector or siRNA has no significant effects on *BINI* splicing regulation. Identical results were obtained with *CLCN1*, *Tnnt3* and *ATP2A1* minigenes (Kino et al., 2009; Yuan et al., 2007; Hino et al., 2007), suggesting that only a subset of mis-regulated splicing events in DM are co-regulated by CUGBP1 and MBNL1 (Koshelev et al., 2010), and that the sole sequestration of MBNL1 is sufficient to induce some splicing mis-regulation in DM (Dansithong et al., 2005; Du et al., 2010).

(c) Identification of the MBNL1 binding site on *BINI* intron 11 fragment D by RNase T1 structure probing. RNase T1-cleavage sites protected by MBNL1 are indicated in blue. MBNL1 protect four guanosines (G58, G62, G69 and G76), each one inserted within the single-stranded sequence YGC(U/G)Y, which is close to the MBNL1 binding consensus sequences determined previously (Ho et al., 2004, Goers et al., 2010), and is consistent with the crystal structure analysis of MBNL1 (Teplova and platel., 2008).

(d) Affinities of MBNL1 for expanded CUG (10 repeats), expanded CCUG (10 repeats) and *BINI* intron 11 (fragment D) RNAs were measured by gel-shift assays. Consistent with previous reports (Kino et al., 2004; Warf et al., 2007; Yuan et al., 2007), we found that

MBNL1 displayed similar affinities for both CUG and CCUG repeats ( $K_D$  of 2.0 +/- 0.2 nM and 3.1 +/- 0.1 nM, respectively), explaining the presence of MBNL1 aggregates in both DM1 and DM2 patients. The affinity of MBNL1 for *BINI* RNA was weaker ( $K_D$  of 7 +/- 0.4 nM) but similar to the one described for *Tnnt3*, *TNNT2*, *MBNL1*, *MBNL2* and *ATP2A1* RNAs (Yuan et al., 2007; Warf et al., 2007; Goers et al., 2010), suggesting that expanded CUG and CCUG repeats may efficiently compete the binding of MBNL1 to the *BINI* or its other target RNAs.

(e) Alignment of MBNL1 binding sites within human *BINI*, mouse *Tnnt3* (sTNI) (Yuan et al., 2007), human *TNNT2* (cTNT) (Ho et al., 2004; Warf et al., 2007), human *MBNL1*, *MBNL2* and *ATP2A1* (Goers et al., 2010), reveals presence of four conserved YGC motifs regularly positioned. Importantly, presence of four YGC motifs (or three YGC motifs, the fourth one being a YGU motif) is correlated with a high affinity of MBNL1 for its target RNA ( $K_D < 20$  nM). In contrast, presence of two (*INSR*,  $K_D$  of 120 nM) or only one (*GRINI*,  $K_D$  of 280 nM) YGC motif is correlated with lower affinities for MBNL1. The  $K_D$  of *MBNL1*, *MBNL2*, *ATP2A1*, *INSR* and *GRINI* RNAs are from the study of Goers et al., 2010. Next, we noted that two of the four YGC motifs required for MBNL1 binding were present within the consensus UGCAUGC binding site for Fox splicing factors. Fox-1 and MBNL1 are both enriched in heart, skeletal muscle and brain. Furthermore, we found that Fox binding sites are either close or enclosed within all (but *ATP2A1*, Hino et al., 2007) MBNL1 binding sites presented in figure S2e. Consensus Fox binding motifs are indicated as boxed sequences in the *MBNL1*, *Tnnt3* and *BINI* RNAs in figure S2e, and are located 8 nts upstream of the *INSR* RNA, 87 upstream and 130 nts downstream of the *MBNL2* RNA, 260 nts upstream of the *TNNT2* RNA and 130 nts downstream of the *GRINI* RNA (data not shown). Finally, we found that Fox-1 and Fox-2 regulate alternative splicing of the *BINI* and *INSR* minigenes (data not shown). Overall, these data may facilitate the identification of novel MBNL1 binding sites, and may suggest a mechanism of alternative splicing co-regulation of some exons by the Fox and MBNL proteins.

(f) The protection of four single-stranded regularly spaced YGC motifs within *BINI* RNA is consistent with the other identified RNA targets of MBNL1 (Goers et al., 2010), and with the crystal structure analysis of MBNL1 (Teplova and Platel., 2008), which demonstrate that each zinc finger (Znf3 and Znf4) of MBNL1 binds a single-stranded YGC motif where the guanosine is buried inside the MBNL1 protein. Furthermore, according the alignment of ZnF3

and ZnF4 domains, MBNL1 binding requires a minimal size (>3 nts) between the second and the third YGC motif, and dictates an antiparallel orientation to the bound YGC sequences (Teplova and Patel., 2008), suggesting that the binding of MBNL1 to *BINI* intron 11 provokes a looped RNA conformation, which importance for splicing regulation remains to be determined. Finally, the peculiar architecture of muscleblind zinc fingers suggests that MBNL1 may bind either one looped RNA molecule, or two separated RNA molecules, resulting in MBNL1-mediated inter-strand RNA bridges. Such model, in which MBNL1 may link different RNA molecules containing expanded CUG repeats, could explain the formation of insoluble CUG aggregates and the consequent sequestration of MBNL1.

(g) In contrast to human *BINI*, the mouse *Binl* sequence present only two YGU and no YGC motifs, suggesting that MBNL1 may bind the mouse *Binl* sequence with lower affinity and may regulate weakly the inclusion of the mouse *Binl* exon 11. An hypothesis consistent with the weak *Binl* exon 11 splicing alteration observed in RNA samples of skeletal muscle of mice deficient for MBNL1 (*Mbnl1*<sup>ΔE3/ΔE3</sup> mice, gift from Maury Swanson), or in mice expressing expanded CUG repeats (*HSA*<sup>LR</sup> mice, gift from Charles Thornton and DM300 mice, gift from Genevieve Gourdon).

### SUPPLEMENTAL FIGURE 3.

(a) Representative images from confocal projections of COS1 and non-differentiated C2C12 cells transfected with cDNA constructs encoding control (+ex11) or DM (-ex11) isoforms of *BIN1* fused to eGFP. Expression of the normal muscle *BIN1* (+ex11) isoform in cells induced formation of numerous tubular structures, while the expression of the DM splicing isoform (*BIN1* -ex11) does not. Scale Bars: 10  $\mu$ m.

(b) Liposome pull-down assay demonstrates that 1  $\mu$ g of recombinant purified GST-tagged full length *BIN1*, which includes the exon 11, binds to PtdIns5P enriched liposomes (Echelon Biosciences), while the DM splicing form, which exclude the exon 11, does not. *BIN1* was detected by immunoblot using the pan-isoform antibody C99D (Upstate).

(c) Binding of purified bacterial recombinant full-length HIS-tagged-*BIN1* control (+ex11) and DM (-ex11) isoform to PIP arrays (Echelon Biosciences) containing the serial dilutions of the indicated PtdInsPs. *BIN1* was detected by immunoblot using the pan-isoform antibody C99D. Note that the His-*BIN1* protein induces stronger background signal than GST-*BIN1* probably due to non-specific binding to phosphoinositides through the positive charge of the histidine tag. We observe little binding of full-length GST-or HIS-*BIN1* to PtdIns4P and PtdIns(4,5)P2 compared to a previous study (Lee et al., 2002), probably due to the different *Bin1* constructions used (Full-length in this study versus truncated *BIN1* in Lee et al.), and the absence of PtdIns5P analyzed in Lee et al.

(d) Representative confocal images from human skeletal muscle cells derived from a control individual, differentiated 6 days and transduced with recombinant adenovirus (MOI of 1500) expressing GFP fusion constructs fused to three copy of the PHD domain of ING2, the PX domain of P40 or the PH domain of PLC $\gamma$ , which recognized specifically PtdIns5P, PtdIns3P and PtdIns(4,5)P2, respectively (Gozani et al., 2003). *BIN1* was immunostained using the pan-isoform antibody 99D. Localization of the GFP-P40<sup>(PX)</sup> grip within cytoplasmic vesicles is consistent with the known localization of PtdIns3P in early and late endosomes. Similarly, the labeling of the GFP-PLC $\gamma$ <sup>(PH)</sup> grip is consistent with the known localization of PtdIns(4,5)P2 to the plasmic membrane. In contrast, localization of the GFP-ING2<sup>(PHDx3)</sup> grip demonstrates some co-localization of PtdIns5P within tubular membrane structures containing *BIN1*. Scale bars: 10  $\mu$ m.

#### **SUPPLEMENTAL FIGURE 4.**

**(a)** Quantification of BIN1, DHPR $\alpha$  and desmin immunofluorescence labeling in longitudinal sections of skeletal muscle biopsies from control or age-matched CDM1 patients. Fluorescence intensity as function of distance on the muscle fiber was quantified using ImageJ software and plotted for ten successive bands. CDM1 are represented in red and control in blue. While desmin organization in transversal band is conserved in control and CDM1, the organization of BIN1 is altered in CDM1 patients. Similarly the organization of DHPR $\alpha$  in transversal projections is modified in CDM1, which suggest an alteration of the T-tubule structure.

**(b)** Electron microscopy views of longitudinal sections of skeletal muscle biopsies from adult DM1 patients confirmed immunofluorescence labeling and demonstrated presence of abnormal T-tubule structures (indicated with black arrows) with presence of oblique and longitudinally orientated tubules (i-iv), often disorganized and irregular, either constricted (iv-v) or abnormally enlarged (i-iii). Presence of rare large vesicles (indicated with grey arrows) of unknown origin was also observed (v-vi). Scale bars, 500 nm.



## SUPPLEMENTAL FIGURE 5.

(a) Schematic structure and sequence of the AAV-U7-exon 11 antisense vector. Several intronic and exonic antisense sequences were tested for promoting *Bin1* exon 11 skipping (data not shown). The most efficient one, which contains a sequence of 49 bp complementary to the full-length exon 11 of the mice *Bin1* (5'-acctgtctcttctgcgagccgtgagaacagtttagttttcttct-3'), was selected and cloned into a U7-AAV based vector originating from the AAV-U7-SD23/BP22 vector (Goyenvalle et al., 2004), which includes two AAV2 inverted terminal repeats (ITR), the U7 natural promoter and 3' element, a modified U7 SnRNA (U7SmOPT, plain lower case) and the antisense sequence of the exon 11 of *Bin1* (bold capital case). The U7-ex11AS-AAV-based vector was packaged into an AAV1 capsid for high-efficiency gene transfer into mice skeletal muscle. The tibialis anterior (TA) muscles of newborn (10 days-old) or adult (2 months-old) wild type mice were injected with  $1.8 \times 10^{13}$  vg/ml of U7-ex11AS AAV virus expressing the *Bin1* exon 11 antisense construct, and the contra-lateral muscle was injected with  $1.8 \times 10^{13}$  vg/ml of control AAV containing no antisense construct or vehicle alone. TA muscles were collected and analyzed 4 months after injections.

(b) We first validated the U7-ex11AS construct by RT-PCR analysis of human *BINI* minigene co-transfected in C2C12 cells with control plasmid or with increasing amount of the U7-ex11AS construct. Ectopic expression of the U7-ex11AS construction forces *BINI* exon 11 skipping and reproduces the mis-regulation of alternative splicing observed in DM patients.

(c) Skipping of *Bin1* exon 11 correlates with muscle force reduction in U7-ex11AS-AAV injected mice. RT-PCR quantification of the endogenous *Bin1* exon 11 inclusion was reported as function of the specific maximal isometric tetanic force of TA muscle of U7-ex11AS-AAV injected mice. Due to the inherent variations between injections, virus preparations and animal responses, we observed a variability of the *Bin1* exon 11 skipping efficiency. These data are reminiscent of the situation observed in DM patients where near-complete *BINI* exon 11 skipping was observed in severely affected congenital patients (CDM1), while only partial splicing alteration was observed in the milder adult DM forms (DM1 and DM2). Overall, the correlation between muscle weakness and *BINI* splicing alteration, which was observed both in model mice and in human patients suggest a direct link between *BINI* mis-regulation and muscle weakness.

(d) Electron microscopy views of longitudinal sections of TA muscle biopsies from control and U7-ex11AS-AAV injected mice. No major degeneration of the muscle fibers was observed as only ~2% of the muscle fibers present an abnormal aspect. Similarly, mitochondrion and sarcomeres were of normal appearances. In contrast, ~30% of the T-tubules were of abnormal appearance, with longitudinally orientated, disorganized and irregular structures containing either abnormally dilated or contracted segments, which go as far as constriction and closure of the tubules (black arrows). Presence of rare large vesicles of unknown origin was also observed. Interestingly, muscle weakness and T-tubule alterations were recently reported in a mouse model of CNM (Al-Qusairi et al., 2009), suggesting that alteration of BIN1 or MTM1, which produces PtdIns5P, the phosphoinositide recognized by BIN1, results in similar T-tubule and muscle alterations.

(e) Measures of the absolute maximal isometric tetanic force and of the muscle weight of isolated TA muscle from control- or U7-ex11AS-AAV adult (2 months old) injected mice demonstrate a significant ~18% decrease of the muscle force in antisense injected mice, but no signs of major muscle degeneration and no significant changes in the muscle mass (Sup. Fig. S5f and data not shown). Immunofluorescence labeling demonstrates alteration of the BIN1 organization in adult U7-ex11AS-AAV injected mice (data not shown). These data suggest that BIN1 is required both for the biogenesis and maturation of the T-tubules during the post-natal period and for the conservation of correct T-tubule structures during adult life.

(g) qRT-PCR analysis demonstrates downregulation of *Cacnals* (DHPR $\alpha$ 1), *Ryr1* and *Atp2a1* (SERCA1), while expression of *Cacnb1* (DHPR $\beta$ 1) and *Bin1* remains unmodified. These data suggest that mis-regulation of *Bin1* splicing leads to alteration of *Cacnals*, *Ryr1* and *Atp2a1*, which are key regulators of the excitation-contraction (E-C) coupling process, and altered E-C coupling gives rise to muscle weakness (Ito et al., 2001; Brotto et al., 2004; Oddoux et al., 2009; Piétri-Rouxel et al., 2010). Interestingly, a recent report demonstrates that mice expressing reduced levels of *Cacnals* develop specific muscle weakness before muscle atrophy through FoxO3A activation (France Piétri-Rouxel personal communication and Piétri-Rouxel et al., 2010). Whether, mis-regulation of BIN1 leads to muscle atrophy through a similar pathway remains to be determined and is beyond the scope of the present article.

## SUPPLEMENTAL FIGURE 6.

**(a)** Model of T-tubules elongation. Inclusion of the skeletal muscle-specific exon 11 within the *BIN1* mRNA requires the binding of the splicing factor MBNL1 on an intronic sequence containing four single-stranded YGC motifs regularly positioned. *BIN1* exon 11 encodes a phosphoinositide binding motif (PI) specific to PtdIns5P, which is produced by dephosphorylation of PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> by the Myotubularin enzyme (MTM1) (Schaletzky et al., 2003; Tronchere et al., 2004). Therefore, we propose that MTM1 produces PtdIns5P-enriched membranes, which are recognized and tubulated by the PI (encoded by the exon 11) and BAR domain of BIN1, respectively. This model is consistent with previous reports of T-tubule elongation through accretion of cytoplasmic vesicles (Yuan et al., 1990, 1991). Whether BIN1 is also involved in the initial formation of the T-tubules through recognition and tubulation of PtdIns5P-enriched caveolae remains to be determined, but would be consistent with the implication of Caveolin 3 in T-tubule biogenesis (Galbiati et al., 2001), and early morphological studies, which suggested that T-tubules are formed by a process similar to endocytosis, which however is not accompanied by the pinching-off of vesicles (Ishikawa, 1968). Correct elongated and organized T-tubules join the terminal cisternae of the sarcoplasmic reticulum and form triad structures which connect the DHPR and RYR1 channels enabling Ca<sup>2+</sup> release in response to plasma membrane depolarization, a key process called excitation-contraction (E-C) coupling. Importantly, alteration of the structure of the T-tubules through invalidation of Triadin, Junctophilin or Mitsugumin 29 leads to E-C coupling dysfunction, ultimately resulting in muscle weakness (Oddoux et al., 2009; Brotto et al., 2004; Ito et al., 2001).

**(b)** Model of T-tubule alterations and muscle weakness in DM patients. In myotonic dystrophic patients, expanded CUG or CCUG repeats sequester MBNL1 within intranuclear aggregates, resulting in a decrease level of the free pool of MBNL1 available to regulate alternative splicing. Consequently, the exon 11 of the *BIN1* pre-mRNA, which is normally included in adult skeletal muscle, is skipped in DM patients and results in expression of a fetal isoform of BIN1 unable to bind to PtdIns5P and to tubulate membranes, leading to T-tubules misorganization and alteration of the excitation-contraction (E-C) coupling, ultimately resulting in muscle weakness. This model is consistent with previous finding of calcium homeostasis alterations in DM muscle cells, patients and mouse models (Jacobs et al., 1991; Kimura et al., 2005; Osborne et al., 2009).

Importantly, the splicing alteration of *BIN1* in DM patients mimicks a loss of function of BIN1 similar to the one found in some centronuclear myopathy (CNM) patients (Nicot et al., 2007), and, strikingly, the histopathological features of early DM1 and CDM1 patients are identical to those observed in CNM (Jungbluth et al., 2008). Furthermore, mutations of MTM1, the enzyme responsible of PtdIns5P production, are responsible of the severe X-linked CNM form (Laporte et al., 1996). These data suggest that the loss-of-function of MTM1 in CNM patients may alter the production of PtdIns5P, and consequently the localization and/or the function of BIN1. Therefore, PtdIns5P may functionally link MTM1 to BIN1. This model is supported by the recent reports of T-tubule alterations in MTM patients, zebrafish and mouse model of myotubular myopathy (Dowling et al., 2009; Al-Qusairi et al., 2009).

## SUPPLEMENTAL METHODS

**RT-PCR analysis of patient's samples.** Total RNA was isolated from control or CDM1 differentiated cells or skeletal muscle biopsies from control or DM patients with Trizol Reagent (Invitrogen). Reverse transcription, using 1 µg of total RNA, was performed with SuperScript II (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. 2 µl of reverse transcription were used for PCR using Taq polymerase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions, and primers located within *BINI* exon 10 (FWD: 5'-agaacctcaatgatgtgctgg-3') and *BINI* exon 12 (REV: 5'-tcgtggttgactctgatctcgg-3'). The reaction mixture was heated to 94°C for 5 min and followed by 25 PCR cycles: 1 min at 94°C, 45 sec at 58°C and 1 min at 72°C. PCR products from *BINI* plus and minus exon 11 mRNAs, which are 208 and 163 bp, respectively, were resolved on a 6% nondenaturing polyacrylamide gels, stained with ethidium bromide and quantified using a PhosphorImager.

**Real-time RT-PCR analysis of patient's samples.** Specific primers were selected by Lightcycler Probes Design2 software (Roche), and were located in the ubiquitous exon 1 (fwd: 5'-gagatgggcagtaaaggg-3') and exon 2 (Rev: 5'-cttgttgaaattctggacgca-3') to quantify the total amount of *BINI*. While to quantify *BINI* exon 11, the primers were located in exon 10 (Fwd: 5'-aatgatgtgctggcggcct-3') and exon 11 (Rev: 5'-gttcttcttctgcgagcc-3'). Real-time PCR was performed using a Lightcycler 480 (Roche). Reactions were performed in a 20 µl final volume with 0.3 µM primers and MgCl<sub>2</sub> concentration optimized between 2-5 mM. Nucleotides, Taq DNA Polymerase and buffer were included in the QuantiTect SYBR Green PCR kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. PCR cycles were a 15 min denaturation step followed by 50 cycles with a 94°C denaturation for 15 sec, 55°C annealing for 20 sec, and 72°C extension for 20 sec. PO RNA was used to correct for differences in the amounts of template DNA. the quantification data were analysed with the Lightcycler 480 analysis software and the relative quantification of BIN isoforms were obtained with 2 $\Delta$ Ct method.

**Constructions.** BIN1 (+ex7+ex11+ex17; a rare DM muscle isoform), (+ex7-ex11+ex17, a rare DM muscle isoform), (-ex7-ex11+ex17, a common isoform in DM skeletal muscle) (-ex7+ex11+ex17, the normal skeletal muscle isoform) were cloned by depletion or insertion of exon 7, exon 11 or exon 17 from BIN1 [NM\\_139343.1](#) (Bridging Integrator 1 isoform 1, +ex7-ex11+ex13-16+ex17) and BIN1 [NM\\_004305.2](#) (Bridging Integrator 1 isoform 8, -ex7+ex11-

ex13-16-ex17) by primer-directed PCR mutagenesis. Presence of the alternative exon 17 was determinant for further recognition by the anti-BIN1 99D (Upstate) antibody. All BIN1 isoforms were cloned in pGFP (Clontech) and in pDEST15 (Invitrogen). eGFP-BIN1 fusion constructs were PCR amplified and cloned into pENTR-D Topo vector (Invitrogen), then in pAd-DEST using the ViralPower Adenoviral Expression System (Invitrogen). eGFP-P40<sup>(PX)</sup> (gift from Karen Anderson) and eGFP-ING2<sup>(PHD)</sup> (gift from Or Gozani) constructs were PCR amplified, cloned into pENTR-D Topo vector (Invitrogen), then in pAd-DEST (Invitrogen).

**Cell culture and BIN1 transfection.** COS-1 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5% FCS and 40 mg/l gentamicin in a 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. Cells were grown on 22-mm<sup>2</sup> cover slips and were transfected at 80% confluence with 1 µg of DNA constructs using the Fugene-6 reagent, following the manufacturer's instructions (Roche). After 24 h of transfection, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 24 h at 4°C. C2C12 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 20 % FCS and 40 mg/l gentamicin in a 5 % CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. Cells were grown on 22-mm<sup>2</sup> cover slips. For C2C12 myoblasts, cells were transfected at 60% confluence with 1 µg of DNA constructs using lipofectamine reagent, following the manufacturer's instructions (Invitrogen). After 3 h of transfection, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 24 h at 4°C. For C2C12 myotubes, cells were transfected at 60% confluence with 1 µg of DNA constructs using lipofectamine supplemented with +Reagent reagents, following the manufacturer's instructions (Invitrogen). After 3 h of transfection, cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5% Horse Serum and 40 mg/l gentamicin in a 5 % CO<sub>2</sub> incubator at 37°C during 5 days of differentiation. Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde for 24 h at 4°C. Fluorescence was examined with Leica SP2-AOBS confocal microscope. Pictures were processed with Tcstk software (Jean-Luc Vonesch, IGBMC) and edited using Dvrtk software (Jean-Luc Vonesch, IGBMC) and Photoshop 7.0 (Adobe) or Fotographix (L. Madhavan).

**Western blot.** Proteins were extracted from muscle biopsies of two control foetuses (20 and 31 weeks) and two age-matched CDM1 foetuses. The total proteins extracts were separated on 10% SDS-PAGE gel, and transferred onto nitrocellulose membranes that were blocked with 5% non-fat dry milk in TBS-T buffer (Tris buffer saline plus 0.1% Tween-20). Incubation with primary antibodies was performed for 1 hour in TBS-T buffer containing 5%

non-fat dry milk. BIN1 was detected with antibody directed either against the phosphoinositides binding domain encoded by exon 11 (1:10000, anti-BIN1 R2406, polyclonal antibody or against the myc-binding domain encoded by exon 17 (1:250, 99D monoclonal antibody, Upsate). Secondary antibodies (anti-rabbit-Horseradish Peroxidase or anti-mouse-HRP, Jackson ImmunoResearch) were incubated for 1 hour, followed by autoradiography. Equal loading was monitored by Ponceau red and Coomassie staining.

**Protein purification.** The coding sequence of CUGBP1 and of the various isoforms of BIN1 were cloned into the pDEST15 plasmid (Invitrogen). The pGEX-MBNL1- $\Delta$ 101 and the pGEX-6P-MBNL1-His vectors were kind gift of Christiane Branlant and Maurice Swanson, respectively. *E. coli* BL21(DE3)pRARE cells previously transformed with the plasmid were grown at 37°C in 2 L LB medium supplemented with ampicillin until OD<sub>600</sub> = 0.5. After cooling to 20°C and addition of IPTG to a final concentration of 0.5 mM, the culture was further incubated for 5 hours at 20°C. Cells were harvested and resuspended in Lysis-M buffer (50 mM Tris-Cl pH 7.5 - 300 mM NaCl - 5 % glycerol - 1 mM DTT) + 5 mM EDTA, using 10 mL of buffer for each gram of cell pellet. After addition of lysozyme (0.5 mg/mL final) and a 30 min incubation on ice, cells were sonicated. The resulting extract was centrifuged 1 hour at 20.000 g. The supernatant was loaded onto a GSTPrep column (20 mL, GE Healthcare). The column was washed with 1 L Lysis-M + 1 mM EDTA. Bound proteins were eluted with Lysis-M + 10 mM reduced glutathione. The eluate was dialyzed against storage buffer (50 mM Na-HEPES pH 7.5 - 150 mM NaCl - 55 % glycerol - 2 mM DTT) for 48 hours at 4°C. Protein concentration was determined by Coomassie protein assay (Pierce).

**RNA-protein UV-crosslinking.** 0.5  $\mu$ g recombinant MBNL1 protein was incubated with internally <sup>32</sup>P-labeled RNA (10.000 cpm) in 25 mM Na-HEPES pH 7.5, 0.3 mM MgCl<sub>2</sub>, 65 mM K-glutamate, 0.2 mM Na-EDTA, 0.1 mg/mL BSA, 0.1 mg/mL total yeast tRNA, 0.1 mg/mL heparin, 2 mM ATP, 0.5 mM DTT. After 20 min at 25°C, reactions were transferred on parafilm and irradiated for 4 min, on ice, at a distance of 2.5 cm from the UV lamp (Vilberlomat VL-100C). 10  $\mu$ g RNase T1 and 50 units RNase T1 were added, followed by 30 minutes of incubation at 37°C. After addition of SDS-loading buffer and 2 min heating at 95°C, RNA-protein complexes were resolved by SDS-PAGE (10 %, acryl:bis-acryl = 29:1). The gel was then incubated in 10 % acetic acid, 25 % isopropanol for 20 min and dried. The RNA was detected with a BAS-MS imaging plate (Fuji) and a Typhoon 8600 imager (Molecular dynamics).



**Lipid dot-blot and liposomes assays.** Nitrocellulose membranes spotted with increasing amounts of various phosphoinositides (PIP arrays) were purchased from Echelon Biosciences and used according manufacturer's instructions. Briefly, the membrane was incubated with 5 mL of purified full length GST-BIN1 at a final concentration of 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in TBS-TB (TBS supplemented with 0.1 % Triton X-100 and 1 mg/mL fat-free BSA) for 30 min at room temperature. After five washes with TBS-TB, the membrane was incubated with BIN1 C99D antibody (Upstate) for 30 min, washed five times with TBS-TB, incubated with secondary antibody (peroxydase-labeled anti-mouse), and washed five times with TBS-TB. Detection was performed by chemiluminescent detection system (ECL, thermo scientific). Liposome pull-down was carried according manufacturer's instructions (PolyPIPosomes, Echelon Biosciences). Briefly, 1  $\mu\text{g}$  of purified full length GST-BIN1 was incubated with 20  $\mu\text{l}$  of liposome preparation and 1 ml of binding buffer (50 mm Tris, pH 7.5, 150 mm NaCl, 0.05% Nonidet P-40), rotated 10 min at room temperature and centrifuged 10 min at 13,000 rpm. Liposome pellet was washed three times in 1 ml of binding buffer and then analyzed by SDS-PAGE followed by Western-blotting using the BIN1 C99D antibody (Upstate).

**Human skeletal muscle cell culture and adenoviral infection.** Control or DM1 myoblasts were grown and differentiated as previously described (Furling D. et al., 2001). For infection, myoblasts were differentiated on gelatin-coated coverglasses in 6-wells plates for 5-6 days. The EGFP-BIN1, eGFP-P40<sup>(PX)</sup> and eGFP-ING2<sup>(PHD)</sup> constructs were PCR amplified and cloned into pENTR-D Topo vector (Invitrogen), then in pAd-DEST using the ViralPower Adenoviral Expression System (Invitrogen). The recombinant adenoviruses were produced in 293A cells (invitrogen) using classical procedures (Lagrange M. et al., 2007). The myotubes were transduced with recombinant adenoviruses (MOI of 1000 to 2000) and the medium was replaced by fresh differentiation medium 17 hours post-infection. The cells were fixed 48 hours after in 4% paraformaldehyde,

**Fluorescent in situ hybridization (FISH) and immunofluorescence (IF).** The combined FISH-IF experiment was done as described previously (Klein AF. et al., 2008) using a Cy3-conjugated PNA (CAG)<sub>7</sub>x probe, the monoclonal mouse anti-BIN1 antibody (clone 99D, Upstate, 1/200 dilution) and the secondary Alexa 488-conjugated goat anti-mouse (Invitrogen) or Cy3-conjugated donkey anti-mouse (Jackson immunoresearch) antibodies. Other antibodies used were : monoclonal anti-DHPR (MAB427, Chemicon, 1/50 to 1/100

dilution), polyclonal anti-synemin (gift from Zhigang Xue, 1/400), polyclonal anti-desmin (Chemicon, 1/100 dilution), monoclonal anti-SERCA1 (clone I1H11, Abcam, 1/100 dilution) monoclonal anti-RYR (clone 34C, Sigma, 1/100 dilution) and the polyclonal rabbit anti-BIN1 antibodies (H100, SantaCruz, 1/100 dilution). Pictures were captured using Leica confocal microscope and software (Leica microsystems), and processed with Adobe Photoshop software (Adobe System Inc.).

**Electron Microscopy.** The muscle samples were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1M sodium cacodylate buffer (PH=7.2) for 24h at 4°C, washed in 0.1M cacodylate buffer for 30 minutes and post-fixed in 1% osmium tetroxide in 0.1M cacodylate buffer for 1 hour at 4°C. Following stepwise deshydration with increasing concentrations of ethanol and embedding in Epon 812. Semi-thin sections (2µm thick) were stained with toluidine blue for light microscopy, ultrathin sections (70nm) were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and observed with a Philips Morgagni 268D electron microscope.

## SUPPLEMENTAL REFERENCES

- Agarkova I, Schoenauer R, Ehler E, Carlsson L, Carlsson E, Thornell LE, Perriard JC. The molecular composition of the sarcomeric M-band correlates with muscle fiber type. *Eur J Cell Biol.* **83**, 193-204 (2004).
- Al-Qusairi L, Weiss N, Toussaint A, Berbey C, Messaddeq N, Kretz C, Sanoudou D, Beggs AH, Allard B, Mandel JL, Laporte J, Jacquemond V, Buj-Bello A. T-tubule disorganization and defective excitation-contraction coupling in muscle fibers lacking myotubularin lipid phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**, 18763-8 (2009).
- Bertoni P, Schoenauer R, Agarkova I, Hegner M, Perriard JC, Güntherodt HJ. Study of the mechanical properties of myomesin proteins using dynamic force spectroscopy. *J Mol Biol.* **348**, 1127-37 (2005).
- Blondeau F, Laporte J, Bodin S, Superti-Furga G, Payrastre B, Mandel JL. Myotubularin, a phosphatase deficient in myotubular myopathy, acts on phosphatidylinositol 3-kinase and phosphatidylinositol 3-phosphate pathway. *Hum Mol Genet.* **9**, 2223-9 (2000).
- Buj-Bello A, Fougere F, Schwab Y, Messaddeq N, Spehner D, Pierson CR, Durand M, Kretz C, Danos O, Douar AM, Beggs AH, Schultz P, Montus M, Denèfle P, Mandel JL. AAV-mediated intramuscular delivery of myotubularin corrects the myotubular myopathy phenotype in targeted murine muscle and suggests a function in plasma membrane homeostasis. *Hum Mol Genet.* **17**, 2132-43 (2008).
- Butler MH, David C, Ochoa G-C, Freyberg Z, Daniell L, Grabs D, Cremona O, De Camilli P. Amphiphysin II (SH3P9; BIN1), a member of the amphiphysin/Rvs family, is concentrated in the cortical cytomatrix of axon initial segments and nodes of ranvier in brain and around T tubules in skeletal muscle. *J Cell Biol.* **136**, 1355–1367 (1997).
- Brotto MA, Nagaraj RY, Brotto LS, Takeshima H, Ma JJ, Nosek TM Defective maintenance of intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis is linked to increased muscle fatigability in the MG29 null mice. *Cell Res.* **14**, 373-8 (2004).
- Dansithong W, Paul S, Comai L, Reddy S. MBNL1 is the primary determinant of focus formation and aberrant insulin receptor splicing in DM1. *J Biol Chem.* **280**, 5773-80 (2005).
- 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 USA* **93**, 331–335 (1996).
- Dickson, G., Peck, D., Moore, S. E., Barton, C. H., and Walsh, F. S. Enhanced myogenesis in NCAM-transfected mouse myoblasts. *Nature* **344**, 348–351 (1990).

- Dowling JJ, Vreede AP, Low SE, Gibbs EM, Kuwada JY, Bonnemann CG, Feldman EL. Loss of myotubularin function results in T-tubule disorganization in zebrafish and human myotubular myopathy. *PLoS Genet.* **5**, 1000372 (2009).
- Du H, Cline MS, Osborne RJ, Tuttle DL, Clark TA, Donohue JP, Hall MP, Shiue L, Swanson MS, Thornton CA, Ares M. Aberrant alternative splicing and extracellular matrix gene expression in mouse models of myotonic dystrophy. *Nat Struct Mol Biol.* **2**, 187-93 (2010)
- Fazeli, S., Wells, D. J., Hobbs, C., and Walsh, F. S. Altered secondary myogenesis in transgenic animals expressing the neural cell adhesion molecule under the control of a skeletal muscle Ipha-actin promoter. *J. Cell Biol.* **135**, 241–251 (1996).
- Flucher BE. Structural analysis of muscle development: transverse tubules, sarcoplasmic reticulum, and the triad. *Dev Biol* **154**, 245–260 (1992).
- Furling D, Coiffier L, Mouly V, Barbet JP, St Guily JL, Taneja K, Gourdon G, Junien C, Butler-Browne GS. Defective satellite cells in congenital myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet.* **10**(19):2079-87 (2001).
- Jacobs AE, Benders AA, Oosterhof A, Veerkamp JH, van Mier P, Wevers RA, Joosten EM. The calcium homeostasis and the membrane potential of cultured muscle cells from patients with myotonic dystrophy. *Biochim Biophys Acta.* **1096**, 14-9 (1990).
- Galbiati F, Engelman JA, Volonte D, Zhang XL, Minetti C, Li M, Hou H Jr, Kneitz B, Edelmann W, Lisanti MP. Caveolin-3 null mice show a loss of caveolae, changes in the microdomain distribution of the dystrophin-glycoprotein complex, and t-tubule abnormalities. *J Biol Chem.* **276**, 21425-33 (2001).
- Goers ES, Purcell J, Voelker RB, Gates DP, Berglund JA. MBNL1 binds GC motifs embedded in pyrimidines to regulate alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* Jan 13. [Epub ahead of print] (2010).
- Gozani O, Karuman P, Jones DR, Ivanov D, Cha J, Lugovskoy AA, Baird CL, Zhu H, Field SJ, Lessnick SL, Villasenor J, Mehrotra B, Chen J, Rao VR, Brugge JS, Ferguson CG, Payrastra B, Myszka DG, Cantley LC, Wagner G, Divecha N, Prestwich GD, Yuan J. The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell.* **114**, 99-111 (2003).
- Goyenvallé A, Vulin A, Fougère F, Leturcq F, Kaplan JC, Garcia L, Danos O. Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science.* **306**, 1796-9 (2004).

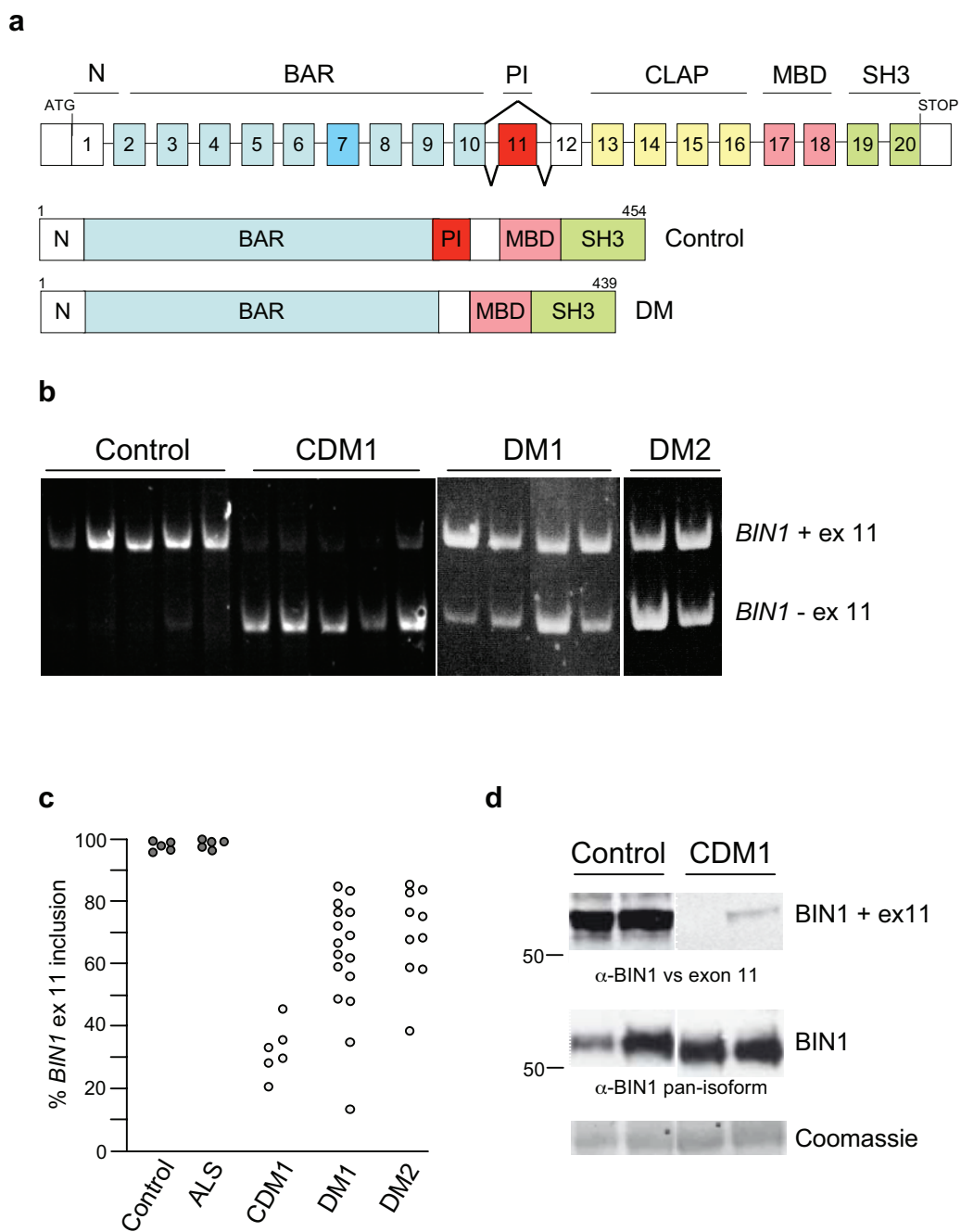
- Hino S, Kondo S, Sekiya H, Saito A, Kanemoto S, Murakami T, Chihara K, Aoki Y, Nakamori M, Takahashi MP, Imaizumi K. Molecular mechanisms responsible for aberrant splicing of SERCA1 in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet.* **16**, 2834-43 (2007).
- Ho, T.H., Charlet, B.N., Poulos, M.G., Singh, G., Swanson, M.S., Cooper, T.A. Muscleblind proteins regulate alternative splicing. *EMBO J.* **23**, 3103–3112 (2004).
- Ishikawa H. Formation of elaborate networks of T-system tubules in cultured skeletal muscle with special reference to the T-system formation. *J Cell Biol* **38**, 51–66 (1968).
- Ito K, Komazaki S, Sasamoto K, Yoshida M, Nishi M, Kitamura K, Takeshima H. Deficiency of triad junction and contraction in mutant skeletal muscle lacking junctophilin type 1. *J Cell Biol.* **154**, 1059-67 (2001).
- Jungbluth, H., Wallgren-Pettersson, C. & Laporte, J. Centronuclear (myotubular) myopathy. *Orphanet J Rare Dis.* **3**, 1-13 (2008).
- Kimura T, Nakamori M, Lueck JD, Pouliquin P, Aoike F, Fujimura H, Dirksen RT, Takahashi MP, Dulhunty AF, Sakoda S. Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet.* **14**, 2189-200 (2005).
- Kino Y, Mori D, Oma Y, Takeshita Y, Sasagawa N, Ishiura S. Muscleblind protein, MBNL1/EXP, binds specifically to CHHG repeats. *Hum Mol Genet.* **13**, 495-507 (2004).
- Kino Y, Washizu C, Oma Y, Onishi H, Nezu Y, Sasagawa N, Nukina N, Ishiura S. MBNL and CELF proteins regulate alternative splicing of the skeletal muscle chloride channel CLCN1. *Nucleic Acids Res.* **37**, 6477-90 (2009).
- Klein AF, Ebihara M, Alexander C, Dicaire MJ, Sasseville AM, Langelier Y, Rouleau GA, Brais B. PABPN1 polyalanine tract deletion and long expansions modify its aggregation pattern and expression. *Exp Cell Res.* **314**(8):1652-66 (2008).
- Koshelev M, Sarma S, Price RE, Wehrens XH, Cooper TA. Heart-specific overexpression of CUGBP1 reproduces functional and molecular abnormalities of myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet.* Jan 8. [Epub ahead of print] (2010).
- Laporte, J. et al. A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast. *Nat. Genet.* **13**, 175–182 (1996).
- Lagrange M, Boulade-Ladame C, Mailly L, Weiss E, Orfanoudakis G, Deryckere F. Intracellular scFvs against the viral E6 oncoprotein provoke apoptosis in human papillomavirus-positive cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **361**(2):487-92 (2007)

- Lin X., Miller J. W., Mankodi A., Kanadia R. N., Yuan Y., Moxley R. T., Swanson M. S., Thornton C. A. Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 2087–2097 (2006).
- Lee E, Marcucci M, Daniell L, Pypaert M, Weisz OA, Ochoa G-C, Farsad K, Wenk MR, De Camilli P. Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science* **297**, 1193–1196 (2002).
- Nakamori M, Kimura T, Fujimura H, Takahashi MP, Sakoda S. Altered mRNA splicing of dystrophin in type 1 myotonic dystrophy. *Muscle Nerve.* **36**, 251-7 (2007).
- Nicot AS, Toussaint A, Tosch V, Kretz C, Wallgren-Pettersson C, Iwarsson E, Kingston H, Garnier JM, Biancalana V, Oldfors A, Mandel JL, Laporte J. Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy. *Nat Genet.* **39**, 1134-9 (2007).
- Oddoux S, Brocard J, Schweitzer A, Szentesi P, Giannesini B, Brocard J, Fauré J, Pernet-Gallay K, Bendahan D, Lunardi J, Csernoch L, Marty I. Triadin deletion induces impaired skeletal muscle function. *J Biol Chem.* **284**, 34918-29 (2009).
- Osborne RJ, Lin X, Welle S, Sobczak K, O'Rourke JR, Swanson MS, Thornton CA. Transcriptional and post-transcriptional impact of toxic RNA in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet.* **18**(8), 1471-81 (2009).
- Piétri-Rouxel F, Gentil C, Vassilopoulos S, Baas D, Mouisel E, Ferry A, Vignaud A, Hourdé C, Marty I, Schaeffer L, Voit T, Garcia L. DHPR alpha1S subunit controls skeletal muscle mass and morphogenesis. *EMBO J.* **3**, 643-54 (2010).
- Ramjaun AR, McPherson PS. Multiple amphiphysin II splice variants display differential clathrin binding: identification of two distinct clathrin-binding sites. *J Neurochem* **70**, 2369–2376 (1998).
- Schaletzky J, Dove SK, Short B, Lorenzo O, Clague MJ, Barr FA. Phosphatidylinositol-5-phosphate activation and conserved substrate specificity of the myotubularin phosphatidylinositol 3-phosphatases. *Curr Biol.* **13**, 504-9 (2003).
- Taylor GS, Maehama T, Dixon JE. Inaugural article: myotubularin, a protein tyrosine phosphatase mutated in myotubular myopathy, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3-phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 8910-5 (2000).
- Teplova M, Patel DJ. Structural insights into RNA recognition by the alternative-splicing regulator muscleblind-like MBNL1. *Nat Struct Mol Biol.* **15**, 1343-51 (2008).

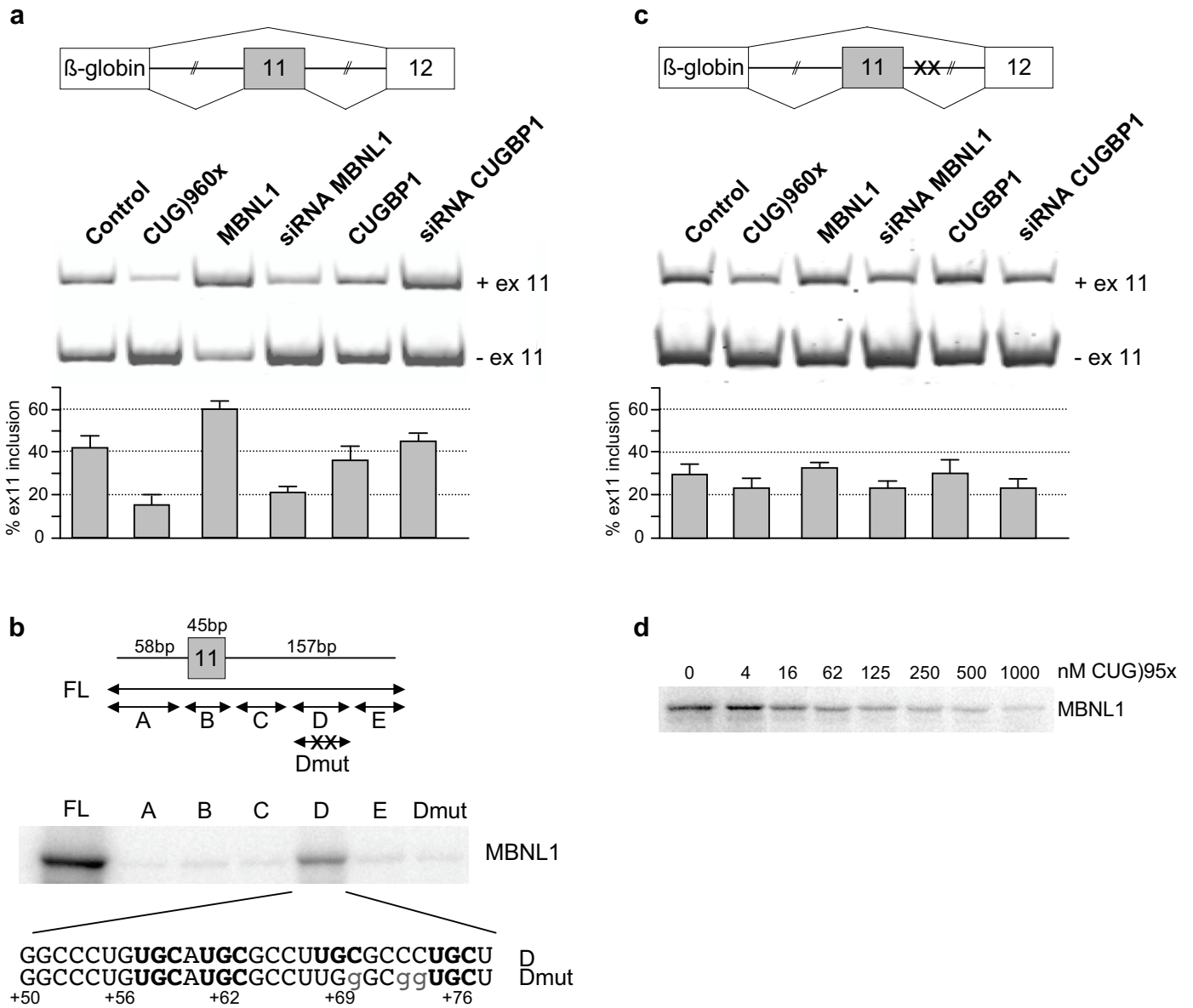
- Tronchère H, Laporte J, Pendaries C, Chaussade C, Liaubet L, Pirola L, Mandel JL, Payrastra B. Production of phosphatidylinositol 5-phosphate by the phosphoinositide 3-phosphatase myotubularin in mammalian cells. *J Biol Chem.* **279**, 7304-12 (2004).
- Warf MB, Berglund JA. MBNL binds similar RNA structures in the CUG repeats of myotonic dystrophy and its pre-mRNA substrate cardiac troponin T. *RNA.* **13**, 2238-51 (2007).
- Wechsler-Reya R, Elliott KJ, Prendergast GC. A role for the putative tumor suppressor Bin1 in muscle cell differentiation. *Mol Cell Biol* **18**, 566–575 (1998).
- Wigge P, McMahon HT. The amphiphysin family of proteins and their role in endocytosis at synapse. *Trends Neurosci* **21**, 339–344 (1998).
- Yuan Y, Compton SA, Sobczak K, Stenberg MG, Thornton CA, Griffith JD, Swanson MS. Muscleblind-like 1 interacts with RNA hairpins in splicing target and pathogenic RNAs. *Nucleic Acids Res.* **35**, 5474-86 (2007).
- Yuan S, Arnold W, Jorgensen AO. Biogenesis of transverse tubules: immunocytochemical localization of a transverse tubular protein (TS28) and a sarcolemmal protein (SL50) in rabbit skeletal muscle developing in situ. *J Cell Biol.* **110**, 1187-98 (1990).
- Yuan SH, Arnold W, Jorgensen AO. Biogenesis of transverse tubules and triads: immunolocalization of the 1,4-dihydropyridine receptor, TS28, and the ryanodine receptor in rabbit skeletal muscle developing in situ. *J Cell Biol.* **112**, 289-301 (1991).
- Zhou Q, Chu PH, Huang C, Cheng CF, Martone ME, Knoll G, Shelton GD, Evans S, Chen J. Ablation of Cypher, a PDZ-LIM domain Z-line protein, causes a severe form of congenital myopathy. *J Cell Biol.* **155**, 605–612 (2001).



**Figure 1**

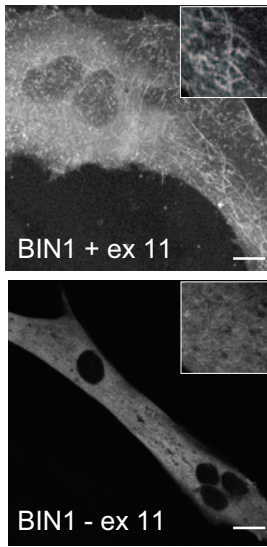


**Figure 2**

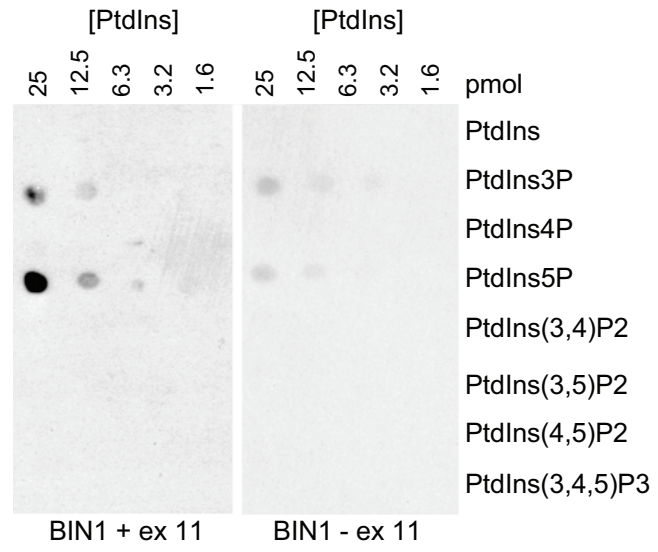


**Figure 3**

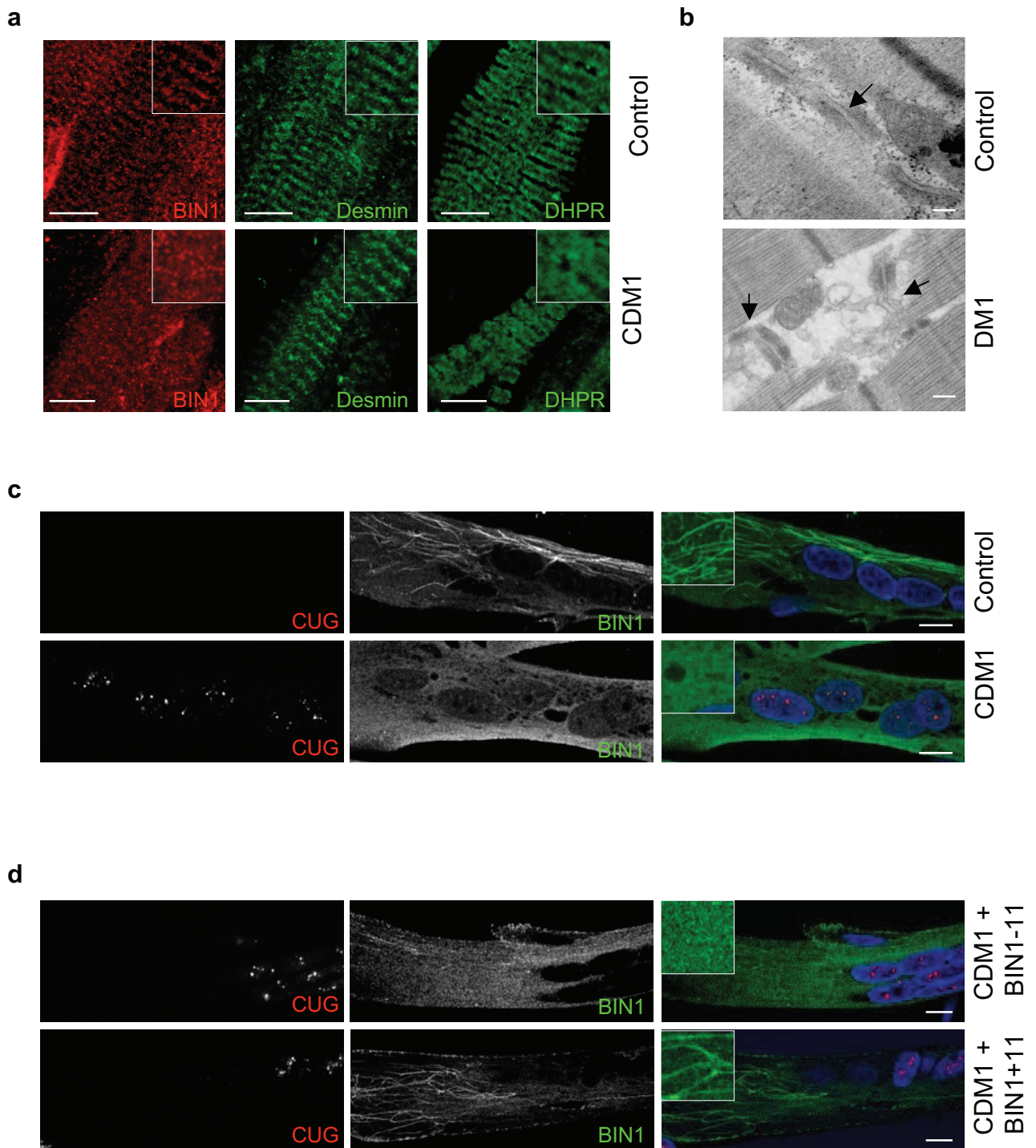
**a**



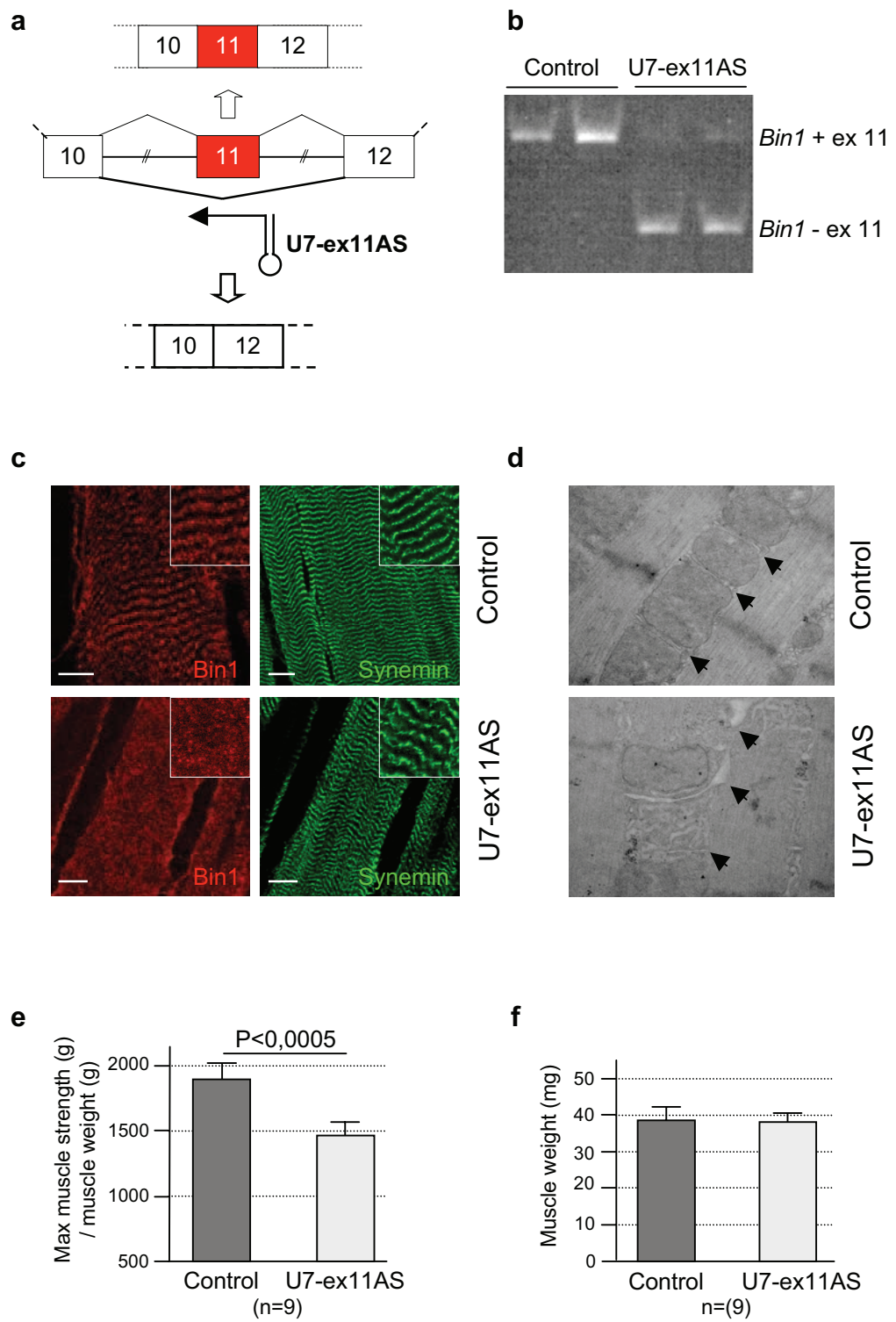
**b**



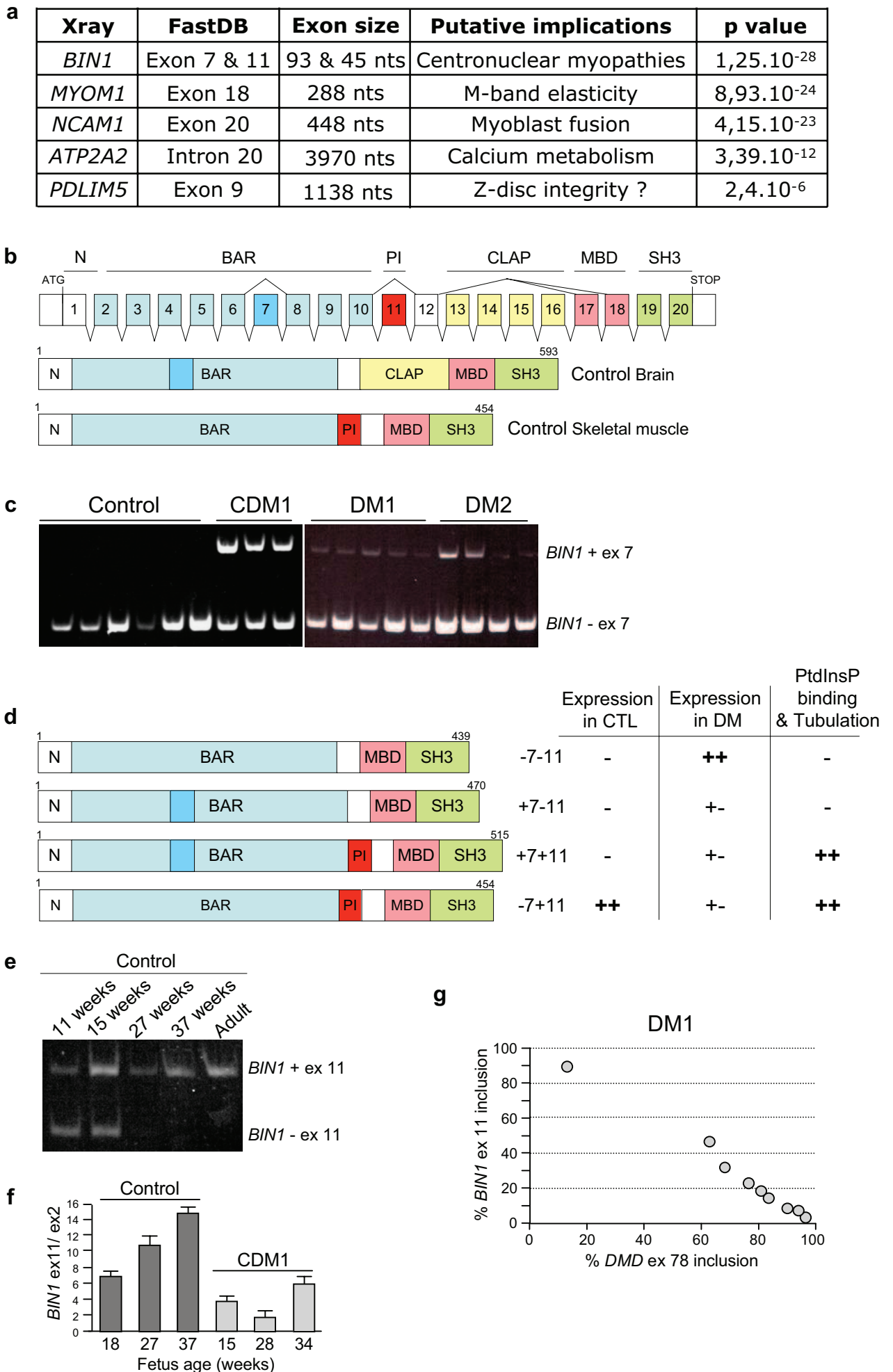
**Figure 4**



**Figure 5**



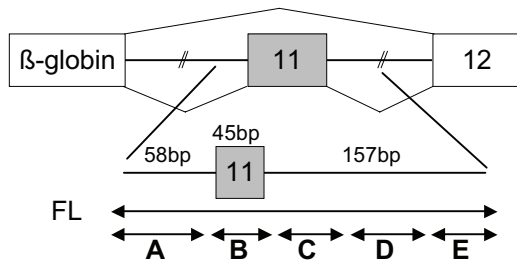
# Supplementary Figure 1





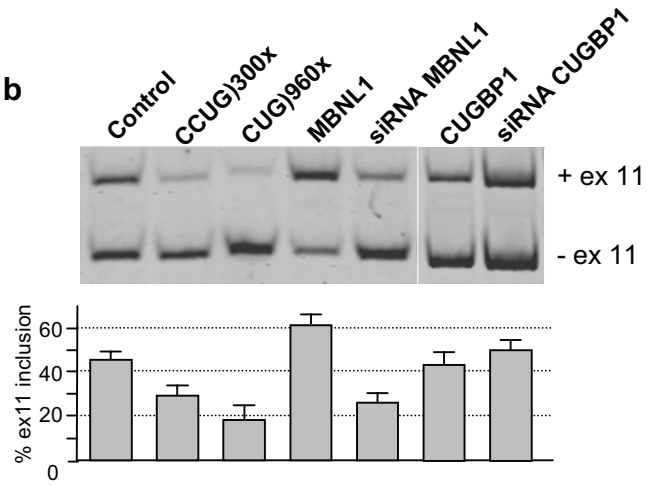
## Supplementary Figure 2

**a**

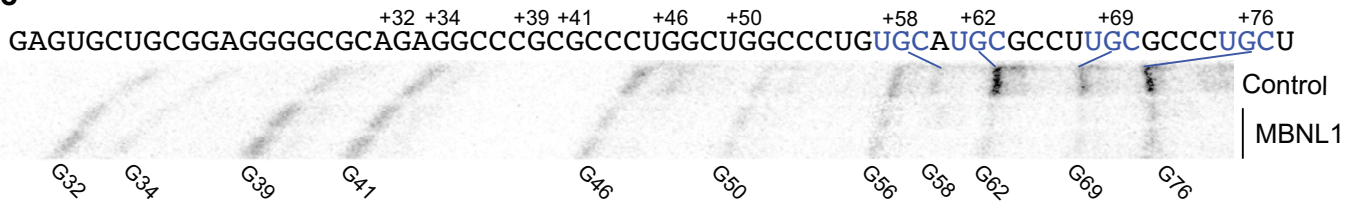


**A** <sup>-58</sup>gttctgcacctggcctttctccagaatgaaggcctccacctcccgtccgtccccacag  
**B** AAAGAAAAGTAAACTGTTTTTCGCGGCTGCGCAGAAAGAAGAACAG  
**C** <sup>+1</sup>gtaccggcagtgagtgctgctgctggagggggcgcagaggccccgcgc<sup>+43</sup>  
**D** <sup>+44</sup>ctggctggccctgt<sup>+58</sup>tgc<sup>+62</sup>atg<sup>+69</sup>gc<sup>+76</sup>gcccttgc<sup>+94</sup>tcc<sup>+94</sup>caggtgccactaac  
**E** <sup>+95</sup>ccgtaatctggctctgtgtg<sup>+157</sup>cagtgctgcccggcagggtgtcgtgtgctgtgtgggtgggaa

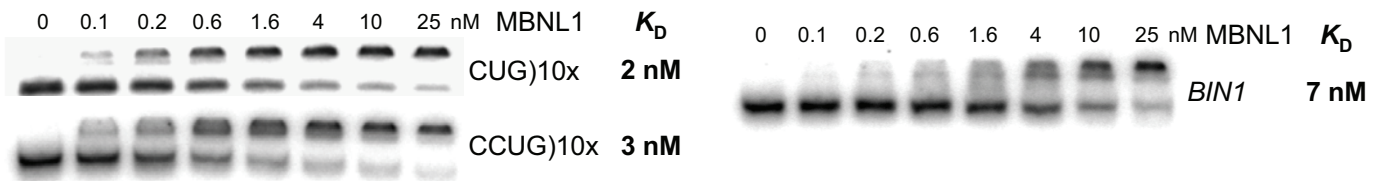
**b**



**c**



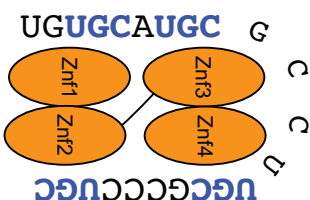
**d**



**e**

<i>MBNL2</i> hs	UCUGCU	UGCUGUUUACCUGU	AUGUAAUUCGCUU	5.8 nM
<i>Tnnt3</i> mm	ugcaUGUGCGCUUG	UGCCCACACCAUGAAGAUGCUG	UCGCCG	6.6 nM
<i>BIN1</i> hs	UGUGCA	UGCGCC	UUGCGC CCUGCUC	7 nM
<i>MBNL1</i> hs	UCUGCU	UGCUGUUU	AUGUAAUUCGCUU	11 nM
<i>ATP2A1</i> hs	GUUGCCA	CUGCUGC	UGC UGCGC	15 nM
<i>TNNT2</i> hs	CCUGUC	UCGUUUUCCC	CUCCGC UGCGG	20 nM
<i>MBNL1</i> hs	UGUGCA	UGC UAGUCU	UGUUAU UCGUUG	45 nM
<i>INSR</i> hs	GCAGCU	GUGCUGGAGAGCAG	AUGC UACCAAU	120 nM
<i>GRIN1</i> hs	GGUGUGA	UUGC UUU	AGCGCCGUCAUUUUC	280 nM
	YGC	0-5nts	YGC >3nts	YGC
			YGC	0-5nts
			YGC	

**f**

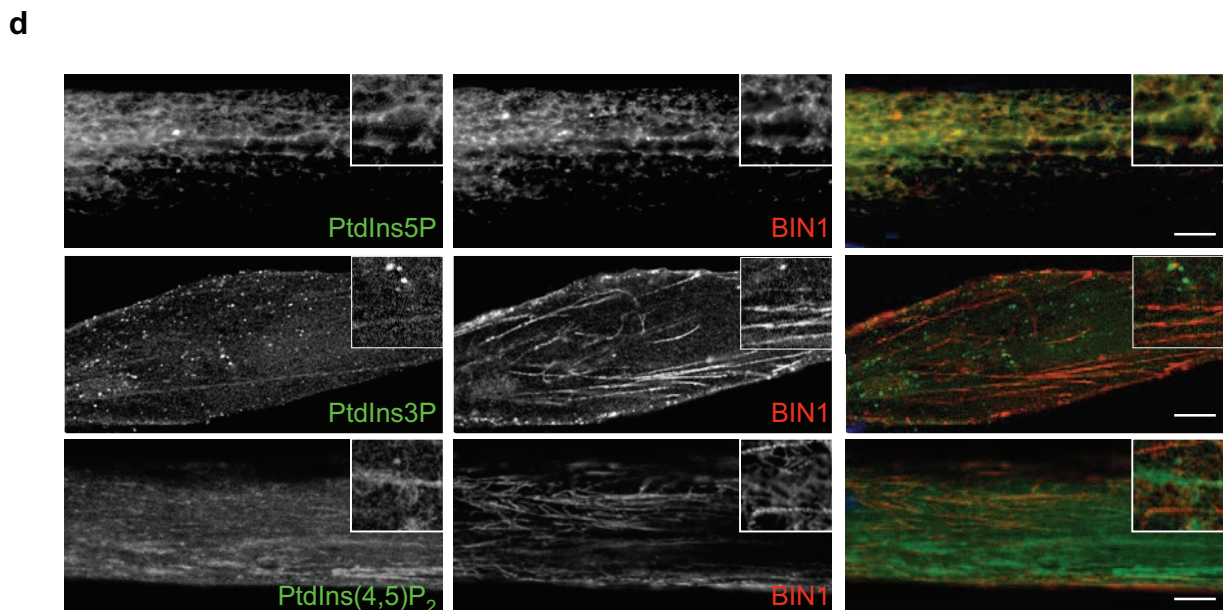
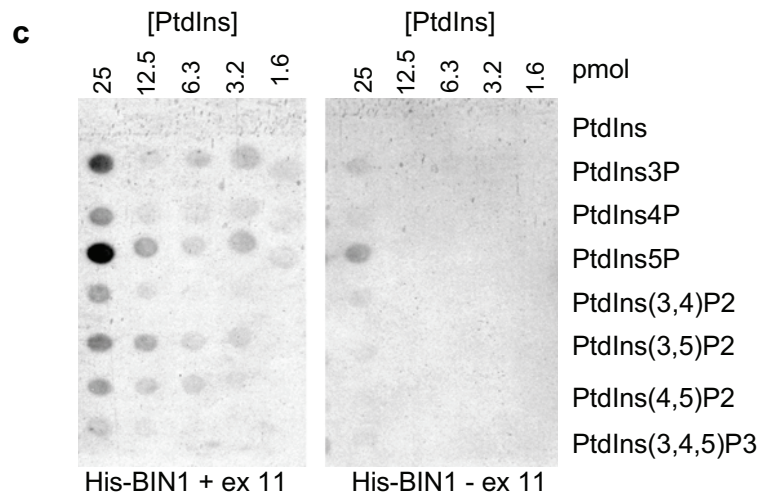
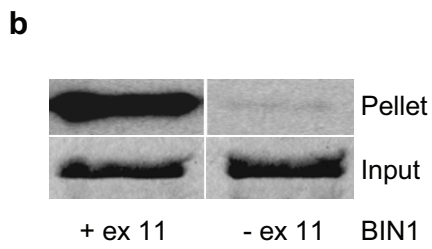
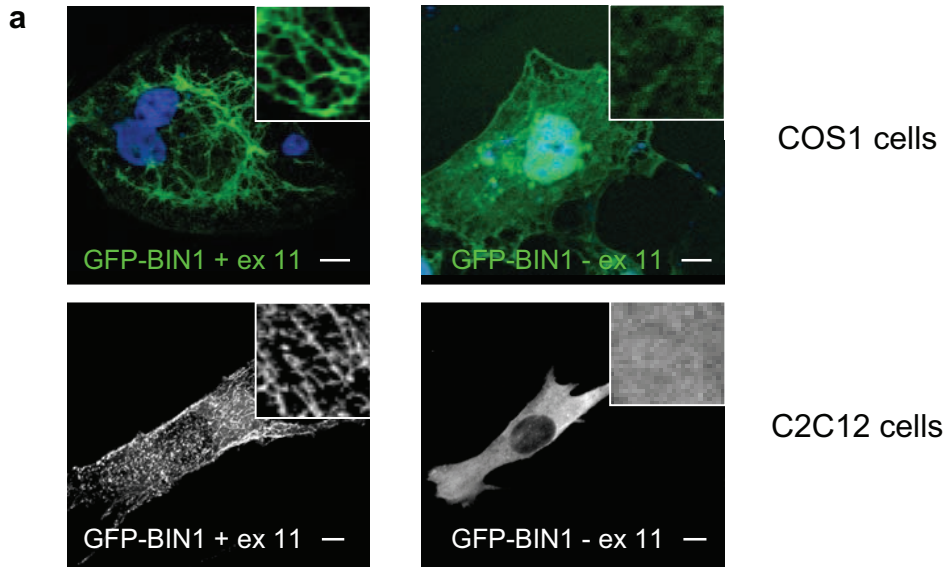


**g**

*BIN1* hs GCCCUGUGCAUGC GCCUUGCGCCCUUGCU  
*Bin1* mm GCCUUGUGACUGUGCCCUUGUUGAAGGGC

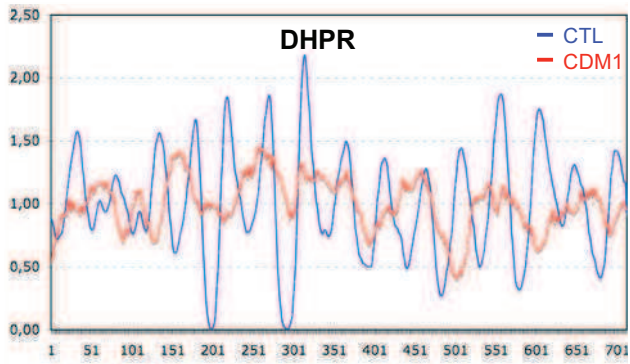
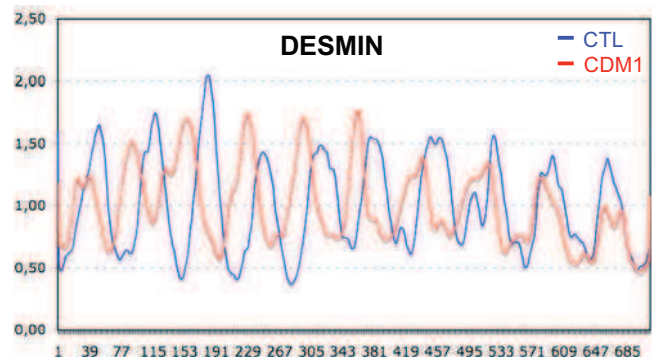
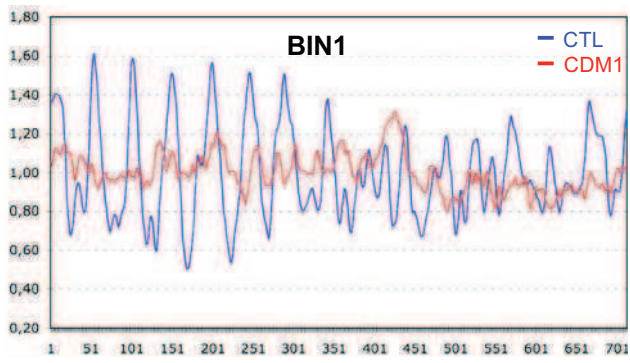


Supplementary Figure 3

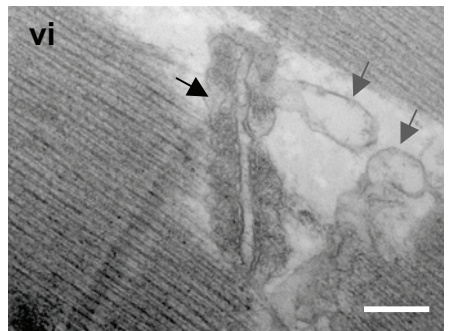
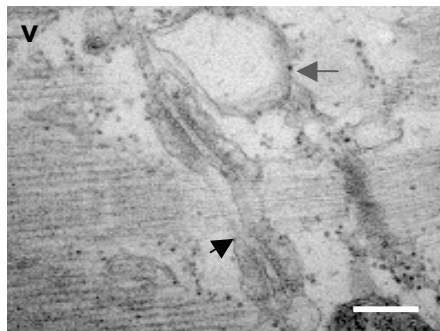
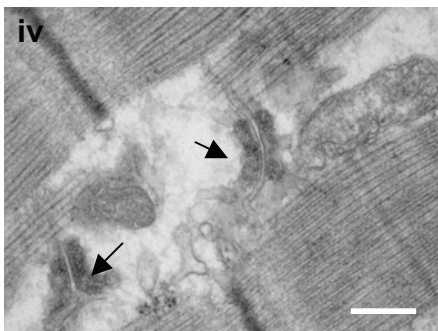
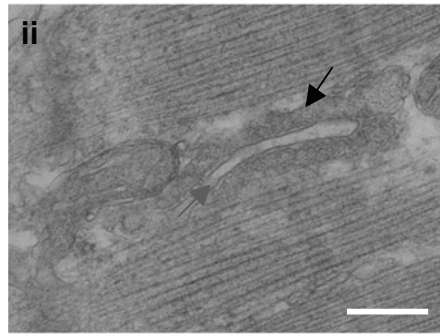
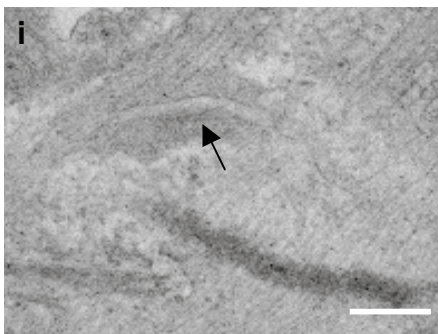


# Supplementary Figure 4

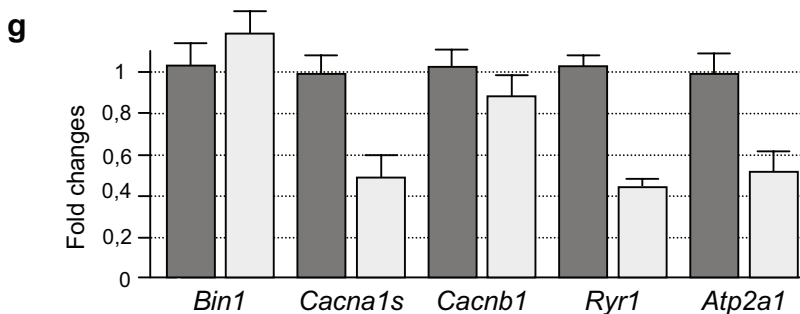
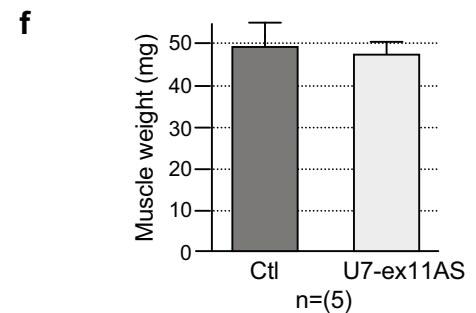
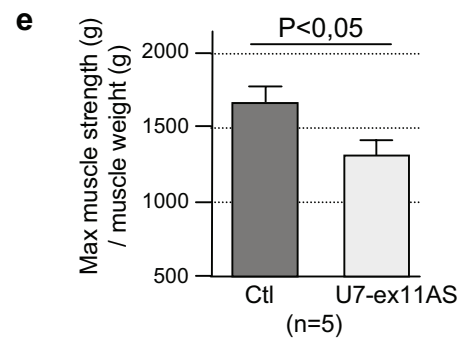
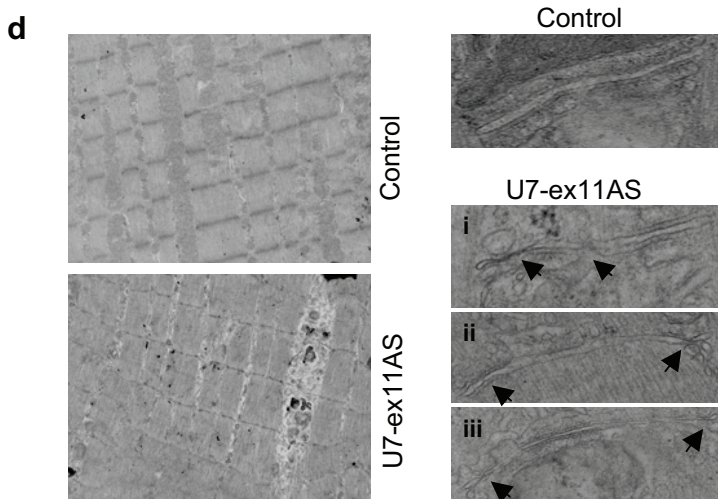
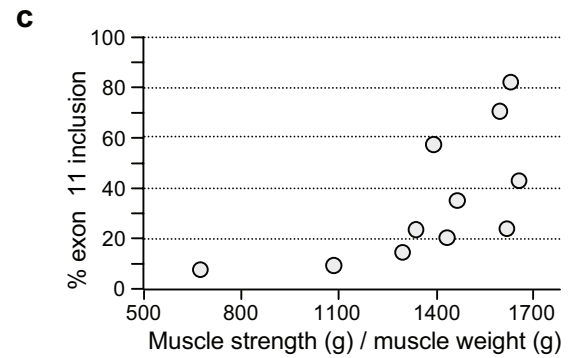
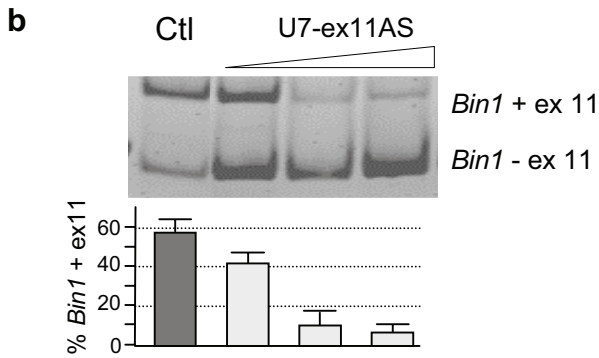
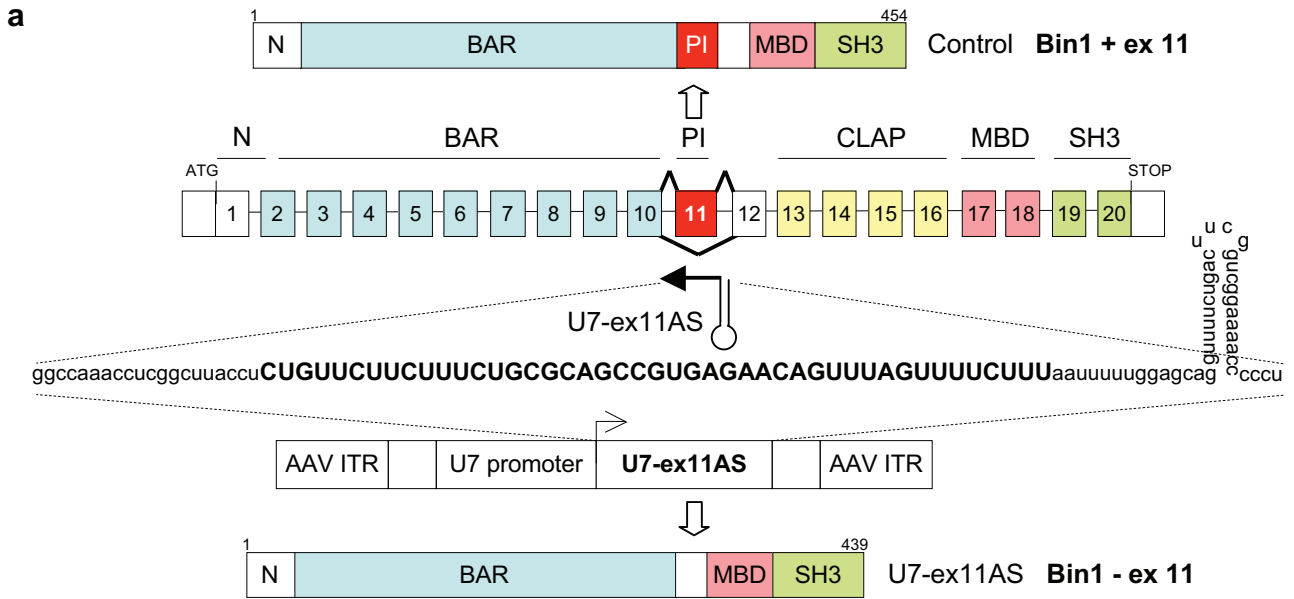
**a**



**b**



# Supplementary Figure 5

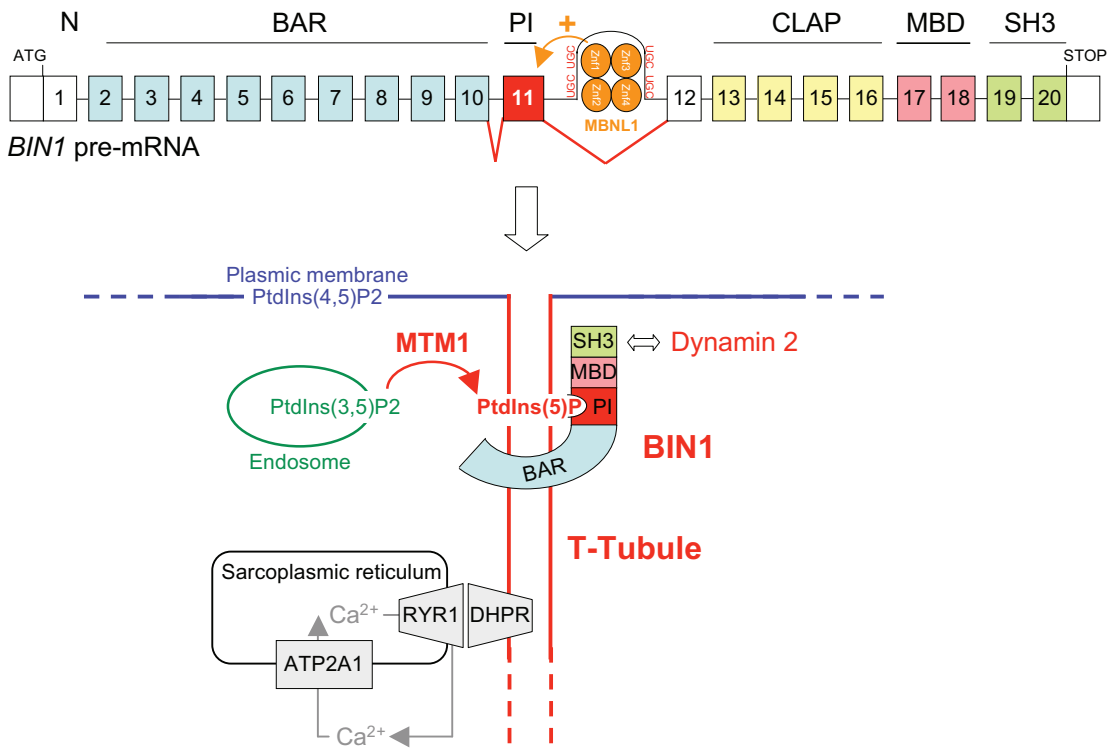


■ Control  
□ U7-ex11AS

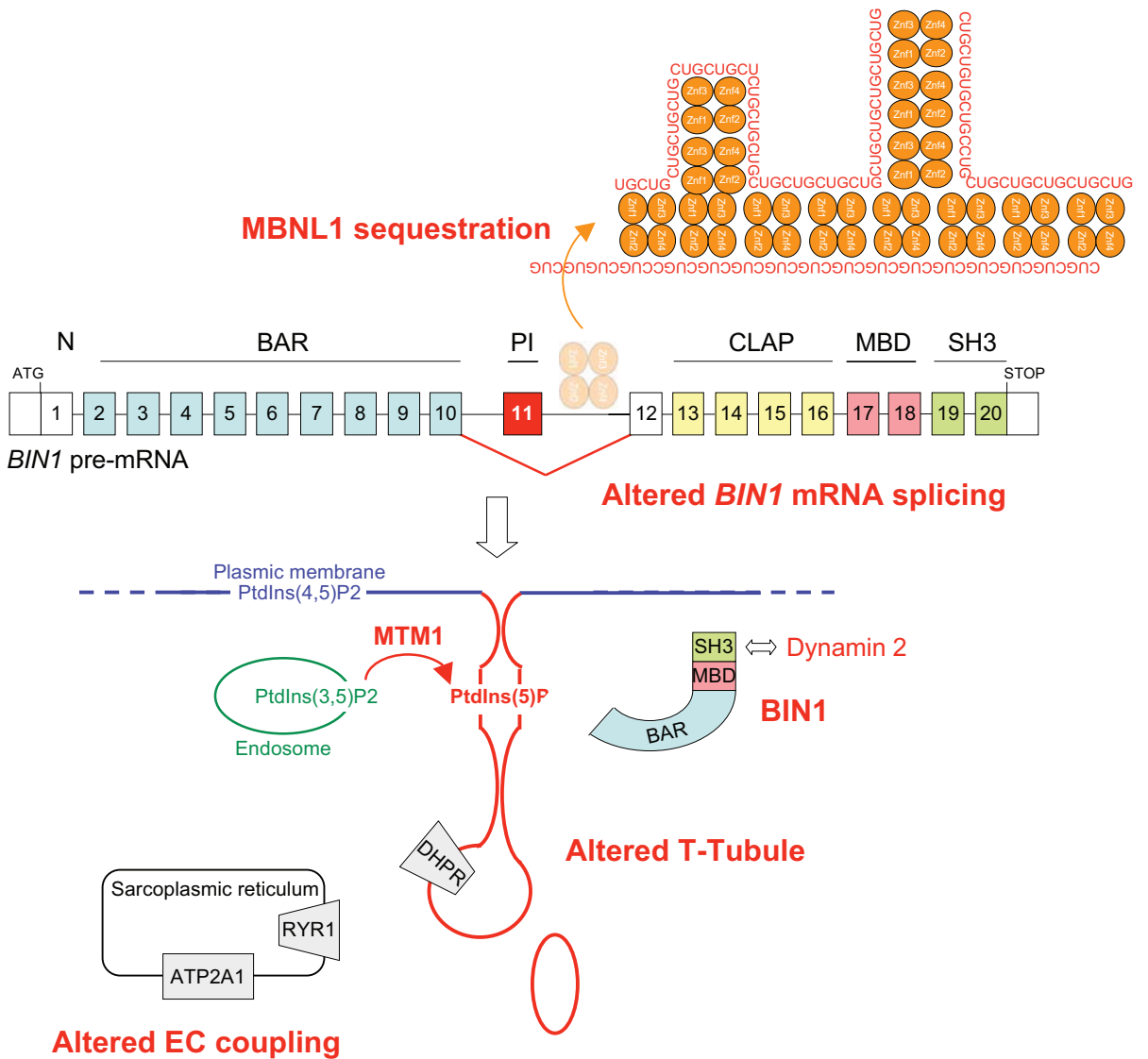


Supplementary Figure 6

a



b



### **V. Défauts moléculaires des mutations de la dynamine 2 dans les myopathies centronucléaires et les neuropathies de Charcot-Marie-Tooth**

#### **A. Contexte de l'étude : état initial des connaissances**

Des mutations dans le gène de la dynamine 2 (DNM2) sont associées à deux maladies, la forme autosomique dominante des myopathies centronucléaires (ADCNM) et la forme dominante intermédiaire de la neuropathie de Charcot-Marie-Tooth (DI-CMT) parfois classée en CMT2B, affectant deux tissus très différents : les muscles squelettiques et les nerfs périphériques.

Les mutations identifiées chez les patients ADCNM et DI-CMT se situent aussi bien dans le domaine intermédiaire que dans le domaine PH de la dynamine 2, sans distinction réelle pour l'une ou l'autre des maladies. Il faut tout de même noter qu'une petite majorité des mutations pour les DI-CMT sont retrouvées pour le moment dans le domaine PH, tandis que pour les ADCNM les mutations se retrouvent dans les deux domaines.

La dynamine 2 est une protéine impliquée dans le trafic membranaire. En effet, la dynamine 2 est une protéine cytoplasmique associée aux clathrines et impliquée dans la formation des vésicules lors de l'endocytose. Elle est capable de polymériser sous forme d'hélice lorsqu'elle est liée au guanosine triphosphate et est capable de se lier aux protéines contenant un domaine SH3 telles que l'amphiphysine 2/BIN1, l'endophiline 1 et la cavéoline 1, via son domaine PRD.

### **B. Question biologique : les mutations de la dynamine 2 identifiées chez des patients atteints de myopathies centronucléaires ont-elles le même impact fonctionnel que les mutations identifiées chez des patients atteints de neuropathies de Charcot-Marie-Tooth ?**

Nous savions que la dynamine 2 est une protéine impliquée aussi bien dans les ADCNM que dans les DI-CMT, donc aussi bien dans une myopathie que dans une neuropathie. Au début de ma thèse, les mutations retrouvées chez des patients atteints de myopathies se retrouvaient principalement dans le domaine intermédiaire de la dynamine 2 tandis que les mutations identifiées chez les patients atteints de neuropathie étaient retrouvées dans le domaine d'homologie à la pleckstrine (PH). La question qui se posait était de savoir si le phénotype des patients était plutôt dû au domaine touché ou à la mutation en elle-même.

A cette époque, nous avons aussi montré l'implication de BIN1 dans la forme autosomique récessive des myopathies centronucléaires. De nombreuses études avaient montré le lien direct entre BIN1 et la dynamine 2 via leurs domaines SH3 et PRD, respectivement. Enfin, lors de l'identification des mutations dans BIN1, nous avons montré que cette protéine est capable de tubuler les membranes en surexpression dans des cellules COS mais surtout qu'elle est capable de recruter la dynamine 2 à ces tubules membranaires.

De nombreuses études avaient aussi montré l'implication de la dynamine 2 dans la voie d'endocytose. En effet, la dynamine 2 est capable d'intervenir dans l'endocytose de la transferrine. La transferrine est une protéine qui transporte le fer dans le sang. On parle alors de fero-transferrine qui contient trois ions  $Fe^{3+}$ . La fero-transferrine va alors se fixer à son récepteur et ils vont être internalisés dans la cellule. Ils vont ensuite être transportés vers les endosomes précoces. A ce niveau (organelle ayant un pH de 5 environ), il n'y a pas de dissociation entre la fero-transferrine et son récepteur mais le fer se sépare de la protéine. La protéine sans fer est alors appelée « apo-transferrine » et elle va retourner vers la membrane plasmique. Au niveau de la membrane plasmique (pH de 7), le récepteur va alors relarguer l'apo-transferrine, qui va pouvoir se recharger en fer et recommencer un nouveau cycle.

Afin de déterminer si les mutations identifiées chez les patients ADCNM et celles des patients DI-CMT étaient responsables des mêmes dysfonctions cellulaires, nous avons étudié leur impact sur certaines fonctions connues de la dynamine 2 telles que sa capacité à être

recrutée aux tubules membranaires formés par la surexpression de BIN1 et son implication dans l'endocytose de la transférine.

### C. Matériel et méthodes

#### 1. Production d'ADN plasmidique

L'équipe possédait, avant mon arrivée, des vecteurs Gateway d'entrée contenant les différents mutants de la dynamine 2 identifiés dans le laboratoire et celui de BIN1 sauvage ainsi que des vecteurs de sortie GFP et Ds-Red. J'ai utilisé ces vecteurs afin d'obtenir de l'ADN plasmidique de différentes constructions : DNM2-WT-GFP, DNM2-R462W-GFP, DNM2-K562T-GFP, DNM2- $\Delta$ PRD-GFP et BIN1-WT-Ds-Red.

J'ai donc réalisé une réaction LR (réaction de liaison) avec les vecteurs Gateway d'entrée et les vecteurs de sortie afin d'obtenir les constructions souhaitées. La réaction LR permet de transférer les fragments d'ADN dans les différents vecteurs d'expression mis à disposition. 100 ng de vecteur de sortie auxquels sont ajoutés 100 ng de vecteur d'entrée, du tampon LR 5X, du TE pH8 (TE = 10 mM Tris-HCl – 1 mM EDTA) et le mélange comprenant la LR clonase, sont incubés pendant une heure à température ambiante. A ce mélange est alors ajouté des protéinases K (2  $\mu$ g/ $\mu$ l) et le tout est incubé pendant 10 minutes à 37°C. A ce stade, la réaction LR peut être conservée jusqu'à une semaine à -20°C.

Une réaction de transformation est alors réalisée : 2  $\mu$ l de la réaction LR sont incubées avec 50  $\mu$ l de bactéries compétentes (DH5 $\alpha$ , BL21 ou XL1) pendant 30 minutes sur glace. La réaction subit alors un choc thermique pendant 1 minute à 45°C et 150  $\mu$ l de milieu LB stérile sont ajoutés. La réaction est incubée pendant 1 heure à 37°C puis 100  $\mu$ l du mélange réactionnel sont étalés sur des boîtes de Pétri contenant du LB agar et l'antibiotique adéquate. Les boîtes de Pétri sont incubées une nuit à 37°C. Puis deux colonies de bactéries sont piquées des boîtes de Pétri et sont placées dans 3 ml de milieu LB avec l'antibiotique adéquate et sont incubées une nuit à 37°C. Le lendemain, les pré-cultures sont utilisées pour réaliser une mini-préparation d'ADN.



## Résultats

---

Le kit NucleoSpin Plasmid a été utilisé pour purifier l'ADN plasmidique d'intérêt. La culture bactérienne de 3 ml contenant le plasmide a été centrifugée (11 000 g, 1 min, à température ambiante) et le culot est resuspendu dans 250 µl de tampon A1 en vortexant vigoureusement la solution. 250 µl de tampon A2 a ensuite été ajouté et le tout a été incubé 5 min à température ambiante après huit mélanges par inversion. L'ADN chromosomique a ensuite été précipité en ajoutant 300 µl de tampon A3, la solution a été incubée 5 min à température ambiante après huit inversions du mélange. Le précipité blanc formé après une centrifugation (11 000 g, 15 min, à température ambiante) a été éliminé et le surnageant a été déposé sur une colonne et centrifugé pendant 1 minute à température ambiante à 11 000 g. La colonne a ensuite été lavée avec 600 µl de tampon A4 et centrifugée pendant 1 minute à 11 000 g à température ambiante puis une nouvelle fois pendant 2 minutes, avant d'éluer l'ADN plasmidique avec 50 µl d'eau milliQ et de centrifuger la colonne pendant 1 minute à température ambiante à 11 000 g. La concentration d'ADN plasmidique, ainsi récupéré, a été calculée à partir du rapport de la densité optique des acides nucléiques sur la densité optique protéique (DO=1 équivaut à 32 mg/ml).

### **2. Culture de cellules et transfection**

Cf. Matériel et Méthodes pages 91.

### **3. Test d'endocytose de la transférine**

Cette technique repose sur le fait que le récepteur de la transférine va être internalisé, dès que la transférine sera fixée à son récepteur, puis le récepteur et la transférine vont suivre la voie de recyclage dans la cellule (Figure 30). Le récepteur va alors être recyclé et pourra être réutilisé. Si la transférine n'est pas internalisée les différents lavages enlèveront toute la transférine résiduelle et elle ne sera pas visible par la suite en microscopie.

Deux conditions sont toujours appliquées pendant ce test : toujours à 4°C : les plaques sont toujours placées à 4°C (elle servira de contrôle négatif car l'endocytose ne peut se faire et la transférine devra donc se retrouver à l'extérieur des cellules) et jamais à 37°C, les plaques sont placées à 37°C (condition test).

## Résultats

---

Des cellules (COS-1) ont été cultivées jusqu'à atteindre 50 à 80% de confluence. Les cellules ont alors été traitées avec de la trypsine diluée à 37°C. La digestion par la trypsine diluée a été arrêtée avec du milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 1g/L glucose / 5% Fœtal Calf Serum (FCS) / Gentamicine. Après une dilution au 1/5, les cellules ont été déposées dans des boîtes 24 puits (Multiwell 24 wells, #353046, Falcon) contenant des lamelles (de diamètre 12 mm). Après un minimum de 4h d'incubation à l'étuve, les cellules ont été transfectées en utilisant le réactif Fugène. Un mélange constitué de 50 µl de milieu dépourvu de FCS (DMEM 1g/l glucose), 1,5µl de Fugène-6 (#11814443001 ; Roche Applied Science) et de 0,5 µg d'ADN a été préparé pour chaque puits et laissé 10 min à température ambiante. Il a ensuite été déposé sur les cellules COS rincées avec leur milieu. Les cellules traitées ont été incubées pour la nuit à 37°C.

Le lendemain les puits sont lavés plusieurs fois avec du milieu sans FCS et sont laissés au repos pendant 2 heures à 37°C dans du milieu sans FCS. Après ces deux heures, les plaques « contrôle négatif » sont placées à 4°C pour le reste de la manipulation.

Dans un eppendorf, 5 µg/ml de Transférine-Alexa 594 (Cy3) et 250 µl de milieu sans FCS, sont ajoutés à chaque puits puis laissés 15 min à 37°C pour la condition test et à 4°C pour la condition contrôle négatif.

Après 15 min, les puits sont rincés avec du PBS 1X plusieurs fois afin d'enlever tout le milieu et plus particulièrement la transférine qui n'aurait pas été internalisée. Puis les cellules sont fixées au PFA 4% afin d'être analysées par microscopie optique ou par microscopie confocale.

#### **4. Immunofluorescence et microscopie**

Cf. matériel et méthodes page 92.

## D.Résultats

### 1. Localisation cellulaire des mutants

Dans un premier temps, nous avons voulu savoir si la localisation des mutants de la dynamine 2 était semblable à celle de la dynamine 2 sauvage. Afin d'étudier la localisation de la DNM2 dans des cellules en culture, j'ai donc surexprimé les différentes constructions DNM2 WT, K44A, R465W et K562E liée à la GFP dans des cellules COS en culture. Nous avons à l'époque choisi ces mutations car les mutations identifiées chez les patients ADCNM se retrouvaient principalement dans le domaine intermédiaire et la mutation p.R465W était la mutation la plus retrouvée chez ces patients. Tandis que les mutations chez les patients CMT se retrouvaient principalement dans le domaine PH et la plus retrouvée était la mutation p.K562E. Enfin le mutant artificiel, p.K44A, est un mutant très utilisé dans les études sur les fonctions de la dynamine 2 car il est incapable de lier le GTP et est donc incapable d'endocyter la transférine.

Si la localisation des constructions DNM2 WT, K44A et K562E semble plutôt être cytoplasmique avec en plus un marquage aux ruffles de la cellule, le marquage du mutant R465W GFP semble étonnement plutôt localisé autour du noyau de la cellule sous la forme de point et ne semble pas marquer les ruffles de la cellule (Figure 31). Ces résultats restent à confirmer car je n'ai pas assez reproduit ces expériences, et d'autres types de fixation pourront être utilisés afin de confirmer ou non cette délocalisation de la protéine mutante.

D'après ces résultats préliminaires, il semblerait donc que la mutation identifiée dans le domaine intermédiaire de la dynamine 2 et retrouvée chez des patients ADCNM entraîne une délocalisation de la protéine dans la cellule pour se retrouver autour du noyau. Tandis que la mutation identifiée dans le domaine PH de la dynamine 2 et retrouvée chez des patients DI-CMT semble avoir une localisation normale cytoplasmique et au niveau des ruffles de la cellule.

### **2. Impact sur le recrutement aux tubules membranaires formés par la surexpression de BIN1**

Comme nous avons montré que la surexpression de BIN1 dans des cellules COS-1 permet de tubuler les membranes et que BIN1 est capable de recruter la dynamine 2 à ces tubules membranaires, j'ai donc co-surexprimé les différentes constructions de la dynamine 2 : DNM2 WT,  $\Delta$ PRD, R465W et K562E liée à la GFP avec la construction BIN1-WT-Ds-Red. La construction DNM2  $\Delta$ PRD a été utilisée car le domaine PRD de la dynamine 2 lie le domaine SH3 de BIN1. Ce mutant ne sera donc plus capable de se lier à BIN1 et ne sera donc plus recruté aux tubules membranaires formés par BIN1, il sert ainsi de control négatif.

J'ai tout d'abord vérifié que ma construction BIN1 Ds-Red était bien capable de tubuler les membranes et était surtout capable de recruter la dynamine 2 WT GFP à ces tubules membranaires, ces tubules membranaires ne sont donc pas dépendant du tag utilisé. De plus, j'ai pu observer que le mutant DNM2  $\Delta$ PRD n'était en effet plus capable d'être recruté aux tubules membranaires (Figure 32).

Par contre les mutants p.R465W et p.K562E de la DNM2 sont toujours capables d'être recrutés au niveau des tubules membranaires de BIN1 (Figure 32). Ces résultats sont en accord avec le fait que les mutations identifiées chez les patients atteints de CNM et de DI-CMT ne sont pas retrouvées dans le domaine PRD mais dans le domaine intermédiaire et le domaine PH, respectivement, deux domaines qui ne sont pas impliqués dans l'interaction avec BIN1.

### **3. Impact sur l'endocytose de la transférine**

Par la suite, j'ai voulu tester l'impact de ces mutations sur l'endocytose de la transférine. En effet, la dynamine 2 est une protéine impliquée dans l'endocytose, et particulièrement celle de la transférine. Il a été montré que le mutant K44A de la dynamine 2 bloque l'endocytose de la transférine, contrairement à la dynamine 2 sauvage. De plus une étude récente, sur deux mutations retrouvées chez des patients DI-CMT avait montré que ces deux mutations étaient responsables d'une diminution importante de l'internalisation de la transférine tout comme le mutant K44A (Tanabe and Takei 2009).

## Résultats

---

Nous avons donc voulu connaître l'impact des mutations identifiées chez les patients ADCNM et DI-CMT sur la voie d'endocytose de la transférine. J'ai donc surexprimé dans des cellules COS, les constructions DN2 WT, K44A, R465W et K562E GFP et j'ai réalisé un test d'endocytose de la transférine. Après analyse par microscopie optique, j'ai constaté qu'avec la dynamine 2 sauvage, la transférine est bien internalisée dans les cellules COS, et qu'il en est de même pour le mutant p.R465W qui ne semble donc pas avoir de défaut d'internalisation de la transférine (Figure 33).

Par contre, avec le mutant p.K44A ainsi qu'avec le mutant p.K562E retrouvé chez un patient atteint de DI-CMT, j'ai pu observer des défauts d'internalisation de la transférine puisqu'il n'y avait pas de transférine à l'intérieur des cellules (Figure 33). Ce défaut peut être expliqué car ce mutant p.K44A est incapable de lier le GTP et ne peut donc pas fissionner les vésicules. Pour le mutant p.K562E, ce défaut pourrait être expliqué par l'arrêt de la liaison de la dynamine 2 au PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, le domaine PH étant un domaine de liaison aux phosphoinositides.

Il semblerait donc que la mutation identifiée chez un patient atteint de neuropathie de Charcot-Marie-Tooth est pour conséquence des défauts d'endocytose, contrairement à la mutation CNM dont l'impact moléculaire reste encore à être élucidé.

### **E. Conclusion**

Cette étude semble indiquer qu'il y aurait des impacts différents des mutations retrouvées chez les patients, permettant ainsi d'orienter vers le diagnostic d'une myopathie centronucléaire ou d'une neuropathie de Charcot-Marie-Tooth.

Ces observations doivent être vérifiées puisque seule une mutation du domaine intermédiaire responsable d'une ADCNM et une seule mutation du domaine PH responsable d'une DI-CMT ont été testées. Mes résultats n'indiquent donc pas si toutes les mutations des patients ADCNM mènent à des défauts de localisation de la dynamine 2 et si toutes les mutations des patients DI-CMT sont responsables de défauts d'endocytose. En effet, ces défauts pourraient être liés au domaine donc toutes les mutations du domaine intermédiaire seraient responsables d'un défaut de localisation et toutes les mutations du domaine PH seraient responsables de défauts d'endocytose. Cela impliquerait donc que suivant l'acide

## Résultats

---

aminé touché, à l'acide aminé près, le patient pourrait soit avoir une myopathie soit une neuropathie.

Afin de vérifier mes résultats d'endocytose de la transférine, qui ne semblent pas totalement en accord avec une récente étude (Bitoun, Durieux et al. 2009), de nouvelles études sont menées par Catherine Koch, dans l'équipe de Jocelyn Laporte, afin de tester ces mutants d'une façon plus approfondie et en utilisant d'autres techniques telles que le FACS et la quantification de signaux de fluorescence de la transférine. Ces résultats semblent en accord avec mes résultats préliminaires puisqu'elle a aussi observé une forte diminution de l'internalisation de la transférine avec le mutant p.K562E retrouvé chez des patients neuropathes et une diminution très faible avec le mutant p.R465W.

Ainsi de nombreuses études semblent montrer des défauts d'internalisation de la transférine pour le mutants p.K562E (Tanabe and Takei 2009) alors que nos résultats et ceux de Bitoun et collègues ne semblent pas en accord (Bitoun, Durieux et al. 2009). Une explication, quant à la différence de nos résultats et ceux de Bitoun et collègues, pourrait être la différence dans le temps de surexpression de la dynamine 2 dans les cellules COS. En effet, de nombreuses études ont montré qu'une surexpression supérieure à 16 h dans les cellules de la dynamine 2 liée à la GFP était responsable de l'apparition de forts agrégats de la dynamine 2. Ces résultats contradictoires pourraient donc être du au fait que Bitoun et collègues en surexprimant aussi longtemps, presque 48 h, la dynamine crée des agrégats qui vont empêcher l'internalisation de la transférine.

Enfin, la description clinique de 5 patients atteints d'ADCNM semble montrer qu'en plus des symptômes musculaires tels que la faiblesse musculaire, l'ophtalmoparésie et les contractures des tendons d'Achille, les patients présentent aussi des signes cliniques et neurophysiologiques légers d'atteinte centrale et périphérique habituellement retrouvées chez les patients atteints de DI-CMT (Echaniz-Laguna, Nicot et al. 2007). Ces résultats semblent donc en accord avec une possible superposition des symptômes d'ADCNM et de DI-CMT, du probablement à des défauts moléculaire et cellulaire proche voir commun.

### **VI. Impact des protéines CNM (MTM1 et BIN1) sur la morphologie cellulaire : utilisation d'une nouvelle technique d'imagerie**

**Publication 4: « From dynamic live cell imaging to 3D ultrastructure : novel integrated methods for high pressure freezing and correlative light-electron microscopy »**

#### **A.Contexte de l'étude : état initial des connaissances en microscopie**

En biologie cellulaire, l'utilisation de la microscopie optique et électronique est courante. En effet, la microscopie optique et plus particulièrement la microscopie confocale est l'une des percées les plus notables du siècle dernier. Elle a donné aux utilisateurs la possibilité d'observer l'intérieur des cellules et de les visualiser en trois dimensions. L'inconvénient majeur de la microscopie à fluorescence conventionnelle est une perte de résolution due à l'émission de fluorescence défocalisée qui se superpose à l'image du plan focale. La microscopie confocale a permis de pallier ces inconvénients puisque son principe est de pratiquer des coupes optiques virtuelles dans l'objet observé et de n'enregistrer que l'image de la fluorescence émise dans le plan (Figure 34). Elle offre ainsi de nombreux avantages pour la localisation *in situ* d'une sonde fluorescente dans des cellules tels que l'élimination du signal fluorescent provenant d'autres plans grâce au pinhole, l'augmentation de la résolution, l'observation simultanée de différentes sondes fluorescentes et l'acquisition de séries de sections optiques permettant une reconstruction 3D.

En plus de la microscopie confocale, la microscopie en contraste de phases peut être utilisée afin de repérer des cellules vivantes. En effet, les objets à examiner ne présentent entre eux ou avec leur environnement que de très petites différences d'indice de réfraction et seule une très petite différence de la phase de la lumière qui les traverse permet de les différencier. Leur principale caractéristique est donc qu'en éclairage en fond clair, on ne peut pas ou difficilement les discerner à moins qu'ils ne présentent une épaisseur notable. C'est en 1930 que Frits Zernike inventa le procédé de contraste de phase qui permet de voir au microscope le comportement de cellules vivantes et des bactéries, ce qui lui valut le Prix



## Résultats

---

Nobel de Physique en 1953. Ce microscope est ainsi capable de transformer la différence de phase en intensité de gris permettant ainsi de voir des objets autrement invisibles tels que des cellules dans leur milieu. Ces deux techniques de microscopie optique cumulées permettent de repérer des cellules vivantes dans leur milieu grâce à des repères et d'identifier des structures cellulaires bien spécifiques.

Malgré les récentes avancées en microscopie optique, comme les objectifs à immersion de forte ouverture numérique, qui permettent d'améliorer le contraste et d'avoir une très faible profondeur de champ, on atteint une limite de résolution aux alentours de 150 nm. C'est pourquoi, à partir de la définition et de l'évaluation du pouvoir de résolution du microscope optique, des recherches ont permis d'aboutir à l'utilisation des faisceaux d'électrons afin d'augmenter cette résolution.

En effet, les microscopes électroniques ont un plus grand pouvoir de résolution que les microscopes optiques. Ils utilisent des rayonnements électromagnétiques et peuvent obtenir des grossissements beaucoup plus élevés allant jusqu'à 2 millions de fois, alors que les meilleurs microscopes optiques sont limités à un grossissement de 2000 fois (Figure 35). Les deux types de microscopes électroniques et optiques ont une résolution limite, imposée par la longueur d'onde du rayonnement qu'ils utilisent. La résolution et le grossissement plus grands du microscope électronique sont dus au fait que la longueur d'onde d'un électron (longueur d'onde de Broglie) est beaucoup plus petite que celle d'un photon de lumière visible.

Il existe plusieurs types de microscopie électronique tels que la microscopie en transmission, la microscopie à balayage et la microscopie à balayage en transmission.

La microscopie électronique à transmission (MET) est une technique permettant d'observer des organites intracellulaires sur les échantillons coupés, de localiser des molécules avec des marqueurs (Figure 35a.). Elle est utilisée également pour visualiser des structures moléculaires (protéines ou acides nucléiques) et des microorganismes entiers par les techniques de colorations négatives. Un microscope électronique à transmission utilise un faisceau d'électron pour illuminer l'échantillon, et les électrons traversant l'échantillon, donc transmis, sont détectés sur un écran. Sa résolution se situe aux alentours de 0,34 nm, c'est à dire 450 fois plus que celle du meilleur microscope optique, mais il ne permet de visualiser que des échantillons fixés et donc sans vie.

## Résultats

---

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique permettant de visualiser la surface de structures massives, l'échantillon apparaissant en volume (Figure 35b.). C'est ainsi que la structure et l'évolution de gels, de mousses ou d'émulsions sont dévoilées, à moins que l'on ne préfère étudier les interactions entre les bactéries et leur support. Un microscope électronique à balayage utilise un faisceau d'électrons très fin qui balaye, point par point, la surface de l'échantillon à observer. Le principe du balayage consiste à parcourir la surface de l'échantillon par lignes successives et à transmettre le signal recueilli via un détecteur à un écran cathodique dont le balayage est exactement synchronisé avec celui du faisceau incident.

La microscopie électronique à trois dimensions (ou tomographie électronique) est une technique d'étude qui consiste à reconstruire le volume d'un nano-objet à partir d'une série d'observations bidimensionnelles. Utilisée au départ essentiellement par les biologistes, depuis quelques années plusieurs groupes de recherche travaillant dans le domaine des matériaux commencent également à explorer ses possibilités.

Plusieurs techniques peuvent alors être applicables aux différents microscopes décrits ci-dessus. En effet on peut avoir recours à la technique d'immunomicroscopie électronique ou de cryomicroscopie électronique.

L'immunomicroscopie électronique permet de localiser des antigènes après fixation et inclusion en résine méthacrylique à basse température.

La cryomicroscopie électronique repose sur l'observation d'objets biologiques hydratés et congelés, proches de leur état natif en solution, en s'affranchissant de la présence de colorant ou de fixateur chimique. Couplée à des techniques d'analyse d'images, elle permet d'obtenir des informations structurales avec une résolution de 7 à 30 Å. La cryomicroscopie électronique utilise un mode de préparation des molécules très spécifique. Elle consiste à congeler très rapidement de minces échantillons hydratés dans de l'azote liquide, de façon à les figer dans une glace amorphe. Cette méthode n'utilise aucun additif, préserve la structure native de l'échantillon tout en permettant d'accéder à la structure interne de particules complexes. Les images obtenues sont des projections de toute l'épaisseur de l'échantillon, mais ne possèdent cependant qu'un contraste très faible. La procédure classique

d'acquisition d'images permet une reconstruction 3D à partir de deux images d'un même objet obtenu sous différents angles ( $\pm 15^\circ$ ) dans des conditions d'éclairage à faible dose.

Les différents types de microscopie sont donc chacun caractérisés par leur résolution, leur domaine d'application et leur contrainte d'utilisation qui rendent impossible l'étude d'une même cellule vivante à différentes échelles de résolution (micrométrique à subnanométrique). Pour contourner cette difficulté, il est nécessaire d'étudier la même cellule (ou des cellules identiques) successivement à l'aide de plusieurs types de microscopie puis de combiner les données obtenues.

Aujourd'hui cette démarche, dénommée microscopie corrélative, permet de réaliser une véritable imagerie moléculaire multi-échelle et multidimensionnelle indispensable à la compréhension des structures et fonctions cellulaires.

### **B. Question biologique : les structures appelées « needles » formées par la surexpression de MTM1 dans des cellules en culture, sont-elles des tubules de membranes ?**

Lors de la surexpression de la myotubularine liée à la GFP dans des cellules COS auxquelles nous faisons subir un choc hypoosmotique, des petites structures, que nous nommons « needles », peuvent être observées. Ces « needles » n'ont jamais été réellement caractérisés si ce n'est qu'ils colocalisent partiellement avec la phalloïdine et qu'ils ne semblent donc pas constitués un réseau d'actine.

Nous savions aussi que la surexpression de BIN1 dans des cellules COS provoque la formation de tubules membranaires.

Sachant que ces deux protéines sont impliquées dans les myopathies centronucléaires liées au chromosome X pour la myotubularine et autosomiques récessives pour BIN1, nous voulions caractériser ces « needles » plus amplement afin de déterminer s'ils peuvent être des tubules membranaires tout comme les tubules formés lors de la surexpression de BIN1.

Pour cela, nous voulions utiliser une technique innovante, la CLEM (Correlative Light and Electron Microscopy) afin de combiner les avantages de la microscopie optique (champ large, fluorescence, imagerie du vivant) à ceux apportés par la microscopie électronique

## Résultats

---

(résolution, ultrastructure, analyse élémentaire). Cette technique n'étant pas d'usage à l'IGBMC, nous avons collaboré avec la plateforme de microscopie électronique et optique (IGBMC) afin de la développer.

### C. Résultats

Nous avons deux objectifs pour cette étude. Dans un premier temps développer la technique de microscopie corrélative au sein de l'IGBMC, mais surtout étudier les « needles » formés par la surexpression de la myotubularine après un choc hypoosmotique, aussi je ne discuterai que peu du développement de la technique dans ce manuscrit.

Un nouveau substrat de culture pour cellule adhérente a été développé afin de faciliter la localisation des cellules en microscopie en contraste de phase et en microscopie électronique. Ce nouveau substrat combiné à la congélation à haute pression utilisée grâce à l'EMPACT2, nous a permis de combiner l'étude de phénomènes dynamiques, de quelques secondes à plusieurs heures, étudiés par microscopie optique (confocal et time-lapse) à la résolution de la microscopie électronique en transmission, à balayage et à trois dimensions. L'utilisation de l'EMPACT2 nous a permis de conserver l'ultrastructure et les épitopes d'une façon optimale. En effet, l'EMPACT2 est capable de congeler à haute pression des échantillons permettant ainsi de fixer (vitrifier) ces échantillons, sans ajout de fixateur chimique. Il permet ainsi de transformer l'eau en glace amorphe en diminuant la température de l'échantillon en quelques secondes jusqu'à  $-196^{\circ}\text{C}$ . Ainsi grâce à la microscopie optique, nous avons étudié la fonctionnalité de protéines données dans des conditions physiologiques, tandis que la microscopie électronique nous a permis d'étudier les mêmes protéines en respectant l'organisation anatomique présente autour avec une bien meilleure résolution.

En utilisant ces techniques, nous avons pu étudier la localisation des « needles » formés par la surexpression de MTM1 fusionnée à la GFP. En effet, nous avons pu obtenir des informations sur ces structures en corrélant leur localisation par un marquage à l'immunogold observé en microscopie électronique en transmission à l'analyse de la surface cellulaire observée par microscopie électronique à balayage. Nous avons alors mis en évidence que ces « needles » étaient capables de polymériser juste sous la membrane

## Résultats

---

plasmique, mais surtout qu'ils n'étaient pas des structures tubulaires de la membrane plasmique. Tandis que l'analyse des tubules membranaires formés par la surexpression de l'isoforme musculaire de l'amphiphysine 2, l'isoforme BIN1, dans des cellules, montre bien qu'ils s'invaginent à partir de la membrane plasmique vers des régions périnucléaires.

Ces résultats suggèrent donc que la myotubularine pourrait être impliquée dans la reconnaissance de sous-domaine membranaire, tandis que l'amphiphysine 2/BIN1 permettrait la courbure de sous-domaine de la membrane plasmique comme anticipé par d'autres études (Lee, Marcucci et al. 2002).

### **D. Ma contribution au papier**

J'ai contribué à ce travail en m'occupant de toute la partie en amont de la microscopie optique ainsi que de la microscopie optique jusqu'à l'étape de fixation des grilles contenant les cellules vivantes. J'ai ainsi cultivé des cellules COS surexprimant la myotubularine et je leur ai fait subir un choc hypoosmotique. En analysant les résultats de ce choc en microscopie confocal, j'ai observé la présence et surtout la formation de ces « needles ». De plus, j'ai réalisé le même type de choc sur des cellules COS surexprimant la myotubularine avec d'autres tags que la GFP tel que les tags B10 et Myc, j'ai aussi surexprimé des membres de la famille des myotubularines liés à la GFP, tels que MTMR2 et MTMR4.

J'ai ainsi remarqué que ces structures sont non seulement dépendantes de la myotubularine, puisque les deux plus proches protéines de la myotubularine ne forment pas de « needles » après un choc hypoosmotique, mais elles semblent aussi dépendantes de la présence du tag GFP, puisque la surexpression de la myotubularine taguée avec un B10 ou Myc suivie d'un choc hypoosmotique ne crée pas de « needles » non plus. En effet, lors de la surexpression de MTMR2 suivie d'un choc hypoosmotique, on peut observer que MTMR2 reste cytoplasmique et est concentrée autour de vésicules formées à cause de ce choc hypoosmotique. En revanche, la surexpression de MTMR4 suivie d'un choc hypoosmotique ne semble pas changer la localisation de la protéine au niveau des endosomes.

## Résultats

---

Enfin, j'ai observé que la formation des « needles » pouvait être reversée par le remplacement du milieu osmotique par du milieu normal de culture cellulaire, et que cela était toujours le cas après cinq changements de milieu d'affilé.

### **E. Conclusion de l'étude**

La biologie se base de plus en plus sur l'image, qu'elle soit issue de microscopie à fluorescence pour la localisation de molécules d'intérêt ou de microscopie électronique pour l'ultrastructure cellulaire. Bien que différentes, ces deux approches de microscopie sont intrinsèquement complémentaires. En effet, la microscopie fluorescente permet facilement d'avoir une vue globale sur un tissu ou plusieurs cellules, mais n'a qu'une résolution limitée, contrairement à la microscopie électronique qui, elle, a une résolution de l'ordre du nanomètre mais il est alors impossible d'avoir une vue globale de l'échantillon ou de repérer facilement des zones d'intérêt.

La microscopie corrélative vise à étudier un même échantillon sous les deux modalités en fluorescence (ou optique) et en électronique. Pour contourner la limitation des différents types de microscopie (résolution différentes, contraintes d'utilisation etc.), il est nécessaire d'étudier les cellules successivement à l'aide de plusieurs types de microscopie puis de combiner les données obtenues. Ceci permet ainsi de réaliser une imagerie moléculaire multi-échelle et multidimensionnelle.

De plus couplée à la technique de tomographie, il est possible d'obtenir un volume tridimensionnel observable en microscopie électronique.

Cette étude, nous a permis de développer cette nouvelle technique innovante. Elle permet ainsi de fournir la possibilité de caractériser des événements dynamiques au niveau ultrastructurel en combinant la microscopie optique à la microscopie électronique, à l'immunomicroscopie électronique, à la tomographie et à la microscopie à balayage.

De plus, cette démarche nous a permis d'étudier les « needles » formés suite à la surexpression de la GFP-MTM1 après un choc hypoosmotique. Nous savions que ces structures n'étaient pas formées par un réseau d'actine mais nous n'avions pas d'autres

## Résultats

---

renseignements sur ces structures. Nous voulions donc savoir si elles pouvaient être des tubules membranaires comme ceux formés par la surexpression de BIN1 dans les cellules.

Cette technique nous a permis de remarquer que ces deux structures, « needles » et les tubules membranaires, étaient distinctes, puisque les premiers se forment sous la membrane plasmique tandis que les seconds sont des invaginations de la membrane plasmique. Nous savons aujourd'hui que les « needles » formés ne sont pas des tubules membranaires, qu'ils ne sont pas formés d'actine, qu'ils se forment sous la membrane plasmique et que ce ne sont pas des cristaux puisqu'ils sont réversibles, pourtant nous ne savons toujours pas ce que sont ces structures exactement.

Il faut noter aussi que les « needles » de MTM1 sont non seulement dépendants de MTM1 mais aussi de son tag la GFP, ces structures ne devraient donc pas pouvoir se reproduire dans les cellules. Pourtant une récente étude a montré que la surexpression de MTM1 dans le muscle squelettique est aussi responsable de la formation de saccules subsarcolemmique, ressemblant aux « needles » que nous avons observé (Buj-Bello, Fougousse et al. 2008). Toutefois, ces structures saccules ou « needles » semblent dues à la surexpression de MTM1, il est donc fort probable que ces structures ne soient que des artéfacts et n'apparaissent donc pas dans les fibres musculaires saines.

Cependant les études futures devront tenir compte de ces résultats et mettre le doigt sur le type de membrane qui est la cible de MTM1 et qu'elle serait le contexte biologique de son action.



**Publication 4 :**

**« From dynamic live cell imaging to 3D  
ultrastructure: novel integrated methods for high  
pressure freezing and correlative light-electron  
microscopy. »**

Spiegelhalter C, Tosch V, Hentsch D, Koch M, Kessler P, Schwab Y, Laporte J.

PLoS One. 2010 Feb 3;5(2):e9014.

# From Dynamic Live Cell Imaging to 3D Ultrastructure: Novel Integrated Methods for High Pressure Freezing and Correlative Light-Electron Microscopy

Coralie Spiegelhalter<sup>1,3,4,5</sup>, Valérie Tosch<sup>2,3,4,5,6</sup>, Didier Hentsch<sup>1,3,4,5</sup>, Marc Koch<sup>1,3,4,5</sup>, Pascal Kessler<sup>1,3,4,5</sup>, Yannick Schwab<sup>1,3,4,5\*</sup>, Jocelyn Laporte<sup>2,3,4,5,6\*</sup>

**1** Imaging Centre, IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire), Illkirch, France, **2** Department of Neurobiology and Genetics, IGBMC, Illkirch, France, **3** Inserm, U964, Illkirch, France, **4** CNRS, UMR7104, Illkirch, France, **5** Université de Strasbourg, Illkirch, France, **6** Collège de France, Chaire de Génétique Humaine, Illkirch, France

## Abstract

**Background:** In cell biology, the study of proteins and organelles requires the combination of different imaging approaches, from live recordings with light microscopy (LM) to electron microscopy (EM).

**Methodology:** To correlate dynamic events in adherent cells with both ultrastructural and 3D information, we developed a method for cultured cells that combines confocal time-lapse images of GFP-tagged proteins with electron microscopy. With laser micro-patterned culture substrate, we created coordinates that were conserved at every step of the sample preparation and visualization processes. Specifically designed for cryo-fixation, this method allowed a fast freezing of dynamic events within seconds and their ultrastructural characterization. We provide examples of the dynamic oligomerization of GFP-tagged myotubularin (MTM1) phosphoinositides phosphatase induced by osmotic stress, and of the ultrastructure of membrane tubules dependent on amphiphysin 2 (BIN1) expression.

**Conclusion:** Accessible and versatile, we show that this approach is efficient to routinely correlate functional and dynamic LM with high resolution morphology by EM, with immuno-EM labeling, with 3D reconstruction using serial immuno-EM or tomography, and with scanning-EM.

**Citation:** Spiegelhalter C, Tosch V, Hentsch D, Koch M, Kessler P, et al. (2010) From Dynamic Live Cell Imaging to 3D Ultrastructure: Novel Integrated Methods for High Pressure Freezing and Correlative Light-Electron Microscopy. PLoS ONE 5(2): e9014. doi:10.1371/journal.pone.0009014

**Editor:** Steve H. Caplan, University of Nebraska Medical Center, United States of America

**Received:** October 15, 2009; **Accepted:** January 11, 2010; **Published:** February 3, 2010

**Copyright:** © 2010 Spiegelhalter et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This study was supported by grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the University of Strasbourg (UdS), the Collège de France, the Association Française contre les Myopathies (AFM), Fondation Recherche Médicale (FRM DEQ20071210538), Agence Nationale de la Recherche (ANR-07-BLAN-0065-03, ANR-08-GENOPAT-005) and the E-rare program. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: yschwab@igbmc.fr (YS); jocelyn@igbmc.fr (JL)

## Introduction

Correlative light and electron microscopy (CLEM) defines a variety of techniques that are aimed to visualize the same object with both light microscopy (LM) and electron microscopy (EM). This general description applies to a considerable number of applications where almost all combinations of LM (phase-contrast or fluorescence on living or fixed samples) and EM (immuno-EM, scanning EM, transmission EM, cryo-EM, tomography) have been used during the last few decades [1]. The use of immunofluorescence to select regions of interest (ROI) to be studied by immuno-EM have brought numerous results both on thawed cryosections and on resin sections [2,3,4]. In parallel, several successful CLEM experiments have been made on dynamic phenomena in living cells either by recording the phase contrast [5,6], or by imaging fluorescent dyes [7,8,9,10] and genetically engineered fluorescent proteins [11,12,13,14]. At the EM level, the same objects were then affinity labeled and revealed with electron-dense precipitate [7,9,11,15] or, more commonly used, with gold particles [13,14].

In rare cases when it is impossible to perform any labeling in EM, as for cryo-EM experiments, the fluorescent signal was used to localize the ROI that is then acquired with high resolution EM [10,12].

The method to immobilize the specimen has to be as conservative as possible with regard to the cellular ultrastructure and to the antigenicity. Two options have been used to date: chemical fixation and cryofixation. The first usually introduces a compromise between ultrastructure and labeling efficiency, whereas the second is difficult to achieve on thick or highly aqueous samples. The most powerful technique for immuno-detection on chemically fixed samples is probably the one introduced by Tokuyasu [16,17] as it allows good labeling efficiency with a fine ultrastructural preservation, especially concerning membranes and organelles. This technique has been used with CLEM on cell monolayer [13]. Even though very powerful, cryosections of cell monolayers are technically demanding and probably not suitable for non specialized EM laboratories. Also, the chemical fixation can create artifacts [18,19] and may not allow for the detection of cytosoluble proteins. High pressure freezing (HPF) followed by freeze substitution and resin embedding is a good

alternative [19,20] as it permits a better preservation of cytoplasmic proteins. Ultramicrotomy at room temperature is also much easier and probably more adapted to routine serial sectioning for immuno-EM and for EM tomography. When using HPF as a fixation method, the choice of the culture substrate is important. Aluminum planchettes [21], microscope grids [18], cellulose capillary tubes [20,22], sapphire discs [14,23] and aclar discs [24] have been used with satisfactory results for a large panel of cell types.

A crucial point to succeed in CLEM is to locate at the EM level what has been recorded live in LM. Several strategies have been developed, each of them being adapted to the type of cells to be studied, to the choice of fixation and to the specific EM application used. Growing the cells directly on EM grids has been very successful, especially for cryo-EM [10,12]. While reaching a high degree of correlation and an excellent ultrastructure, this technique is nevertheless limited to very thin samples, i.e. cell processes, and can hardly be adapted to the cell body or nucleus. Also, no immuno-EM can be performed on frozen samples. Cells have also been grown on culture dishes with landmarks [6,7,25] or on marked formvar films [5]. In these cases, chemical fixation was a prerequisite and labeling for EM was either done before embedding [7,26] or necessitated treatments destructive to cellular integrity [6]. Colombelli and coworkers [27] have introduced a way to define and mark a ROI during the live acquisition of cells grown on glass coverslips. After a necessary chemical fixation, patterns were carved on the glass with a pulsed laser, which allowed a precise selection of the ROI during the ultramicrotomy phase. To avoid chemical fixation, Verkade has developed tools to introduce coordinates on adherent cultured cells in experiments using HPF [14]. The cells were grown on sapphire discs and the coordinates were subsequently given by a metallic finder grid placed on top. Very powerful, this technique has reduced the delay between LM acquisition and fixation for EM to about 5 seconds, which is probably the best time resolved CLEM experiment achieved so far. However, the finder grid used to localize the cells is hard to handle and can lead to cell damage. Furthermore the coordinates are not conserved in the thin sections.

In need of an accessible, versatile but accurate method to perform CLEM on living cells, we developed a technique that combines (i) high resolution live recordings of dynamic phenomena, (ii) fast fixation by HPF for optimal ultrastructure and antigenicity preservation, (iii) precise space coordinates for ROI selection at the EM level, and iv) accessibility to different EM applications. This method uses laser pre-micro-patterned aclar discs as culture substrates, that are compatible with cryofixation, followed by resin embedding. The coordinates of the ROIs are conserved throughout the whole preparation steps, and are still visible on the first sections observed in EM. We were able to record at precise time points GFP-tagged myotubularin oligomerization in osmotically challenged living cells. Furthermore, the micro-patterned cell culture substrate is compatible with time-lapse recordings of long lasting events such as cell migration. With a straight forward re-localization of the ROI at the EM level, serial immuno-EM and EM tomography of membrane tubules induced by amphiphysin 2 overexpression was successfully performed on cells previously acquired by live LM. This working protocol was also applied to correlate LM with scanning electron microscopy.

## Results

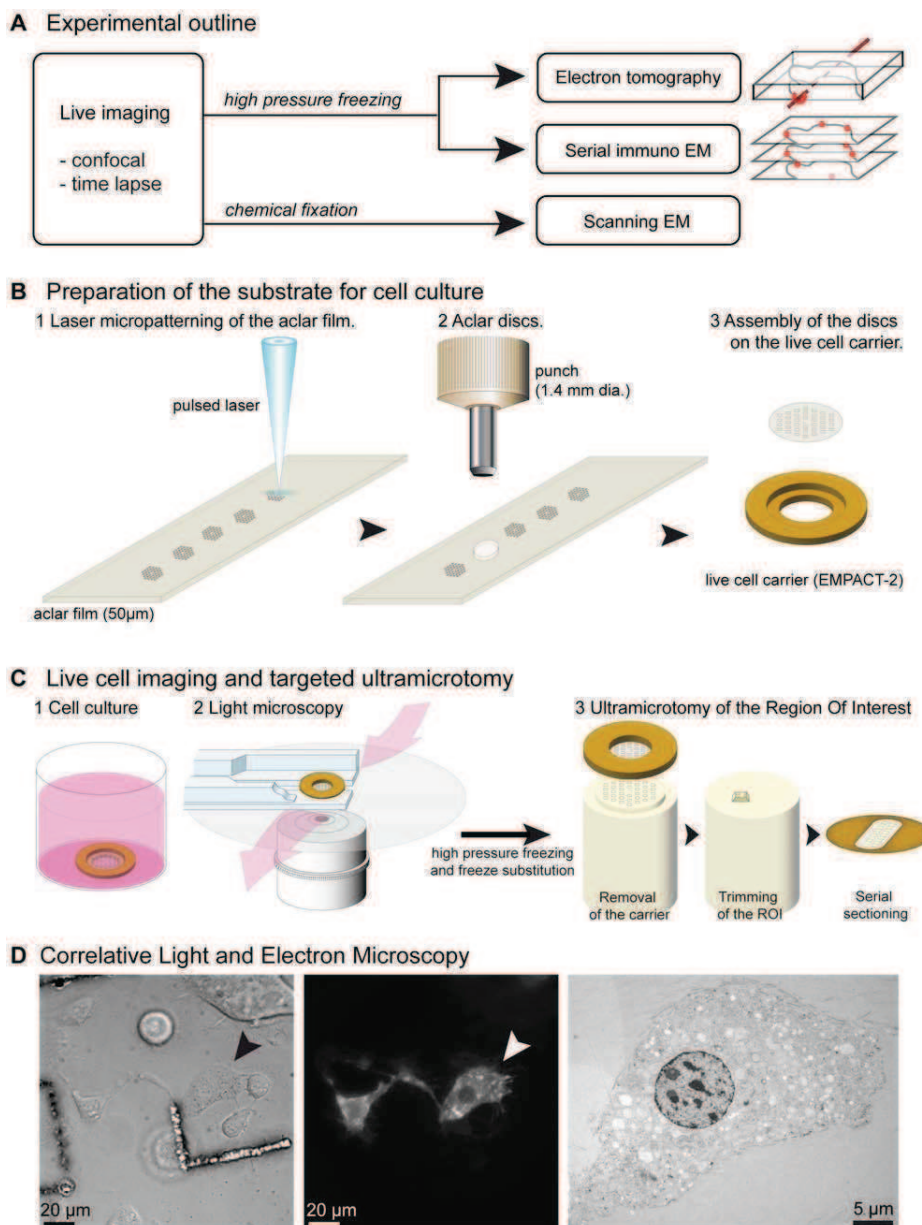
### Development of the Culture Substrate with Embedded Coordinates

To handle living cells for HPF and precisely locate regions of interest, pre-patterning of the culture substrate was performed

with a laser microdissection microscope directly on aclar films (**Fig. 1B** and **Fig. S1** online). This coordinate referencing does not require the use of an EM grid on top of the culture substrate nor the need to carve landmarks after fixation [14,27]. The substrate was coated with collagen and cells seeded and cultured under normal conditions (**Fig. 1C-1**). To monitor dynamic events and challenge the cell physiology, cells were maintained, treated and imaged on an inverted confocal microscope, directly on the rapid loader of the high pressure freezing machine (EMPACT-2, Leica Microsystems) which was placed on a tailored perfusion chamber (**Fig. 1C-2**). Adherent cells attached and behaved normally on this substrate and were able to migrate (**Fig. 1D**, **Video S1** and **Fig. S2** online). As the carved surface of the culture substrate might modify the cells adhesion, we selected cells that were not growing directly on the patterns. For each acquisition, the exact position of the cell of interest was stored relatively to the reference coordinates (**Fig. 1D**, **Fig. S1A-E**). The loader was removed from the confocal set-up and transferred to the EMPACT-2 for HPF. The delay between the last fluorescent acquisition and the complete freezing was around 8 seconds. This time included the removal of the loader from the light microscope, the immersion of the montage into a cryoprotectant consisting of 20% BSA, and the loading process into the HPF apparatus. Each of these steps took 2 to 3 seconds. This relatively fast process allowed ultrastructural imaging of a precise time-point of interest. Freeze substitution and resin embedding of the samples were compatible for sectioning at room temperature and classical EM treatment. When removing the culture substrates from the polymerized resin blocks, the prints of the reference pattern were clearly visible and allowed for precise trimming targeted to the region where the LM acquisitions were performed (**Fig. 1C-3**). Laser micropatterning of the aclar created both positive and negative marks (**Fig. S1G-H**). As a result, the coordinates were visible on the first 10 to 20 thin sections (**Fig. S1I**) thus allowing a straight-forward localization of the cell of interest.

### Correlative Light-Electron Microscopy on Dynamic Phenomena

To exemplify the accessibility of the method, we characterized the oligomerization of GFP-tagged myotubularin induced by hypo-osmotic treatment at the ultrastructural level. Myotubularin (MTM1, [NM\\_000252](#)) is a 3-phosphoinositides phosphatase mutated in a severe form of congenital myopathies called X-linked centronuclear myopathy or myotubular myopathy [28]. It dephosphorylates the phosphatidylinositol 3-phosphate (PtdIns3P) and PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> and is believed to be implicated in membrane remodeling and transport. We noted that GFP-MTM1 localizes in the cytosol and at the plasma membrane under normal conditions, and forms “needle-like” structures upon hypo-osmotic treatment, a condition that increases the level of PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> (**Fig. 2A**, **Fig. S3** online) [29]. This nucleation is enhanced by the GFP tag, as untagged proteins usually retain normal localization, and is dependent on the myotubularin sequence as the localization of close homologues is not similarly affected (**Fig. 2A**, **Fig. S4** online, and Berger *et al.* [30]). The needles, that start to be visible after 30 seconds of treatment, stop elongating after 5 minutes. This process can be reversed several times by switching media (**Fig. 2B**, **Video S2** and **S3** online). As these needles do not colocalize with the actin cytoskeleton (**Fig. 2C**), establishment of a high-throughput CLEM protocol was necessary to retrieve and analyze their ultrastructure. This phenomenon is highly dynamic and the water-enriched hypo-osmotic medium provided additional challenges for the set-up of CLEM.

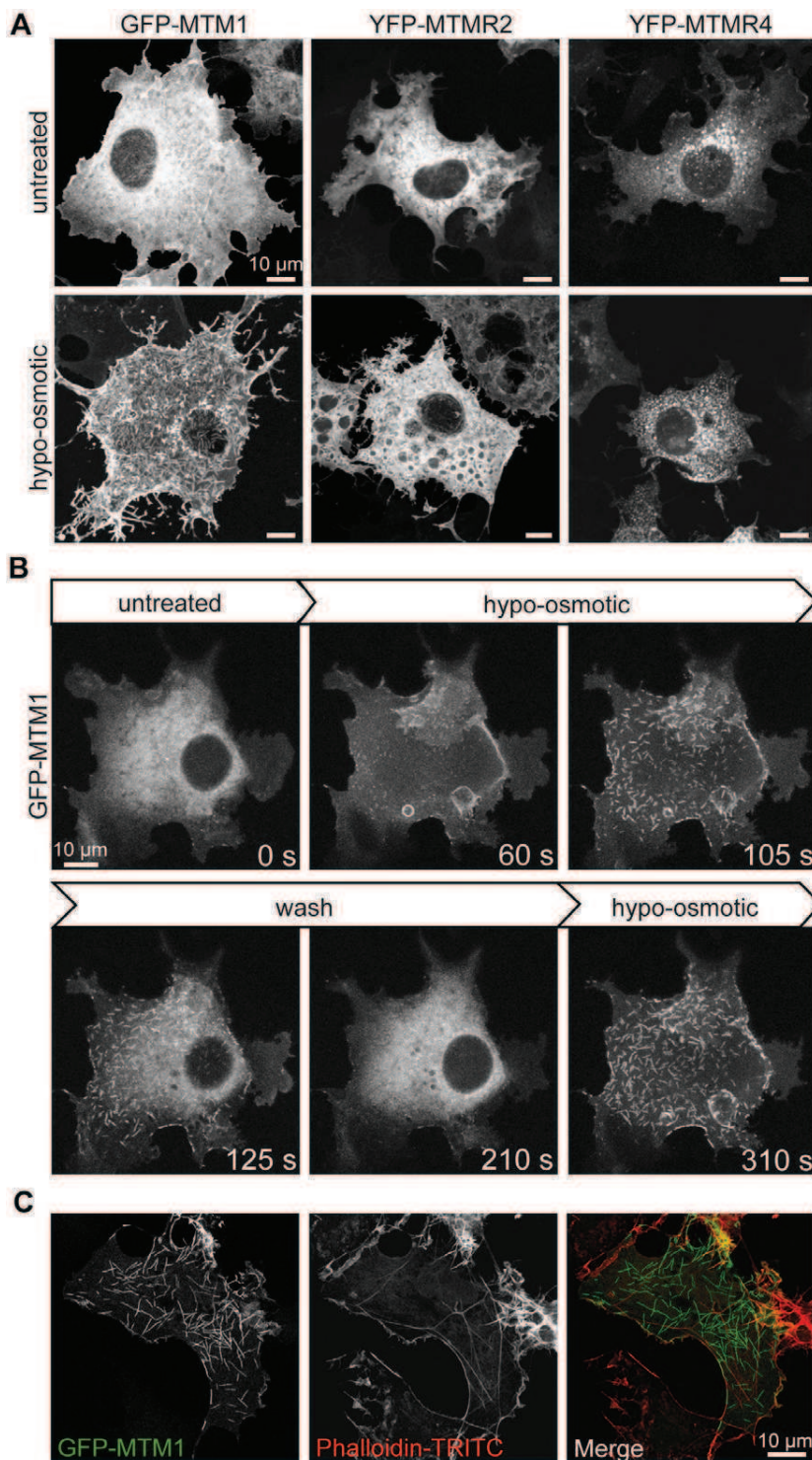


**Figure 1. Integrated methods for CLEM applications.** (A) Outline of the correlative light-electron microscopy (CLEM) methods on living cells. The micro-patterned culture substrates are useful to perform different types of CLEM, combining confocal microscopy with immuno-labeling on serial sections (transmission-EM), with EM tomography and with scanning-EM. (B) The culture substrates are prepared from aclar films [24] (1) on which a reference grid has been micro-patterned with a laser microdissection microscope. The patterns are cut as 1.4 mm discs with a punch (2) and mounted onto gold plated live cell carriers (3). (C) Cells are seeded on the montage (1) and cultured under normal conditions. For LM recording, the montage is installed on the rapid loader of the EMPACT-2 and placed on the adapted stage of an inverted microscope, allowing continuous perfusion or replacement of the medium (2). After high pressure freezing, freeze substitution and embedding, the carrier is removed from the block (3), leaving prints of the reference coordinates at the block face. Trimming is performed around the region containing the cell of interest that is cut serial and collected on EM grids. (D) COS-1 cells expressing GFP-MTM1 migrated for 7.5 h on the pre-patterned aclar grid coated with collagen, were fixed by high pressure freezing and processed as described above. Coordinates from the grid are still on the first sections, facilitating the retrieval of the previously visualized cell. Laminin and poly-L-lysine coating were successfully tested (not shown). From left to right: bright field, fluorescence and electron microscopy. Examples of different time points and the video are shown online (**Fig. S2 and Video S1**, online). doi:10.1371/journal.pone.0009014.g001

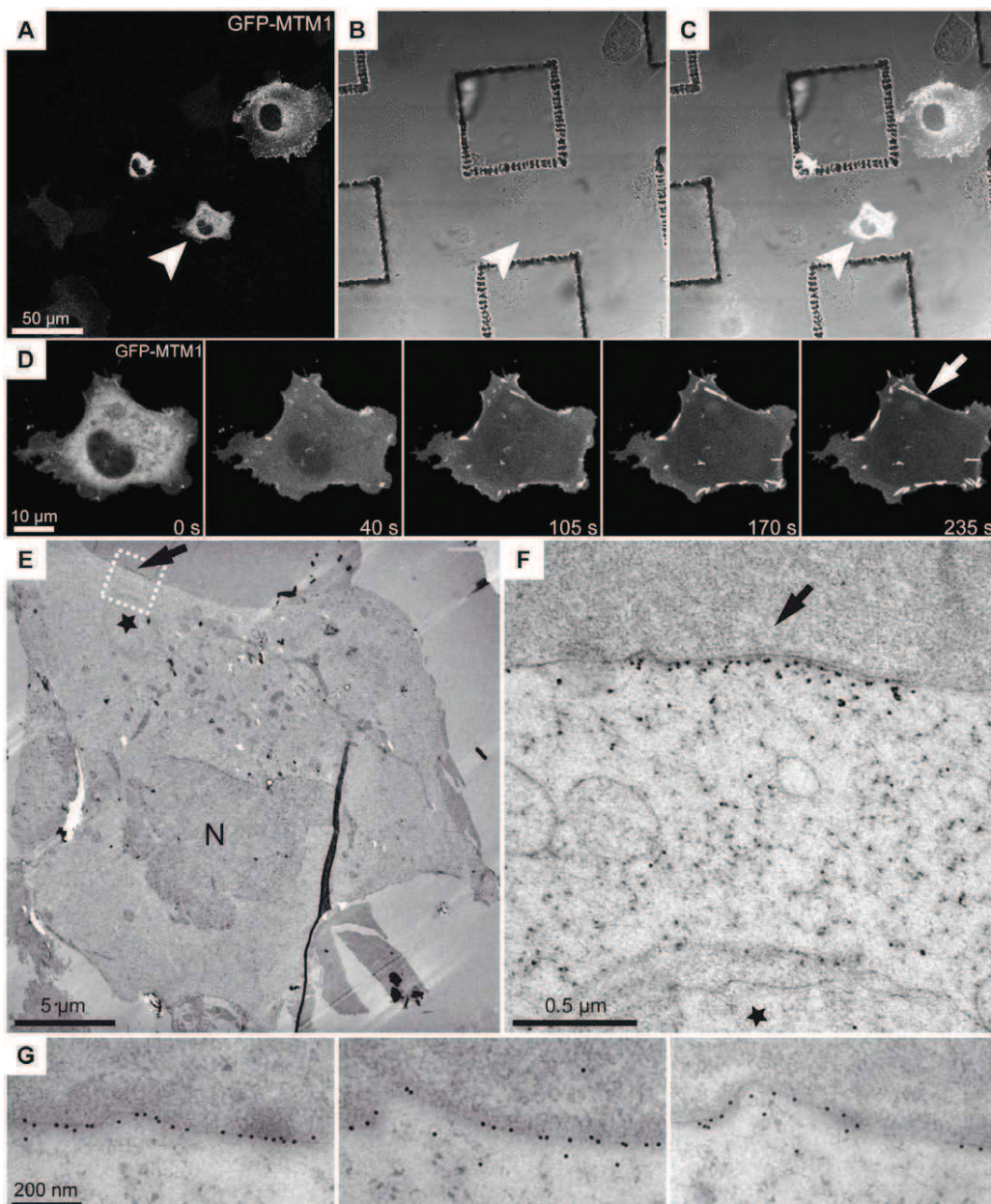
We performed CLEM at different time-points between 1.5 and 10 min; an example at 4 min during needle formation is shown in **Figure 3** (see also **Video S4**). The structures observed by transmission-EM after anti-GFP immunogold labeling were easily fitted with the last fluorescent image acquired just before HPF, based on the reference grid. Needles

appear systematically located at the plasma membrane (**Fig. 3F and 3G; Fig. S5**). They do not correspond to membrane tubules, as hypothesized from the known function of myotubularin, but represent most likely oligomers, that were previously described *in vitro* after mixing recombinant myotubularin with phosphoinositides [31].





**Figure 2. Dynamic needle-like structure formation.** (A) COS-1 cells were transfected with GFP or YFP-tagged wild-type myotubularin (MTM1) or close homologous proteins MTMR2 and MTMR4, either untreated or switched to a hypo-osmotic medium for 10 min, and imaged by confocal microscopy. Treatment does not change the subcellular localization of MTMR4 (right panel) and several other YFP-tagged proteins tested (not shown), while it promotes recruitment of MTMR2 (middle panel) to big vacuoles induced by the treatment, and the formation of needle-like structures by GFP-MTM1 (left panel). (B) The formation of needles is reversible for at least 3 times (two medium switches shown here). (C) The needles do not colocalize with actin (labeled with phalloidin-Texas Red).  
doi:10.1371/journal.pone.0009014.g002



**Figure 3. Correlative light and electron microscopy of the needle-like structures.** COS-1 cells transfected with GFP-tagged MTM1 and plated onto collagen coated pre-patterned aclar grids were treated with hypo-osmotic shock, imaged by time-lapse confocal microscopy then fixed by high pressure freezing. (A–C) The reference coordinates are used to record the position of the selected cell with fluorescence (A), bright field microscopy (B) or both (C). (D) Representative images of the time-lapse video (Supplementary video 4, online), the image at 235 s was the last image before high pressure freezing. (E–F) Examples of a needle structure in immuno-EM labeling using anti-GFP antibody. Arrows in (D–F) point to the same structure. Needles are found associated with the plasma membrane. The cell position, its global shape, the position of the nucleus (N) and of a large vacuole (star) were used to confirm the identity of the cell and to perform the correlation. (G) Micrographs of consecutive sections from the same region as in F showing the distribution of the gold labeling (anti-GFP) at the plasma membrane.  
doi:10.1371/journal.pone.0009014.g003

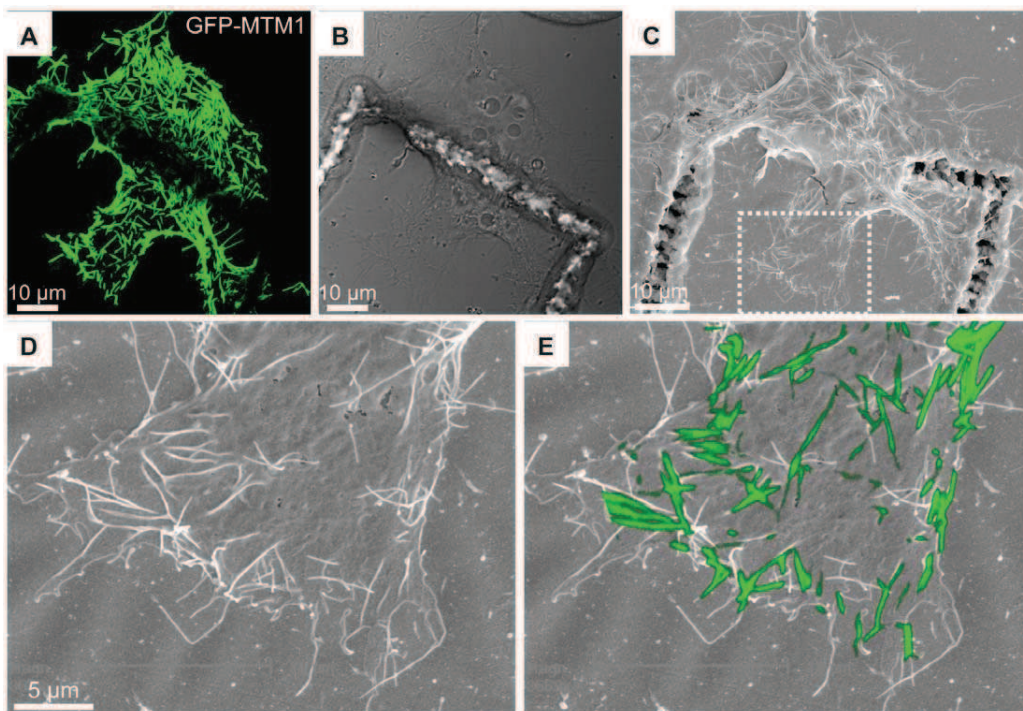
Overall, this protocol allows easy culture and treatment of adherent cells on a substrate compatible with CLEM and is applicable to the study of dynamic phenomena.

#### Correlative Light-Scanning Microscopy

As the reference grid is also visible by scanning-EM, we performed correlative microscopy on GFP-MTM1 positive cells after 10 min of hypo-osmotic treatment. Immediately after

fluorescence imaging, cells were chemically fixed and processed for conventional scanning electron microscopy (SEM). The GFP-positive signal acquired before fixation was fitted with the scanning-EM picture and corresponds mainly to contrasted structures on top of the cell (**Fig. 4**). Some distortions were noted in the SEM images compared to the fluorescence, and are probably due to shrinking of the cell during dehydration. Needles do not extensively fit with filopodia extending onto the substratum





**Figure 4. Correlative light and scanning electron microscopy.** COS-1 cells transfected with GFP-tagged MTM1 were treated with a hypo-osmotic shock for 10 min, imaged with confocal microscopy and processed for scanning-EM. (A) Confocal fluorescence, (B) bright field and (C) scanning-EM images of a GFP-positive cell on top of the reference grid. (D) Enlargement of (C). (E) The superposition of confocal (z-stack of 3.52  $\mu\text{m}$ ) and scanning-EM images shows that the needles do not fit with filopodia but correspond to dorsal ruffles.  
doi:10.1371/journal.pone.0009014.g004

but likely represent cytosolic structures beneath the plasma membrane, that appear contrasted due to the dehydration process. These structures were estimated to range from 1.5 to 5  $\mu\text{m}$  in length.

Combining immuno-EM and scanning-EM allowed us to discriminate between filopodia-like structures extending outside the cell and cytosolic structures beneath the plasma membrane. Correlation with scanning-EM should more generally be applicable to the study of plasma membrane and cell shape remodeling during cell migration, upon desired treatment and time period.

### 3D Reconstruction with Correlative Light-Electron Tomography and Serial Immuno-EM

To further assess the accuracy of our CLEM protocols, we wanted to correlate the 3D information collected from confocal acquisitions, with both serial immuno-EM and EM tomography. For this purpose, we selected a model where an intracellular GFP signal could be associated with the labeling of an identified intracellular structure, such as compartments or organelles. As MTM1 needles were found to be associated to the plasma membrane and not to intracellular structures, this model was not suitable for such approaches. We therefore focused on another protein of the membrane remodeling pathway that is similarly mutated in centronuclear myopathy, BIN1 (also called amphiphysin 2, [NM\\_004305](#)) [32]. BIN1 is also a potential tumor suppressor implicated in endocytosis [33] and induces membrane tubulation upon overexpression in cultured cells (Fig. 5A) [32,34].

Immuno-EM correlated to the fluorescence image identified the BIN1-positive structures as membrane tubules with a variable width ranging from 40 to 90 nm. These membrane tubules appear to radiate from perinuclear regions (Fig. 5A,B). The analysis of 30

serial sections not only allowed the identification of the labeled organelles at the subcellular level but also their position relative to other unlabeled structures such as the plasma membrane, the nucleus, the Golgi complex, endosomal vesicles and mitochondria (Fig. 5C; Video S5). The model built from the serial immuno-EM allowed a clear fitting of the immunogold labeling with the GFP signal previously acquired on living cells (Fig. 5D-F). Furthermore, the model based on the gold labeled structures fits the 3D model reconstructed from the confocal acquisition (Fig. 5G-J; Video S6 and S7). Plasma membrane invaginations were also enriched with GFP-BIN1 (Fig. 5K-M, Fig. S6 online), showing that membrane tubules emanate from the plasma membrane and direct towards the perinuclear region.

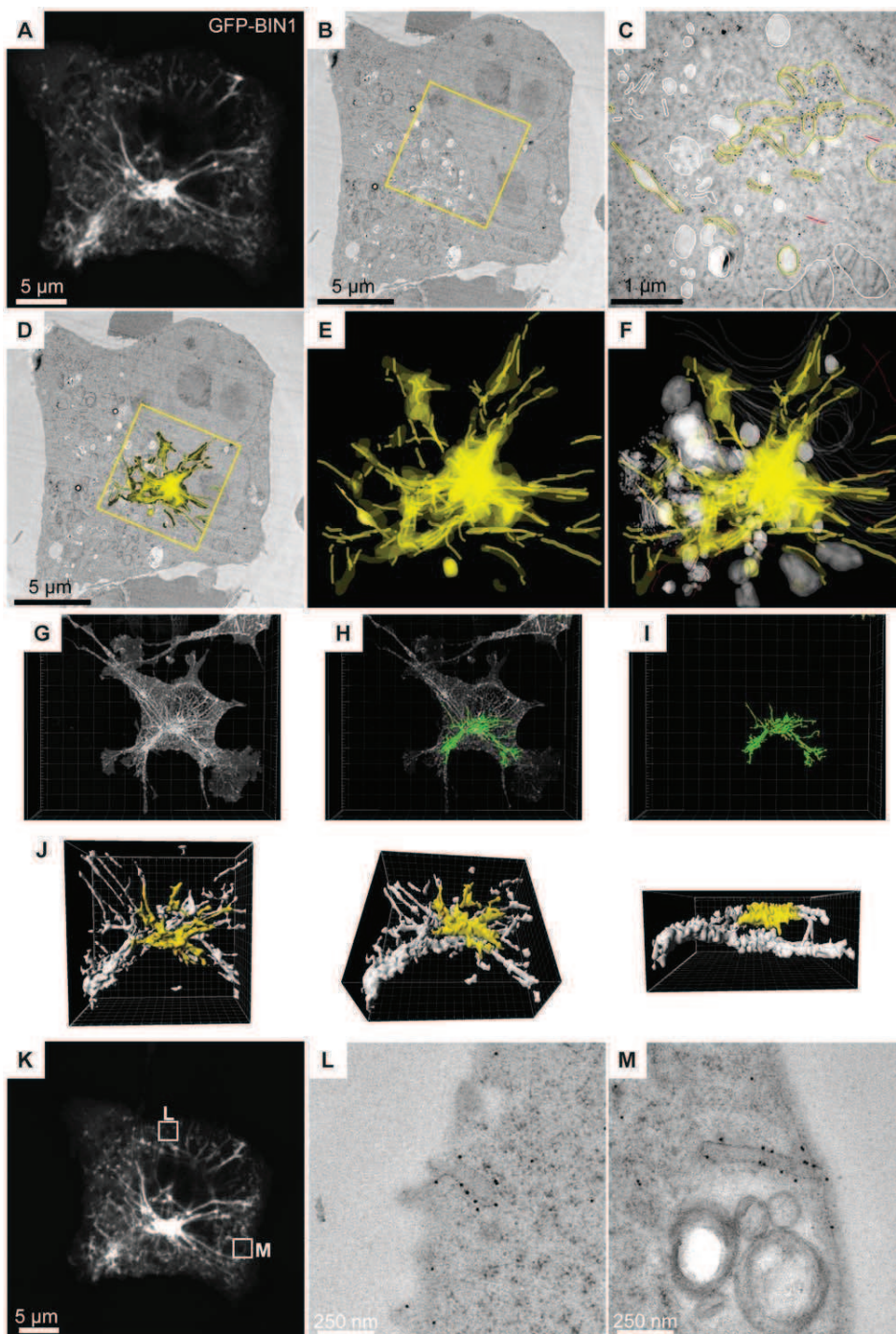
EM tomography and segmentation from 200 nm thick sections were applied to better define the relationship between these membrane tubules and their environment (Fig. 6). Volume reconstruction showed that a given membrane tubule can vary in width. Although confocal microscopy shows a single tubular GFP signal (Fig. 6A), the corresponding area studied by EM tomography reveals a bundle of several tubules (Fig. 6B-E; Video S8).

In conclusion, our correlative approach is versatile and can be used to assess membrane tubules localization and conformation in three dimensions both through serial immuno-EM and tomography.

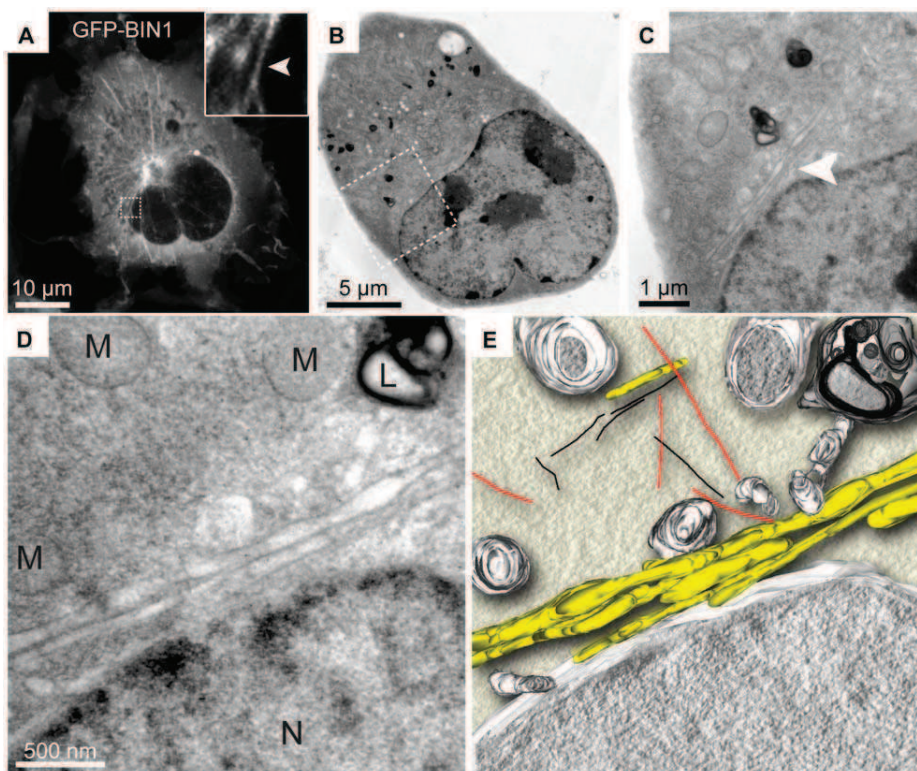
### Discussion

Our interest in CLEM was to link dynamic cell imaging, i.e. fluorescence time-lapse microscopy, with 3D imaging at the ultrastructural level (with scanning-EM, serial immuno-EM and





**Figure 5. CLEM and serial immuno-EM.** COS-1 cells transfected with GFP-tagged BIN1 were imaged by confocal microscopy, fixed by high pressure freezing and processed for 60 nm thick serial sections. Sections were then labeled with anti-GFP antibody and gold particles. (A) Representative image (z projection of 3 confocal sections of 0.28  $\mu\text{m}$  in depth) of the fluorescent BIN1 tubules radiating from/to the perinuclear region. (B) One over 30 serial thin sections showing the transmission-EM image of the same cell as in (A). (C) At higher magnification, the immunostaining is visible over various perinuclear structures highlighted in yellow. Other organelles such as mitochondria, Golgi complex, endosomal vesicles, that were unstained, are modeled in white. (D) When rendering the whole stack of serial sections, the immunogold labeling can be projected onto the representative transmission-EM picture, showing a good correlation with the dense perinuclear GFP signal recorded on living cells. (E and F) The model displays the distribution of the anti GFP immunogold staining in the volume of the perinuclear region, (G–J) The full z stack recording was processed with Imaris to reconstruct a 3D model (green) of the GFP fluorescence. The region analyzed by EM has been color-coded in yellow, showing a good correlation with the gold labeling displayed in D–F. (K–M) Correlation analysis of other z planes showed localization of GFP-BIN1 at plasma membrane invaginations. The confocal image shown in K corresponds to the Z projection of the five stacks shown in the Figure S6 (online). The EM micrograph of the corresponding thin sections as well as additional BIN1-positive membrane tubules and structures are shown in Figure S6 (online). doi:10.1371/journal.pone.0009014.g005



**Figure 6. CLEM and tomography reconstruction.** COS-1 cells transfected with GFP-BIN1 were imaged by confocal microscopy, fixed by high pressure freezing and processed to 200 nm thick sections. A tomogram was reconstructed from 139 tilted images (from  $-69^{\circ}$  to  $69^{\circ}$ ) and manually segmented to highlight the fluorescent tubules observed previously by confocal microscopy. (A) Representative confocal z-stack projection of a transfected cell, showing GFP-BIN1 tubules. Insert: magnified view of a tubule adjacent to the nucleus. (B) Corresponding transmission-EM picture. (C and D) Higher magnifications of the area selected in (B) showing a bundle of tubules (arrowhead) passing next to the cell nucleus, in the same region highlighted in (A). (E) Top view of the 3D model depicting membrane tubules in yellow, mitochondria, nuclear envelope, endosomal vesicles and lysosomes in grey, microtubules in red and actin filament in black. A 3D video of the tomogram is available (Video S8, online). L: lysosome; M: mitochondria; N: nucleus.

doi:10.1371/journal.pone.0009014.g006

tomography). The available protocols were not suitable to our needs as we wanted a simple technique versatile enough to be applied to various models. We developed a method based on a new culture substrate for adherent cells, in which reference coordinates are included by laser micro-patterning on a clear disc prior to cell seeding. Combined with high pressure freezing to allow optimal ultrastructure and epitope preservation, this method was suitable for CLEM of dynamic phenomena in the range of a few seconds to several hours, enabling imaging at precise time points. In this study, we have chosen to record cells in their culture medium or in an osmotically challenging medium. For the dynamic study of the GFP-MTM1 needles formation, we obtained efficient freezing without cryoprotection (not shown). However, adding a cryoprotective step, when transferring the recorded cells to the high pressure freezing apparatus, gave a better freezing quality by diminishing the occurrence of ice formation and damages. As a consequence, the time spent between the last LM image and cryofixation of cells was longer (8 seconds) than what can be achieved without this step (5 seconds). A new feature compared to previous protocols [14] is the embedding of reference coordinates which are present throughout all sample preparation steps for EM. This coordinate system does not require any handling of the culture substrate prior to the imaging step and is therefore not damaging to the cell culture. Furthermore the cell monolayer is grown on the landmarks, which makes the later

visible on the first thin EM sections and allows an easy re-localization of subcellular domains previously acquired from living cells. Compared to existing protocols based on cryosections [13,35], working on embedded cell monolayers and sectioning them at room temperature make this method applicable on a routine basis.

Light microscopy gives access to the functionality of a given protein in physiological conditions, whereas EM enables precise localization of the same protein with respect to the surrounding anatomical organization of the cell, at a much better resolution. CLEM performed on living cultured cells is of particular interest when a small proportion of a cell population is to be studied, for example transfected cells, or when a heterogeneous cell population is employed, or when different subcellular events are to be characterized within a unique cell.

We applied our method to the study of two proteins implicated in membrane remodeling and mutated in neuromuscular disorders. We were able to obtain information on protein localization in the volume of cells by correlating the oligomerization of GFP-tagged MTM1 with immunogold labeling observed by transmission-EM or with cell surface analysis done by scanning-EM. Dynamic correlative light and scanning EM was also recently used to analyze cytosolic actin structures [6]. The combination of imaging approaches showed that GFP-MTM1 oligomerizes into needle-like structures, a phenomenon most probably enhanced by



GFP-tagging and altered phosphoinositide levels induced by osmotic stress. These needles polymerize at the plasma membrane, suggesting the possible involvement of myotubularin in membrane subdomain scaffolding or recognition. Membrane tubules induced by the muscle-specific isoform of BIN1 converge towards the perinuclear region. 3D reconstruction from serial immuno-EM or from EM tomography showed that they do not originate from internal membranes but invaginate from the plasma membrane, suggesting that BIN1 promotes strong curvature from plasma membrane subdomains as anticipated by previous studies [34].

In conclusion, this accessible method provides researchers with the possibility to characterize dynamic events at the ultra-structural level with EM, immuno-EM, tomography and scanning EM. Improvement of this method towards a better resolution in the z direction at the light microscopy and a quicker fixation will require the coupling with recent super-resolutive light microscopy techniques and the development of novel high pressure freezing devices, respectively.

## Materials and Methods

### DNA Constructs and Cell Culture

For eukaryotic cell transfection, human MTM1, MTMR2 (NM\_016156) and MTMR4 (NM\_004687) cDNA (Laporte *et al.* [28] and Kazusa human cDNA project) and BIN1 muscle-specific isoform 8 cDNA (a gift from P. De Camilli) were cloned into pEGFP-C1 (Clontech) and overexpressed as an N-terminal EGFP-tagged protein; MTM1 was also cloned into pSG5 hER-B10 and pCMVTag 3B Myc vectors and overexpressed as an N-terminal B10 and Myc-tagged proteins respectively. COS-1 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5% FCS and 40 mg/l gentamicin in a 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. Cells were grown on 22-mm<sup>2</sup> cover slips or on aclar discs coated with collagen, and were transfected at 80% confluency with 1.5 µg of DNA constructs using the Fugene-6 reagent, following the manufacturer's instructions (Roche). After 24 h of transfection, cells were hypo-osmotically shocked for 10 min in 25% medium (diluted with water). Hyper-osmotic medium was the normal culture medium supplemented with 0.9M Sorbitol. Cells grown on 22-mm<sup>2</sup> cover slips for conventional fluorescence microscopy were fixed with 4% paraformaldehyde for 12 h at 4°C. For immunolabelling, cells were subsequently permeabilized in PBS with 0.2% Triton X-100 and washed with PBS. Nonspecific sites were blocked in PBS with 10% FCS and 0.1% Triton X-100. The cellular localization of B10-MTM1 and Myc-MTM1 was assessed by incubation for 1 h with monoclonal B10 and Myc antibodies (IGBMC antibody platform), diluted at 1:800 and 1:1000 respectively. After washing with PBS with 0.1% Triton X-100, we detected immunostaining by incubation for 1 h with an anti-mouse antibody-Alexa Fluor 594 (Invitrogen).

### Correlative Light-Electron Microscopy

The culture substrates were assembled before seeding of the cells. They consisted of a laser micro-patterned aclar film mounted on HPF live cell carriers (Leica Microsystems ref: 16707897). Laser micro-patterning was performed with the pulsed laser of the Leica Laser Microdissection microscope (LMD 6000), using the controlling software version 6.5, and consisted of an asymmetric mesh of 70 µm squares (see Fig. S1 online). The 10X/0,25 P (PL FLUOTARD 556000 Leica Microsystems, Germany) lens objective was used, with specific laser parameters (power: 101 to 104; speed: 6; specimen balance: 0; offset: 60). From 150 to 200 patterns were carved on a rectangular (75\*25 mm) 2 mil (= 50.8 µm) aclar film (E.M.S.). A punching device consisting of

a tapped stainless steel tube (Goodfellow external diameter 1.65 mm; internal diameter 1.39 mm; wall thickness 0.13 mm) mounted on a silicon cylindrical handle was used to cut discs (1.4 mm in diameter) from the carved film. The discs were glued with loctite 350 on the HPF carriers (Fig. S1J online). The UV light necessary for curing of the glue also sterilized the montages.

Fluorescence was examined with the Leica TCS SP2-AOBS confocal microscope (Argon laser, 488 nm). The stage for the inverted confocal microscope supplied with the HPF machine (EMPACT-2 Leica Microsystems) was not adapted to the use of high magnification lenses (63X, 100X). We therefore built a new stage with a larger central hole (external diameter 43 mm; internal diameter 36 mm). A round coverslip (diameter 42 mm, thickness 0.17 mm, VWR) was installed on the stage and sealed with silicon paste to avoid medium leaking. A water immersion 63X lens objective (63x/1.20W Corr, apo) was used to account for the large working distance introduced by the montage. We used a perfusion device for the renewal or exchange of the culture media, consisting of 2 Teflon tubes (Tygon, Fisher Bioblock SA) and of a peristaltic pump (Ismatec). The liquid flow rate was set to 2 to 3 ml/min and the medium was heated to 37°C.

Time-lapse experiments were performed on an inverted epifluorescence microscope (Leica DM IRE2) equipped with an incubation chamber allowing the control of temperature (37°C) and CO<sub>2</sub> (5%) (Pecon GmbH, Germany). Up to 12 carriers were placed upside up and recorded sequentially for 7 to 11 hours.

For high pressure freezing and freeze substitution, the visualization of the cultured cell was performed with the live cell carriers mounted on the rapid loader of the EMPACT-2. At chosen time points, the montage was withdrawn from the microscope stage, and transferred to the EMPACT-2 equipped with the RTS extension. For cryoprotection before freezing, the cells were dipped into a solution of 20% BSA in the culture medium. Without cryoprotection, delays of about 5 s between the last image acquisition and the freezing were achieved. With the cryoprotection step, this delay was about 8 s. The images shown here were taken from cryoprotected cells, as the freezing quality was improved. After freezing, the samples were collected in liquid nitrogen until further processing was required. For immunogold analysis, dehydration was performed at -90°C for at least 48 h in pure acetone containing 0.1% uranyl acetate using the EM-AFS freeze substitution unit (Leica Microsystems). Temperature was then raised to -50°C (5°C/h) and after 24 h in the mix, the cells were extensively rinsed first with acetone and then with pure ethanol. Infiltration was performed at -50°C with graded concentrations of lowicryl HM20 over 24 h. Polymerisation was performed with UV light at -50°C for 48 h and at room temperature for 48 h. For morphological experiments, dehydration at -90°C lasted at least 48 h in acetone containing 2% osmium tetroxide, 0.25% uranyl acetate, 0.25% glutaraldehyde and 1% H<sub>2</sub>O. Temperature was raised to -30°C (5°C/h) and cells were left in the mix for 24 h, rinsed with acetone and infiltrated in graded epon/araldite mix. When the resin concentration reached 70%, the temperature was raised to 20°C and the samples were placed in 3 consecutive baths of pure resin (lasting 1 h each) before polymerization at 60°C for 48 h. For polymerization, the carriers were installed in flow-through embedding molds (Leica Microsystems) filled with the resin. After curing, the blocks were removed from the molds and installed in the block holder of the ultramicrotome. The carrier was then removed with a razor blade, by applying a force on the edge, at the interface between the metal and the resin. By doing so, the carrier usually came with the aclar disc, leaving a block face on which the imprints of the micro-patterned coordinates were easily recogniz-

able. The selection of the recorded ROI was performed by trimming small square regions (around 200  $\mu\text{m}$  in width) with a beveled edge diamond knife (cryotrim, Diatome). Thin (50 to 60 nm) and thick sections (200 nm) were collected on formvar-carbon coated copper slot grids for morphological or tomography experiments, and on formvar-carbon coated nickel slot grids for immunogold labeling.

Immunogold labeling was performed on the EM-IGL automate (Leica Microsystems). Rabbit polyclonal anti-GFP (AbCam 6556) was revealed with a 10 nm gold coupled protein A (Utrecht, Netherlands). Grids were contrasted with uranyl acetate and lead citrate before observation with a Philips CM12 transmission electron microscope operated at 80 kV. Images were acquired with an Orius 1000 CCD camera (Gatan).

For electron tomography, semithin sections were post-stained with uranyl acetate (15 min) and lead citrate (7 min). Ten nm colloidal gold particles were applied on one side of the grid to be used as fiducial markers. Automated data acquisition of the single tilt series through an angular range of  $-69^\circ$  to  $+69^\circ$  with  $1^\circ$  increments was performed using a field emission gun electron microscope operating at 200 kV (Tecnai F20; FEI Company, Eindhoven, The Netherlands). Images were acquired on a Gatan 2K CCD camera controlled by the Xplore3D software (FEI). Tomograms and 3D models were computed using etomo and Imod [36,37].

### Scanning Electron Microscopy

Cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1M cacodylate buffer for 1 h at room temperature followed by a 1 hour post-fixation in 1% osmium tetroxide at  $4^\circ\text{C}$ . Dehydration was performed in graded ethanol and hexamethyldisilazane. After palladium gold coating in a Baltec SCD005 sputter coater cells were observed with a Philips XL20 SEM operating at 12 kV.

### Images Treatment and Analysis

Confocal pictures were processed with Tcstk software (Jean-Luc Vonesch, IGBMC) and edited using Dvrtk software (Jean-Luc Vonesch, IGBMC) and Photoshop 7.0 (Adobe) or Fotographix (L. Madhavan). Acquired images were edited and fitted (fluorescence vs EM) using ImageJ and Photoshop (Adobe). The modelization of the confocal acquisition was performed with Imaris (Bitplane).

### Supporting Information

**Figure S1** Reference grid imprinted onto the cell culture substrate. (A) Scheme of the reference grid for the laser microdissection microscope. The patterned aclar substrate was imaged under an epifluorescence microscope using excitation filters BP 545/30 (B), BP 480/40 (C) and BP 360/40 (D). The grid fluorescence is much fainter than the GFP signal of tagged proteins. (E) The reference grid is visible in brightfield and by scanning electron microscopy (F). (G-I) Due to the melting of the aclar, positive and negative patterns are imprinted as shown by scanning EM (G). As a result, after polymerization and removal of the culture substrate (H), the pattern appears as negative and positive marks leaving visible holes (I) on the first EM sections. (J) Pictures of the pre-patterned substrate mounted onto gold plated live cell carriers.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0009014.s001 (6.83 MB TIF)

**Figure S2** Correlative light-electron microscopy on migrating cells. Migration of COS-1 cells expressing GFP-MTM1 on the pre-patterned aclar grid coated with collagen. (A) Brightfield timelapse acquisition. (B) Corresponding fluorescence images; the arrow indicates the cell of interest. (C) A representative EM image

of the cell pointed out in (A) and (B). (D) A high magnification image on a different section from the cell in (C).

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0009014.s002 (6.38 MB TIF)

**Figure S3** Details of the needle-like structures formed by GFP-MTM1 upon hypo-osmotic treatment. COS-1 cells were transfected with GFP-tagged MTM1 and treated for 10 min with hyper-osmotic or hypo-osmotic conditions. Protein localization was similar under normal or hyper-osmotic media. (A) xy confocal images showing the needle structures within the cell. (B) z projection image of the cell apex showing the needle organization. (C) xz projection from the image shown in (B) suggesting the presence of the needle structures at the plasma membrane and not inside the cytosol.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0009014.s003 (1.44 MB TIF)

**Figure S4** The formation of needle-like structures by MTM1 is enhanced by a GFP-tag. COS-1 cells were transfected with N-terminal B10, Myc or GFP-tagged MTM1, either untreated or switched to a hypo-osmotic medium for 10 min, and imaged by confocal microscopy. Upper left image depicts the localization of MTM1 at cell protrusions in highly over-expressing cells, while low over-expressing cells display a more diffuse cytosolic pattern. Most of B10- and Myc-tagged MTM1 transfected cells display a cytosolic pattern although some contained needle-like structures.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0009014.s004 (2.56 MB TIF)

**Figure S5** Additional GFP-positive needles observed on TEM sections after immuno-EM experiments, related to Figure 3. The gold particles, revealing the accumulation of GFP-MTM1 proteins, are concentrated at sub-domains of the plasma membrane. The inserts show magnified views of the boxed areas.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0009014.s005 (5.07 MB TIF)

**Figure S6** BIN1-positive structures observed after CLEM and immuno-EM. (A) Consecutive z stacks (0.28  $\mu\text{m}$  thick) of the apex of the cell shown in figure 5. The white arrowheads show the region of the cell corresponding to the EM pictures shown in B-C-D and in figure 5L. The empty arrowheads point to the region where the pictures shown in E-F-G and in figure 5M were taken. (H) gold particles were associated to fine tubules (FT) and to the membrane of enlarged tubules (ET). Internal vesicles of a multivesicular body (MVB) were also stained. (I) Gold labeling was also found of vesicles of various sizes and (J) on more complex and reticulated membrane structures. These structures seem to be induced by the over-expression of the BIN1 construct as that do not appear in non transfected cells. Their identity, i.e. endosomal or lysosomal, post-golgi, is not known.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0009014.s006 (6.55 MB TIF)

**Video S1** Time-lapse video of GFP-MTM1 positive cells. Cells are migrating on the CLEM substrate coated with collagen, corresponding to Figure 1D. Cells are able to send protrusions and to migrate. Scale bars 20  $\mu\text{m}$ .

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0009014.s007 (0.61 MB MOV)

**Video S2** Time-lapse fluorescence microscopy of needle formation. A ten minutes acquisition of COS-1 cells transfected with GFP-tagged MTM1. The movie starts when the normal culture medium is replaced by the hypo-osmotic medium.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0009014.s008 (0.31 MB MOV)

**Video S3** Reversibility of needle formation. Time-lapse fluorescence microscopy of needle formation and reversibility in COS-1 cells transfected with GFP-tagged MTM1, corresponding to

Figure 3. Normal and hypo-osmotic media were switched as indicated. Scale bars 10  $\mu\text{m}$ .

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0009014.s009 (5.82 MB MOV)

**Video S4** Time-lapse fluorescence microscopy before high pressure freezing. Needle formation in COS-1 cells transfected with GFP-tagged MTM1 before high pressure freezing and processing for correlative cryo-EM, corresponding to Figure 3. Hypo-osmotic medium perfusion started at time 0. Scale bars 10  $\mu\text{m}$ .

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0009014.s010 (0.37 MB MOV)

**Video S5** Modelization of the gold labeled structures. Thirty serial sections have been analyzed to segment the structures that were labeled with gold in yellow. The movie shows the aligned serial sections and the modeled portion of the cell shown in figure 5.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0009014.s011 (11.55 MB MOV)

**Video S6** Model of the GFP-BIN1 fluorescent signal. The fluorescent signal has been thresholded to modelize the GFP-BIN1 tubules induced by overexpression in COS-1 cells. Rotation of the model, superimposed with the fluorescent signal, shows the organization of the tubular network inside the cell. Snapshots of this movie are shown in figure 5 for correlation with immuno-EM. Found at: doi:10.1371/journal.pone.0009014.s012 (12.15 MB MOV)

**Video S7** Model of the GFP-BIN1 localization. The same sequence as in the previous video, but without the fluorescent signal.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0009014.s013 (11.57 MB MOV)

**Video S8** Subcellular organization on the GFP-BIN1 tubules. 3D representation of the model constructed from the tomogram of the perinuclear region shown in Figure 6.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0009014.s014 (8.49 MB MOV)

## Acknowledgments

We thank Corinne Crucifix, Jean-Marie Garnier, Nadia Messaddeq, Daniele Spehner and Serge Taubert for technical help, Belinda Cowling for proofreading the manuscript and Michel Labouesse, Jean-Louis Mandel, Dino Moras, Patrick Schultz, Anne Toussaint and Jean-Luc Vonesch for discussions and support. We also thank Pietro De Camilli for BIN1 cDNA and the Kazusa Human cDNA project for MTMR2 and MTMR4 cDNAs.

## Author Contributions

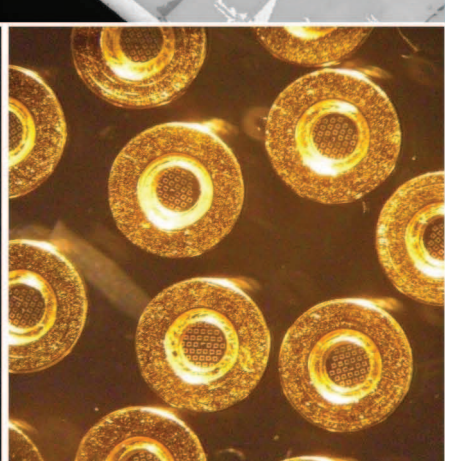
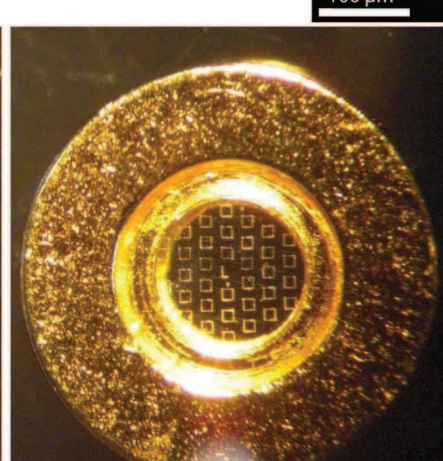
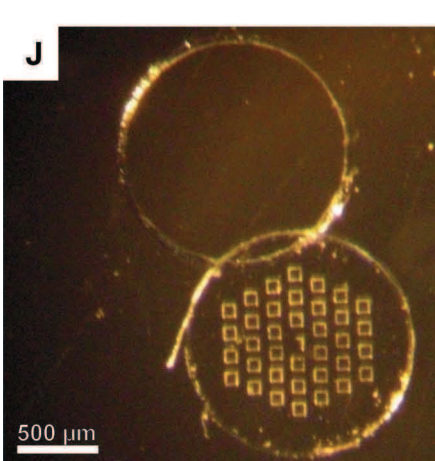
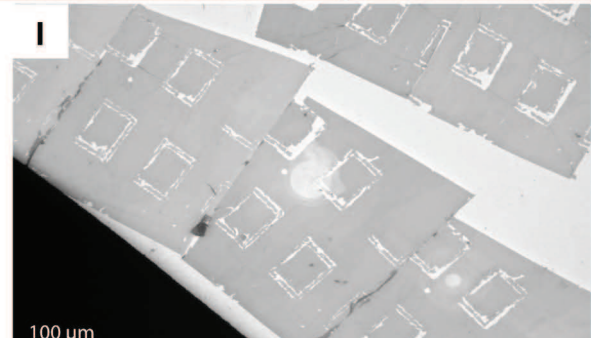
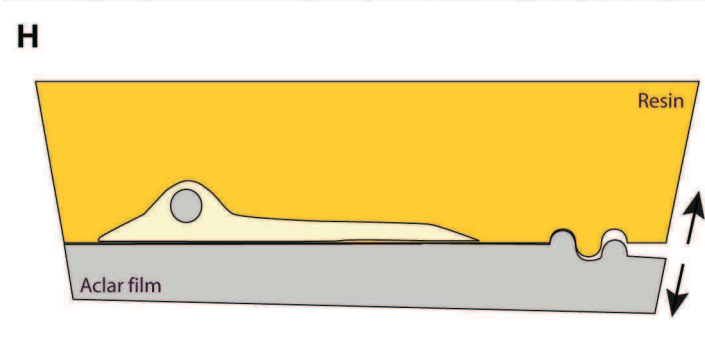
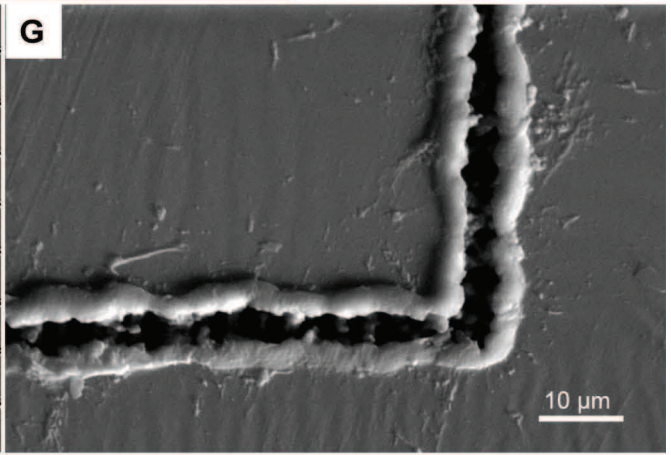
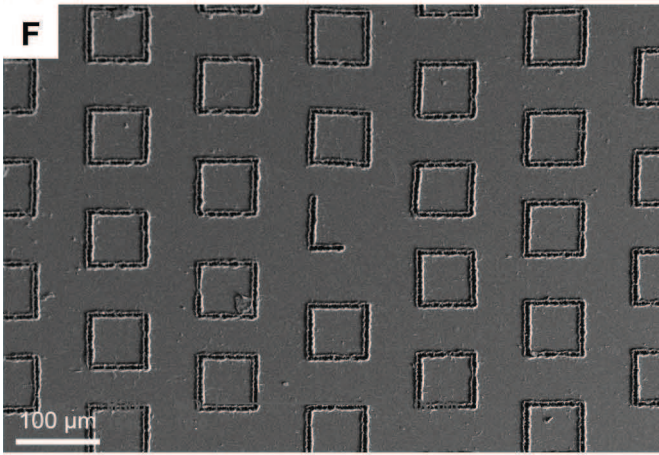
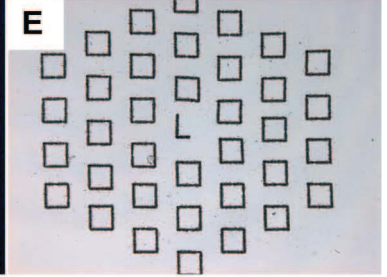
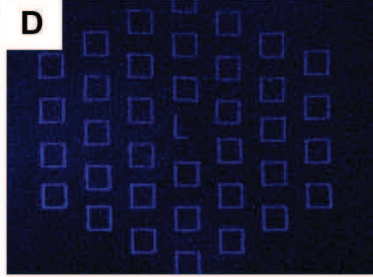
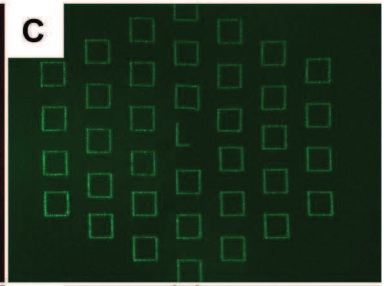
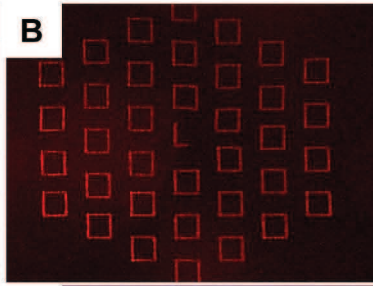
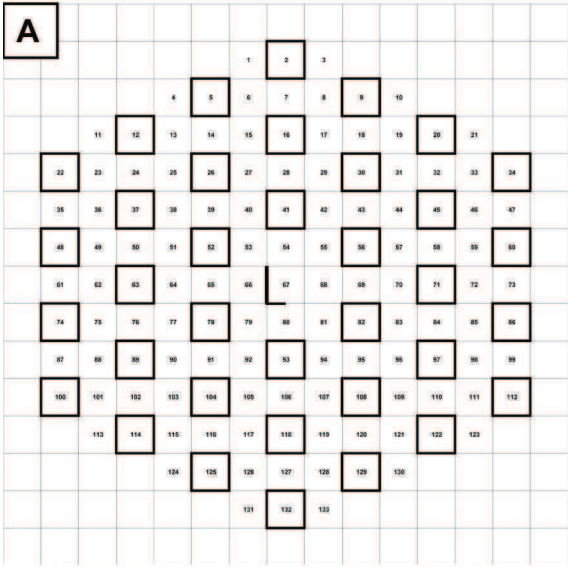
Conceived and designed the experiments: CS YS JL. Performed the experiments: CS VT MK PK YS JL. Analyzed the data: CS VT YS JL. Contributed reagents/materials/analysis tools: DH. Wrote the paper: YS JL.

## References

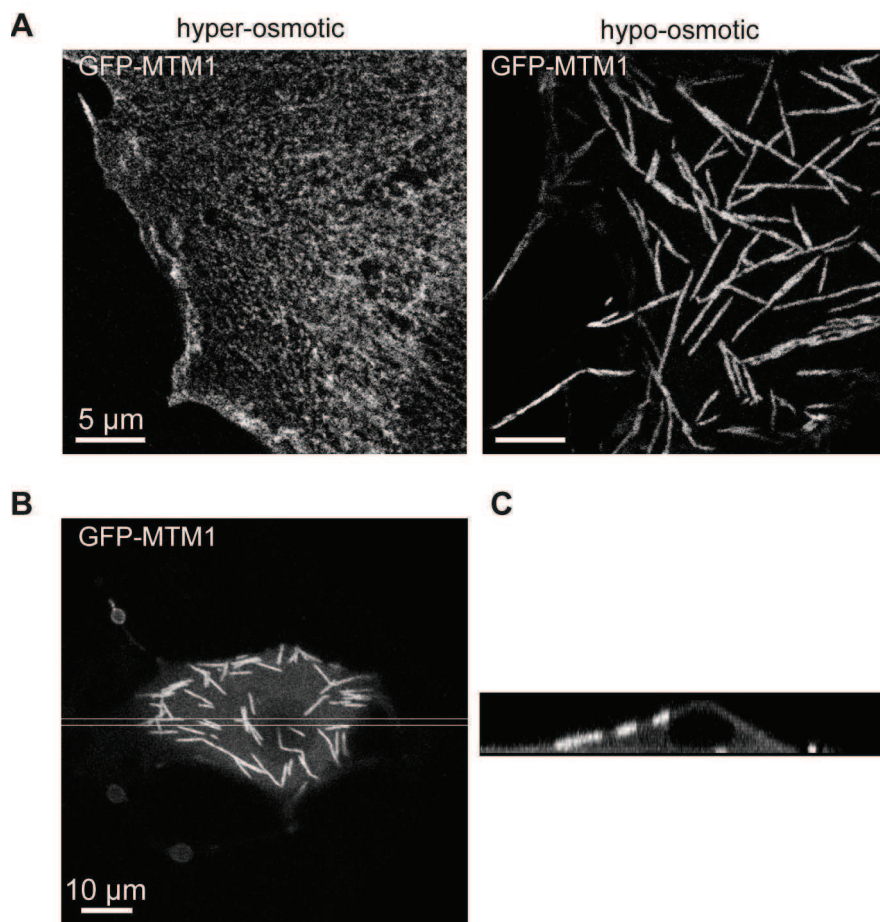
- Mironov AA, Beznoussenko GV (2009) Correlative microscopy: a potent tool for the study of rare or unique cellular and tissue events. *J Microsc* 235: 308–321.
- Vicidomini G, Gagliani MC, Canfora M, Cortese K, Frosi F, et al. (2008) High data output and automated 3D correlative light-electron microscopy method. *Traffic* 9: 1828–1838.
- Schwarz H, Humbel BM (2007) Correlative light and electron microscopy using immunolabeled resin sections. *Methods Mol Biol* 369: 229–256.
- Agronskaia AV, Valentijn JA, van Driel LF, Schneijdenberg CT, Humbel BM, et al. (2008) Integrated fluorescence and transmission electron microscopy. *J Struct Biol*.
- Auinger S, Small JV (2008) Correlated light and electron microscopy of the cytoskeleton. *Methods Cell Biol* 88: 257–272.
- Mongiu AK, Weitzke EL, Chaga OY, Borisy GG (2007) Kinetic-structural analysis of neuronal growth cone veil motility. *J Cell Sci* 120: 1113–1125.
- Darcy KJ, Staras K, Collinson LM, Goda Y (2006) Constitutive sharing of recycling synaptic vesicles between presynaptic boutons. *Nat Neurosci* 9: 315–321.
- Darcy KJ, Staras K, Collinson LM, Goda Y (2006) An ultrastructural readout of fluorescence recovery after photobleaching using correlative light and electron microscopy. *Nat Protoc* 1: 988–994.
- Gaietta GM, Giepmans BN, Deerinck TJ, Smith WB, Ngan L, et al. (2006) Golgi twins in late mitosis revealed by genetically encoded tags for live cell imaging and correlated electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 17777–17782.
- Lucic V, Kossel AH, Yang T, Bonhoeffer T, Baumeister W, et al. (2007) Multiscale imaging of neurons grown in culture: from light microscopy to cryo-electron tomography. *J Struct Biol* 160: 146–156.
- Grabenbauer M, Geerts WJ, Fernandez-Rodriguez J, Hoenger A, Koster AJ, et al. (2005) Correlative microscopy and electron tomography of GFP through photooxidation. *Nat Methods* 2: 857–862.
- Sartori A, Gatz R, Beck F, Rigort A, Baumeister W, et al. (2007) Correlative microscopy: bridging the gap between fluorescence light microscopy and cryo-electron tomography. *J Struct Biol* 160: 135–145.
- van Rijnsvoever C, Oorschot V, Klumperman J (2008) Correlative light-electron microscopy (CLEM) combining live-cell imaging and immunolabeling of ultrathin cryosections. *Nat Methods* 5: 973–980.
- Verkade P (2008) Moving EM: the Rapid Transfer System as a new tool for correlative light and electron microscopy and high throughput for high-pressure freezing. *J Microsc* 230: 317–328.
- Meisslitzer-Ruppitsch C, Rohrl C, Neumuller J, Pavelka M, Ellinger A (2009) Photooxidation technology for correlated light and electron microscopy. *J Microsc* 235: 322–335.
- Griffiths G, McDowall A, Back R, Dubochet J (1984) On the preparation of cryosections for immunocytochemistry. *J Ultrastruct Res* 89: 65–78.
- Tokuyasu KT (1973) A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues. *J Cell Biol* 57: 551–565.
- Murk JL, Posthuma G, Koster AJ, Geuze HJ, Verkleij AJ, et al. (2003) Influence of aldehyde fixation on the morphology of endosomes and lysosomes: quantitative analysis and electron tomography. *J Microsc* 212: 81–90.
- Studer D, Humbel BM, Chiquet M (2008) Electron microscopy of high pressure frozen samples: bridging the gap between cellular ultrastructure and atomic resolution. *Histochem Cell Biol* 130: 877–889.
- Monaghan P, Perusinghe N, Muller M (1998) High-pressure freezing for immunocytochemistry. *J Microsc* 192: 248–258.
- Sawaguchi A, Yao X, Forte JG, McDonald KL (2003) Direct attachment of cell suspensions to high-pressure freezing specimen planchettes. *J Microsc* 212: 13–20.
- Hohenberg H, Mannweiler K, Muller M (1994) High-pressure freezing of cell suspensions in cellulose capillary tubes. *J Microsc* 175: 34–43.
- Hess MW, Muller M, Debbage PL, Vetterlein M, Pavelka M (2000) Cryopreparation provides new insight into the effects of brefeldin A on the structure of the HepG2 Golgi apparatus. *J Struct Biol* 130: 63–72.
- Jimenez N, Humbel BM, van Donselaar E, Verkleij AJ, Burger KN (2006) Aclar discs: a versatile substrate for routine high-pressure freezing of mammalian cell monolayers. *J Microsc* 221: 216–223.
- Polishchuk RS, Polishchuk EV, Marra P, Alberti S, Buccione R, et al. (2000) Correlative light-electron microscopy reveals the tubular-saccular ultrastructure of carriers operating between Golgi apparatus and plasma membrane. *J Cell Biol* 148: 45–58.
- Mironov AA, Polishchuk RS, Luini A (2000) Visualizing membrane traffic in vivo by combined video fluorescence and 3D electron microscopy. *Trends Cell Biol* 10: 349–353.
- Colombelli J, Tangemo C, Haselman U, Antony C, Stelzer EH, et al. (2008) A correlative light and electron microscopy method based on laser micropatterning and etching. *Methods Mol Biol* 457: 203–213.
- Laporte J, Hu LJ, Kretz C, Mandel JL, Kioschis P, et al. (1996) A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast. *Nat Genet* 13: 175–182.
- Dove SK, Cooke FT, Douglas MR, Sayers LG, Parker PJ, et al. (1997) Osmotic stress activates phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate synthesis. *Nature* 390: 187–192.
- Berger P, Berger I, Schaffitzel C, Tersar K, Volkmer B, et al. (2006) Multi-level regulation of myotubularin-related protein-2 phosphatase activity by myotubularin-related protein-13/set-binding factor-2. *Hum Mol Genet* 15: 569–579.

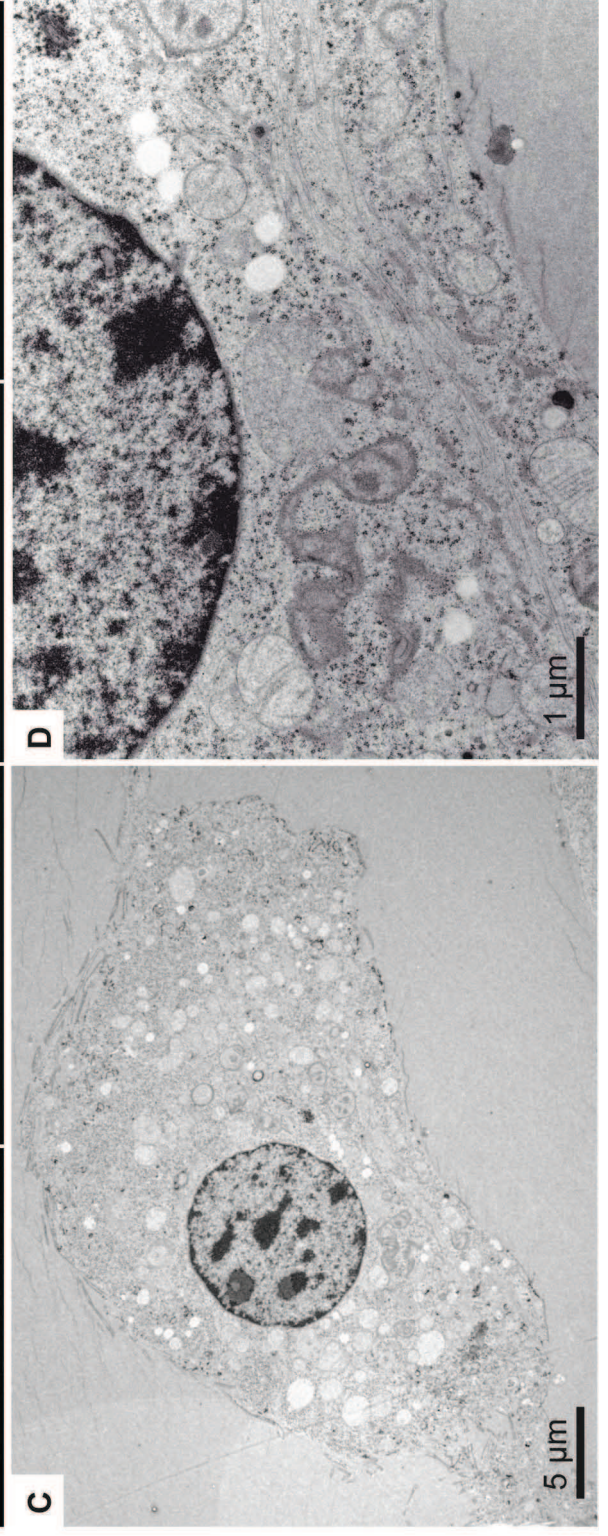
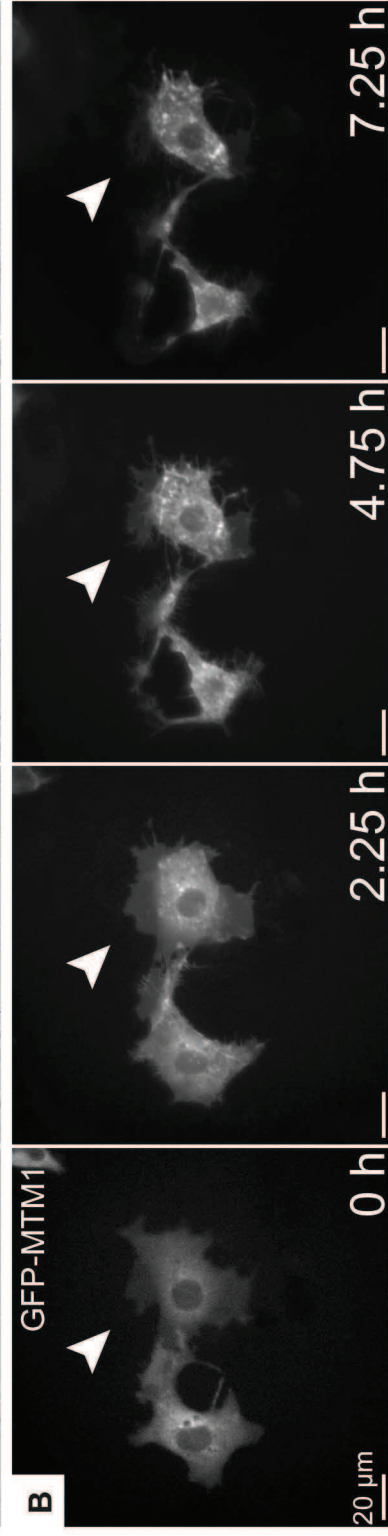
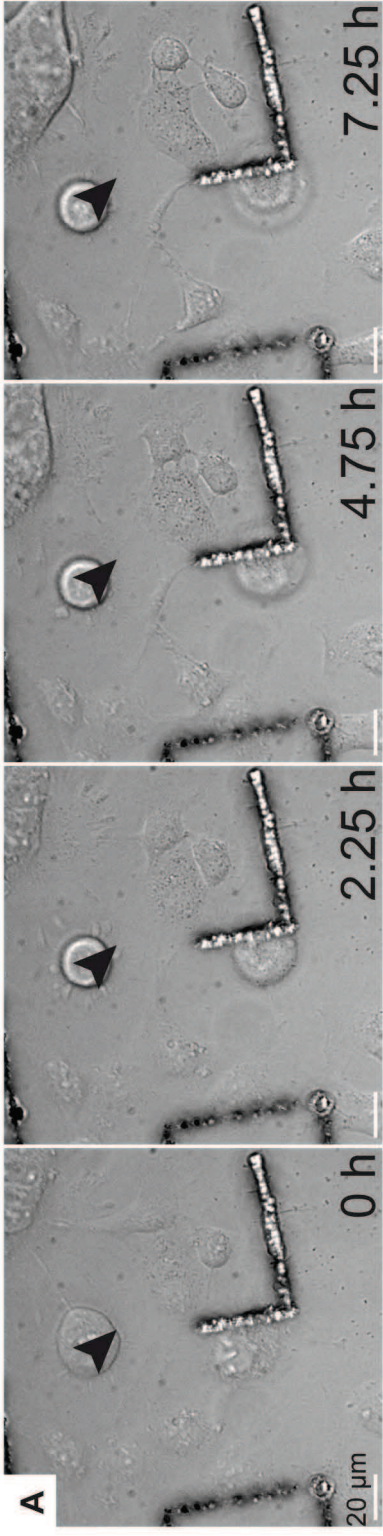
31. Schaletzky J, Dove SK, Short B, Lorenzo O, Clague MJ, et al. (2003) Phosphatidylinositol-5-phosphate activation and conserved substrate specificity of the myotubularin phosphatidylinositol 3-phosphatases. *Curr Biol* 13: 504–509.
32. Nicot AS, Toussaint A, Tosch V, Kretz C, Wallgren-Pettersson C, et al. (2007) Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy. *Nat Genet* 39: 1134–1139.
33. Prendergast GC, Muller AJ, Ramalingam A, Chang MY (2009) BAR the door: cancer suppression by amphiphysin-like genes. *Biochim Biophys Acta* 1795: 25–36.
34. Lee E, Marcucci M, Daniell L, Pypaert M, Weisz OA, et al. (2002) Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science* 297: 1193–1196.
35. Gruska M, Medalia O, Baumeister W, Leis A (2008) Electron tomography of vitreous sections from cultured mammalian cells. *J Struct Biol* 161: 384–392.
36. Kremer JR, Mastrorade DN, McIntosh JR (1996) Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *J Struct Biol* 116: 71–76.
37. Mastrorade DN (1997) Dual-axis tomography: an approach with alignment methods that preserve resolution. *J Struct Biol* 120: 343–352.



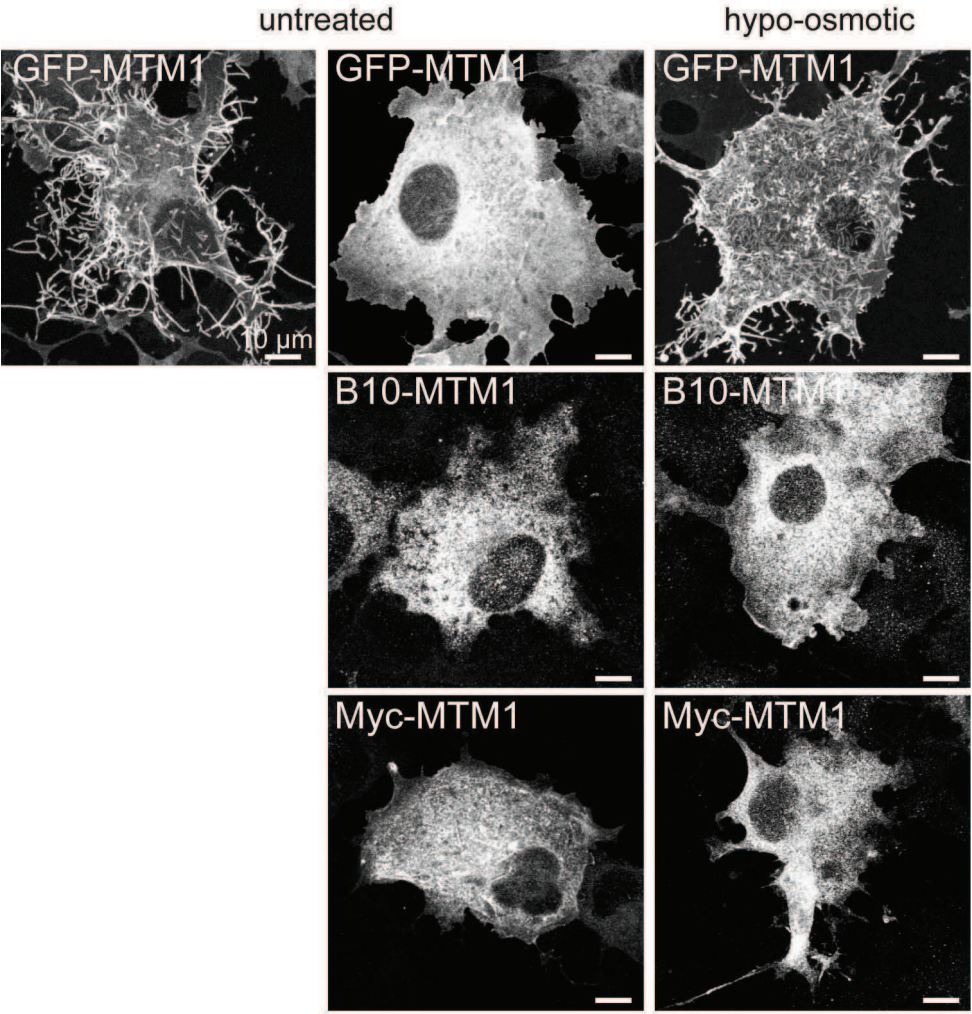


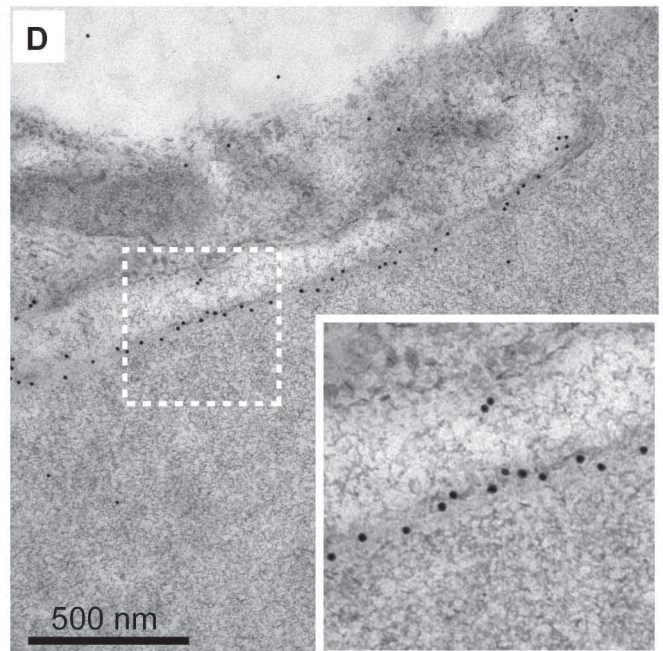
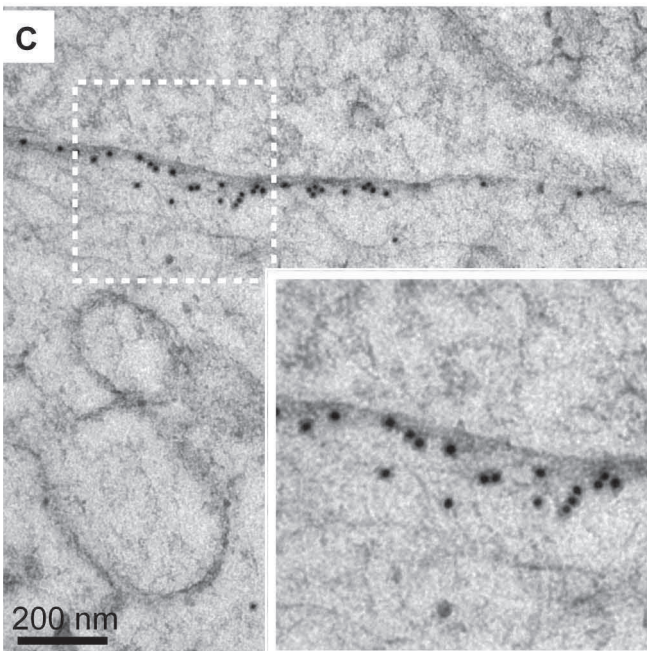
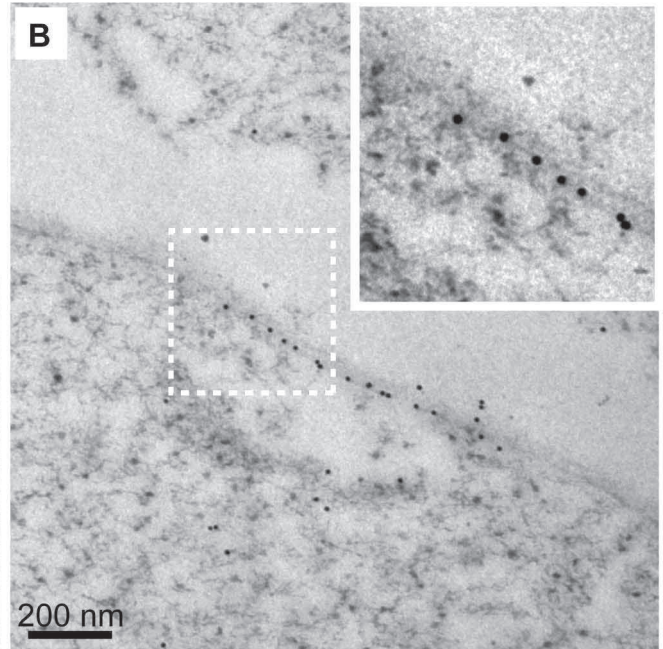
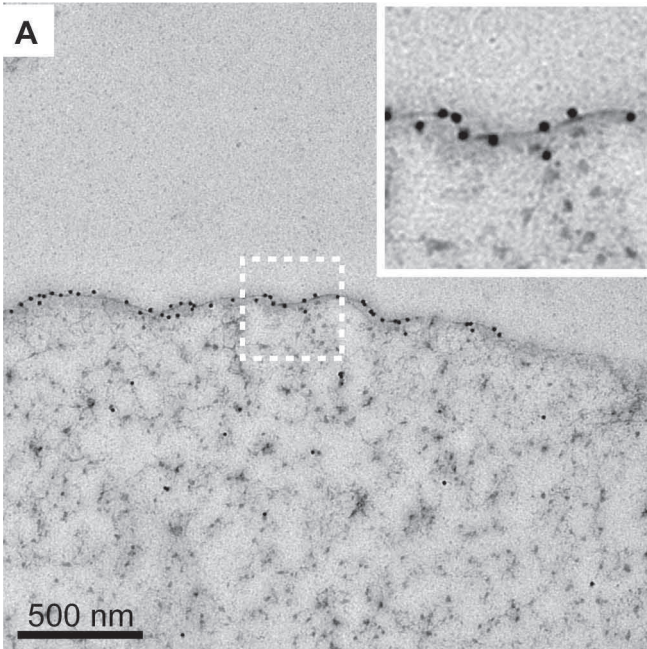




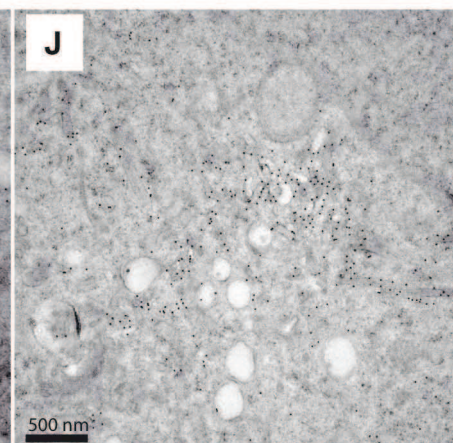
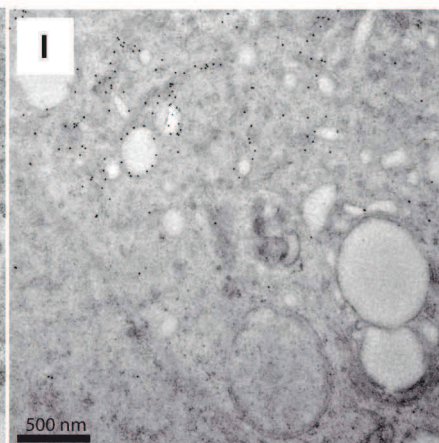
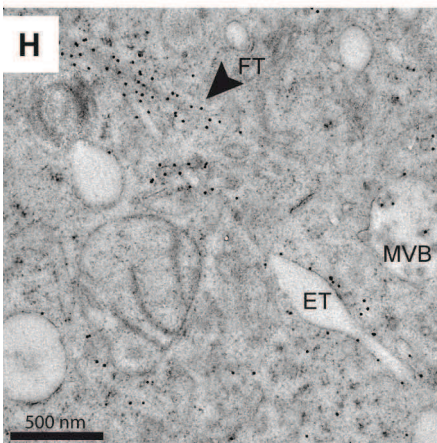
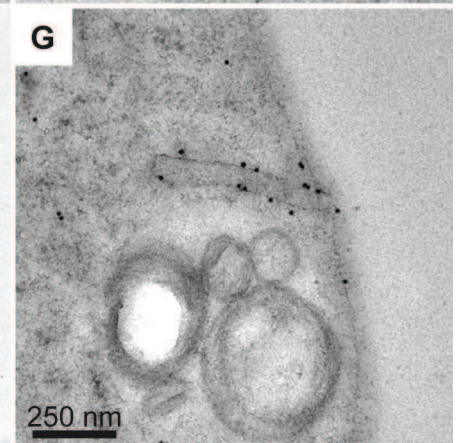
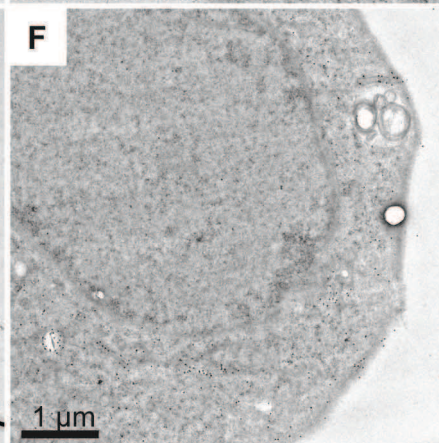
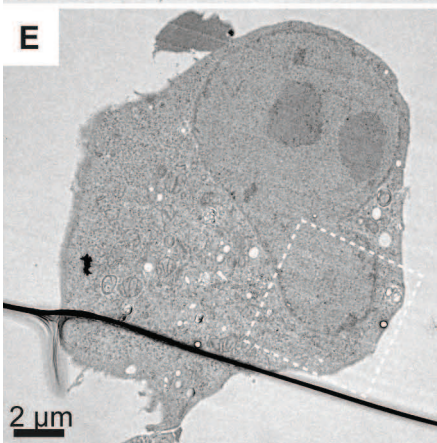
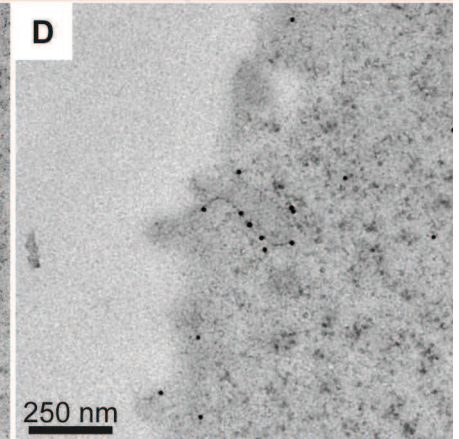
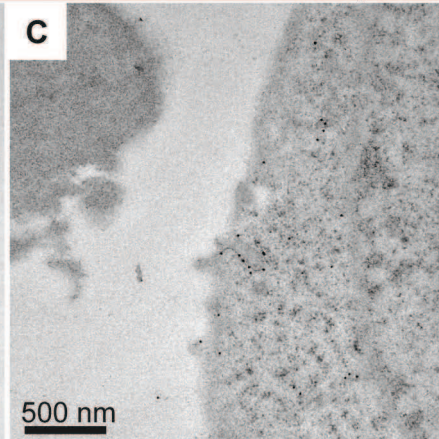
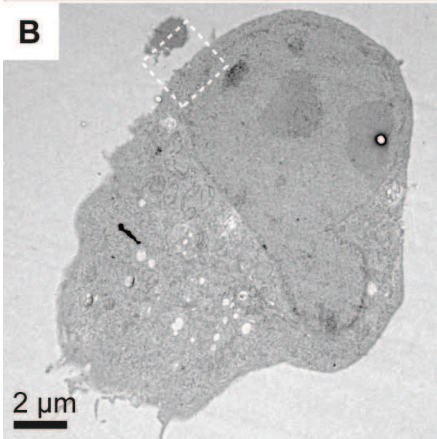
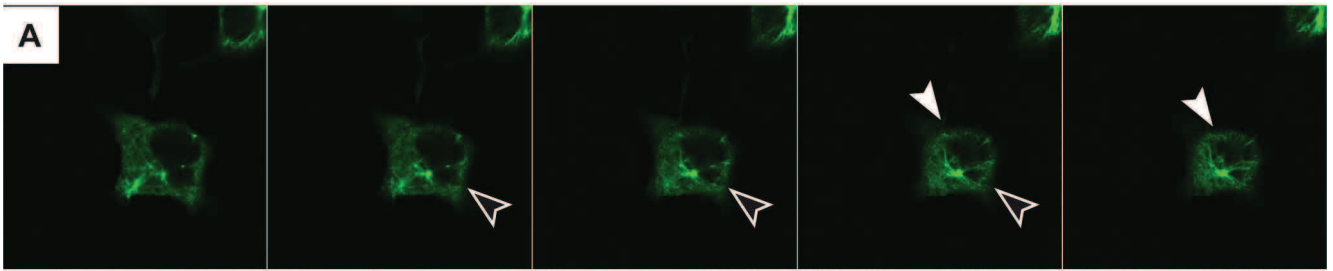












### **VII. MTM1-BIN1-DNM2 : Lien direct entre ces trois protéines impliquées dans les myopathies centronucléaires**

#### **A. Contexte de l'étude**

L'interaction entre BIN1 et la dynamine 2 avait déjà été largement documentée avant mon arrivée dans l'équipe de Jocelyn Laporte. C'est pourquoi nous nous étions intéressés à BIN1 comme potentiel gène muté dans la forme autosomique récessive des myopathies centronucléaires. En effet, BIN1 et la dynamine 2 sont capables d'interagir via leurs domaines SH3 et PRD, respectivement. Ces deux protéines sont en plus impliquées dans les myopathies centronucléaires et plus particulièrement dans les ARCNM et les ADCNM, respectivement (Bitoun, Maugendre et al. 2005; Nicot, Toussaint et al. 2007). La myotubularine est, quant à elle, mutée dans la forme liée au chromosome X (Laporte, Hu et al. 1996). Bien qu'il existe un lien direct entre BIN1 et la dynamine 2, pour le moment, aucun lien entre la myotubularine et BIN1 et/ou la dynamine 2 n'a encore été identifié.

Pourtant, ce lien pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans ces maladies invalidantes et pourrait permettre d'orienter les thérapies futures.

#### **B. Question biologique : existe t-il un lien entre les trois protéines impliquées dans les myopathies centronucléaires ?**

Bien qu'aucun lien n'ait été encore identifié, plusieurs possibilités d'interactions peuvent être envisagées.

En effet, ces trois protéines sont toutes impliquées dans le trafic membranaire. La myotubularine est retrouvée au niveau des endosomes précoces et tardifs où elle déphosphoryle les phosphoinositides endosomaux, tandis que BIN1 et la dynamine 2 sont impliquées dans la formation et la fission des vésicules. Il pourrait donc exister un lien direct entre ces trois protéines, la myotubularine pourrait se fixer à l'une ou à l'autre de ces deux protéines ou encore venir former un complexe de trois protéines.

## Résultats

---

De plus, des membres de la famille des myotubularines (MTMR2 et MTMR13) sont mutés dans deux formes de neuropathie de Charcot-Marie-Tooth de type 4B1 et 4B2 respectivement. Or la dynamine 2 est aussi mutée dans une forme intermédiaire dominante de neuropathie de Charcot-Marie-Tooth (DI-CMT). Ces observations suggèrent un lien entre la dynamine 2 et les myotubularines et/ou une appartenance à une même voie moléculaire.

Néanmoins, ce lien pourrait aussi être indirect. En effet, la myotubularine est une phosphatase à phosphoinositides et BIN1 ainsi que la dynamine 2 sont des protéines capables d'interagir avec des phosphoinositides afin d'être recrutées à la membrane plasmique où elles joueront leur rôle dans le trafic membranaire. Malheureusement jusqu'à aujourd'hui, les études avaient montré que la myotubularine est une phosphatase qui déphosphoryle le PtdIns(3)P et le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>, tandis que BIN1 et la dynamine 2 interagissent avec le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. Pourtant dans ces études, aucune n'avait encore testé une possible interaction de l'amphiphysine 2/BIN1 et/ou de la dynamine 2 avec un des produits de la myotubularine : le PtdIns(5)P.

Nous avons donc décidé dans un premier temps, d'identifier un lien possible entre ces trois protéines. Par manque de temps au cours de ma thèse, je n'ai pu étudier le possible lien via les phosphoinositides, mais dans une étude précédente en collaboration avec l'équipe de Nicolas Charlet-Berguerand, nous avons montré que BIN1 pouvait lier le PtdIns(5)P. Toutes ces données semblent donc confirmer un lien via les phosphoinositides et plus particulièrement impliquant le PtdIns(5)P.

## C. Matériel et Méthodes

### 1. Production d'ADN plasmidiques

L'équipe possédait avant mon arrivée des vecteurs Gateway d'entrée contenant BIN1 sauvage ainsi qu'un vecteur de sortie Ds-Red. J'ai donc utilisé ce vecteur afin d'obtenir de l'ADN plasmidique de BIN1 sauvage liée au Ds-Red.



# Résultats

---

J'ai donc réalisé une réaction LR avec le vecteur Gateway d'entrée et le vecteur de sortie afin d'obtenir la construction souhaitée. (cf. Matériel et Méthodes page 110).

## **2. Culture de cellules et transfection**

Cf Matériel et Méthodes page 91

## **3. Immunofluorescence et microscopie**

Cf. Matériel et Méthodes page 92

## **4. Etude d'interaction par GST « pull down »: Pull down assays**

### **a. Extraction cellulaire**

Les extraits cellulaires de cellules COS-1 transfectées avec MTM1 WT B10 et DNMT2 WT Myc, ont été obtenus. Cf Matériel et Méthodes page 92

### **b. Production de protéines de fusion liées à la GST**

Le principe de cette technique repose sur le principe de la chromatographie d'affinité (Figure 21). Ainsi afin de détecter une interaction protéique, un support solide constitué de billes de sépharose sur lesquelles on a lié un ligand fusionné à une protéine X est incubé avec un extrait cellulaire dans lequel notre protéine d'intérêt Y a été surexprimée (cette protéine peut être liée ou non à tag). Si les deux protéines X et Y interagissent, la protéine Y va venir se fixer à la protéine X et donc au complexe GST-billes. Les lavages suivants permettront d'enlever les autres protéines présentes dans les extraits. Les billes seront sédimentées par centrifugation et l'analyse se fera sur gel SDS page en utilisant un anticorps dirigé contre la protéine Y ou contre le tag de cette protéine Y.

Cf. Matériel et Méthodes page 93 à 95.

### **c. Immunoprécipitation**

2,5 mg de protéines liées à la GST (GST-BIN1 WT et GST-SH3 WT) et aux billes de Sépharose ont été incubées avec des extraits cellulaires transfectées avec MTM1 WT B10. Cf. Matériel et Méthodes page 95.

Les protéines surexprimées dans les extraits cellulaires sont alors révélées ou non par un anticorps monoclonal anti B10 (IGBMC) dilué à 1 : 1000 pour la détection de MTM1 WT B10, et par un anticorps monoclonal anti Myc (IGBMC) dilué à 1 : 1000, pour la détection de DNM2 WT Myc.

## **D. Résultats**

### **1. Lien MTM1/BIN1**

Le lien entre BIN1 et DNM2 avait déjà été largement documenté avant la découverte de mutations dans le gène BIN1. Il semblait donc important de découvrir si un lien pouvait relier MTM1 à ces deux autres protéines. Nous avons décidé d'étudier tout d'abord un potentiel lien entre MTM1 et BIN1 dans notre hypothèse de départ (Figure 20) où BIN1 ferait le lien entre MTM1 et DNM2.

BIN1 est capable de recruter la dynamine 2 à ces tubules membranaires alors que la localisation de cette dernière est normalement cytoplasmique lorsqu'elle est surexprimée seule. J'ai donc cherché à déterminer si BIN1 était aussi capable de recruter la myotubularine au niveau de ces tubules membranaires. J'ai co-surexprimé ces deux protéines, MTM1 WT GFP et BIN1 WT Ds-Red dans des cellules COS. J'ai ainsi observé que BIN1 est toujours capable de former des tubules membranaires, mais que la myotubularine a toujours une localisation cytoplasmique et ne semble donc pas être recrutée aux tubules membranaires de

## Résultats

---

BIN1 (Figure 36). Il ne semble donc pas y avoir d'interaction entre BIN1 et MTM1, *in vivo*, au niveau des tubules membranaires comme cela peut être le cas pour la dynamine 2 et BIN1.

Pourtant, ces résultats ne permettent pas de conclure définitivement qu'il n'y a pas d'interaction directe entre la myotubularine et BIN1 puisque ces deux protéines pourraient interagir à des moments spécifiques, par exemple lors de la formation du muscle squelettique. Dans ce cas de figure, MTM1 serait capable de recruter BIN1 au niveau des membranes des endosomes. Ces membranes pourront par la suite être utilisées pour former les tubules-T grâce à la fonction de tubulation de BIN1 favorisée par son interaction avec la dynamine 2.

J'ai donc procédé à des tests d'interaction *in vitro* afin de vérifier un possible lien physique entre MTM1 et BIN1. J'ai ainsi observé que BIN1 pouvait interagir avec la myotubularine (Figure 37a.). C'est plus particulièrement le domaine SH3 de BIN1 qui semble être impliqué dans cette liaison avec la myotubularine (Figure 37a.). De plus, l'interaction entre le domaine SH3 et la myotubularine semble plus forte que celle entre la myotubularine et BIN1 entière (Figure 37b.). Cette différence pourrait être expliquée par le fait que le site d'interaction de la myotubularine et du domaine SH3 chevauche le site de liaison du domaine SH3 au domaine PI, mais de manière beaucoup moins importante que dans le cas de la dynamine 2. En effet, aucune interaction ne peut être détectée avec ces expériences de GST « pull down » entre la dynamine 2 et BIN1 entière.

La poursuite de cette étude consiste à identifier le domaine de la myotubularine qui pourrait interagir avec le domaine SH3 de BIN1. Elle sera effectuée par Barbara Royer de l'équipe de Jocelyn Laporte.

### **2. Lien MTM1/DNM2**

Par la suite, j'ai réalisé une analyse par surexpression dans des cellules COS et par GST « pull down », afin d'étudier une possible interaction entre la myotubularine et la dynamine 2. Ces résultats sont très préliminaires et demandent à être confirmés.

Dans un premier temps, j'ai co-surexprimé dans des cellules COS, MTM1-GFP et DNM2-Myc. Dans ce cas, la myotubularine et la dynamine 2 ont une localisation

## Résultats

---

cytoplasmique comme cela est le cas lorsqu'elles sont surexprimées seules dans des cellules en culture. Par contre, une faible colocalisation de ces deux protéines au niveau de certains « ruffles » de la membrane a aussi été observée (Figure 38).

Afin d'approfondir ces résultats, j'ai réalisé des expériences de GST « pull down » entre la myotubularine et la dynamine 2.

J'ai ainsi observé une faible interaction entre la dynamine 2 et la myotubularine *in vitro* (Figure 39). Cette interaction est très faible et pourrait être due à la formation d'un complexe entre la myotubularine, un isoforme de l'amphiphysine 2 présente dans les cellules COS que j'ai utilisé pour la surexpression de la dynamine 2 et contenant le domaine SH3.

Il se pourrait donc qu'un complexe entre ces trois protéines, MTM1, BIN1 et DNM2, impliquées dans différentes formes de myopathies centronucléaires ait lieu. Si ce complexe triprotéique se révélait existant, cette étude semble montrer que le site d'interaction de la myotubularine avec le domaine SH3 de BIN1 n'est pas tout à fait le même que le site d'interaction de la dynamine 2 avec BIN1. En effet, l'interaction entre la myotubularine et la dynamine 2 ne pourrait pas se faire si le site d'interaction était le même et si comme dans notre hypothèse BIN1 est au centre de l'interaction permettant ainsi le lien entre MTM1 et DNM2.

### E. Conclusion de l'étude

Lors de la surexpression de la myotubularine et de BIN1 dans les cellules COS, j'ai pu observer que la myotubularine n'était pas recrutée au niveau des tubules membranaires formés par la surexpression de BIN1. Pourtant cette interaction semble bien avoir lieu puisque des expériences de GST « pull down » *in vitro*, ont montré que le domaine SH3 de BIN1 interagit avec la myotubularine. Cette interaction pourrait survenir peu avant la formation des tubules-T. En effet, une étude histologique des coupes de muscle de souris déficiente en *mtm-1*, a montré des défauts au niveau de la localisation des tubules-T et dans le nombre de triades, indiquant donc que la myotubularine pourrait aussi être impliquée dans l'organisation et la fonction de la machinerie d'excitation-contraction du muscle squelettique (Al-Qusairi, Weiss et al. 2009). De plus, une autre étude avait proposé un rôle de BIN1 dans la déformation des membranes et plus particulièrement au niveau des tubules-T (Lee, Marcucci et al. 2002).

## Résultats

---

Enfin, des défauts de remodelage des membranes et de l'organisation de la machinerie d'excitation-contraction dans les muscles de patients atteints de XLCNM, d'ARCNM e d'ADCNM ont été identifiés il y a peu (Toussaint, Cowling et al. 2010).

Ces résultats suggèreraient que la myotubularine, BIN1 et la dynamine 2 pourraient toutes intervenir dans un même processus physiologique et interagir entre elles pour permettre la formation/le maintien des tubules-T dans le muscle squelettique, au cours de son développement. Par la suite, cette interaction pourrait avoir moins d'intérêt pour le muscle d'où l'absence d'interaction observée *in vivo*.

# DISCUSSION



# DISCUSSION

## **I. Régulation de BIN1 : une protéine impliquée dans les ARCNM**

L'identification de mutations dans l'isoforme musculaire de l'amphiphysine 2 : BIN1, chez des patients atteints de la forme autosomique récessive des myopathies centronucléaires a permis de cibler et de mieux comprendre certains mécanismes pathologiques de la maladie. Ces résultats ouvrent la voie à de nouvelles recherches afin de relier, dans un mécanisme commun, les trois protéines impliquées dans les myopathies centronucléaires (MTM1, BIN1 et DNM2). Pour cela, l'étude de la fonction et de la régulation de BIN1 semble être indispensable.

### **A. Le domaine PI : un domaine primordial pour la fonction musculaire de BIN1**

#### **1. Plusieurs isoformes BIN1 dans le muscle**

L'amphiphysine 2 est exprimée sous de nombreuses isoformes qui sont toutes produites à partir de l'épissage alternatif de différents exons. L'isoforme musculaire BIN1 est ainsi produite grâce à l'inclusion de l'exon 11 lors de la transcription de l'ADN en ARN messager. Cet exon est alors transcrit et traduit en un domaine spécifique de cette isoforme musculaire : le domaine PI, composé de 15 acides aminés (RKKS<sub>1</sub>KLFSRLRRKKN), avec de nombreuses charges positives (Lysine K, Arginine R).

Un anticorps dirigé contre cet exon 11, produit et caractérisé au sein de notre équipe, a permis de constater que cette isoforme 8 musculaire n'était pas la seule spécifiquement exprimée dans les muscles squelettiques (Nicot, Toussaint et al. 2007). En effet, environ cinq

## Discussion

---

bandes correspondant à cinq protéines spécifiques du muscle ont pu être détectées grâce à cet anticorps.

Depuis, une semi-quantification des ARN messagers de l'amphiphysine 2 a permis de mettre en évidence deux isoformes qui semblent spécifiques du muscle squelettique humain et qui comprennent, toutes les deux, l'exon 11 codant pour le domaine PI (Toussaint, Cowling et al. 2010). Dans l'une de ces isoformes, l'exon 17 est présent tandis qu'il semble absent de l'autre isoforme (Toussaint, Cowling et al. 2010). L'exon 17, avec l'exon 18, de BIN1 permet de coder pour un domaine spécifique MBD, de liaison à la protéine c-Myc.

La protéine c-Myc est un important régulateur de la prolifération cellulaire et est mutée dans de nombreux cancers humains. Cette protéine est capable de se retrouver aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau et peut agir comme activateur ou comme répresseur transcriptionnel. En effet, c-Myc est composée d'un domaine N-terminal d'activation/répression de la transcription et son domaine C-terminal est un domaine de liaison à l'ADN.

L'insertion ou non de l'exon 17 dans les isoformes spécifiques du muscle permettrait donc d'expliquer la présence de deux de ces cinq protéines identifiées lors des expériences utilisant l'anticorps spécifiques de l'exon11 (Figure 40).

Nous n'avons pas pu déterminer la séquence des trois autres protéines muscles spécifiques qui comprennent ce domaine PI. Pour le moment, nous ne savons pas si elles sont le résultat de modifications post-transcriptionnelles d'une ou plusieurs isoformes.

Il serait intéressant de connaître la nature de ces trois autres protéines reconnues par l'anticorps et de tester si elles ont une fonction spécifique (comme la tubulation des membranes) ou différente dans la cellule, ou encore si leur fonction est redondante. Ainsi, si toutes ces isoformes de BIN1 sont spécifiques de la formation de tubules-T membranaires, cela permettrait d'expliquer la spécificité musculaire des CNM.

### **2. Régulation intramoléculaire via le domaine PI ?**

La présence du domaine PI de BIN1 semble lui conférer des propriétés spécifiques par rapport aux autres isoformes de l'amphiphysine 2 et aux protéines à domaine BAR en général. En effet, contrairement à l'amphiphysine 1 et aux isoformes non musculaires de l'amphiphysine 2, la surexpression de l'isoforme 8 musculaire de l'amphiphysine 2 : BIN1,

## Discussion

---

provoque la formation de longs tubules membranaires partant de la membrane plasmique (Lee, Marcucci et al. 2002; Itoh, Erdmann et al. 2005; Nicot, Toussaint et al. 2007).

De récents travaux semblent donner une explication à ce phénomène. Une étude a ainsi montré que la fonction de courbure et de déformation des membranes du domaine F-BAR de la syndapine-1 est régulée par son propre domaine SH3 (Rao, Ma et al. 2010). En analysant la structure cristallographique de la syndapine-1 entière et de son domaine F-BAR seul, Rao et collègues ont montré que la déformation membranaire, médiée par le domaine F-BAR, était sujette à l'inhibition par son propre domaine SH3. La libération de cette conformation « fermée » est conduite par l'association du domaine SH3 au domaine PRD de la dynamine 1. Cette association permettant à la syndapine-1 de s'ouvrir et au domaine F-BAR d'exercer sa fonction de courbure des membranes. L'hypothèse de cette étude est donc que ce mécanisme pourrait être communément utilisé pour réguler la déformation membranaire induite par les domaines BAR et F-BAR et pour potentiellement coupler ce processus à celui de la fission de vésicules médiée par la dynamine.

Appliquée au domaine BAR, cette étude permettrait donc d'expliquer la régulation de l'amphiphysine 2 et de l'isoforme BIN1 dans le muscle squelettique. Dans le cas général de l'amphiphysine 2, le domaine SH3 va interagir avec son propre domaine BAR (Rao, Ma et al. 2010). Ainsi lié, ce domaine SH3 serait donc capable d'inhiber la fonction de déformation des membranes, ce qui permettrait d'expliquer pourquoi l'amphiphysine 2 et l'amphiphysine 1 ne sont pas capables de tubuler les membranes alors que leurs domaines BAR, seuls, le peuvent *in vitro* et *in vivo* (Takei, Slepnev et al. 1999; Lee, Marcucci et al. 2002; Masuda, Takeda et al. 2006; Rao, Ma et al. 2010). Le domaine BAR sera libéré lors de la fixation de la dynamine 1 ou 2 à son domaine SH3, et ainsi la dynamine jouera son rôle dans la fission des vésicules en fissionnant les tubules préalablement formés (Figure 41a.).

En revanche, dans le cas de l'isoforme musculaire, BIN1, de l'amphiphysine 2, le domaine PI, présent uniquement dans cette isoforme musculaire, est capable de lier son propre domaine SH3 (Kojima, Hashimoto et al. 2004). En liant préférentiellement le domaine PI, le domaine BAR se retrouve ainsi dans une conformation libre, ne liant pas le domaine SH3, et pourrait alors déformer et tubuler les membranes. Tout ceci expliquerait donc pourquoi seule l'isoforme musculaire BIN1 est capable de tubuler les membranes *in vivo* tandis que les autres isoformes entières n'y parviennent pas (Figure 41b.).

## Discussion

---

Cette hypothèse semble confirmée par les résultats que j'ai obtenus lors de la surexpression de BIN1 déléetée de son exon 11 (afin de reproduire l'isoforme retrouvée chez les patients atteints de la forme congénitale de dystrophie myotonique). Dans ces conditions, BIN1 n'est plus capable de tubuler les membranes. Dans ce cas précis, le domaine SH3 est alors libre d'interagir avec le domaine BAR inhibant alors la fonction de déformation des membranes de ce domaine BAR. Elle semble aussi confirmée par mes résultats sur la tubulation du domaine BAR seul, puisqu'en surexpression dans des cellules en culture, ce domaine est capable de tubuler les membranes.

En conclusion, il semblerait donc que ce domaine PI, spécifique des isoformes BIN1, soit important dans les cellules musculaires afin d'induire une tubulation des membranes et pour ainsi faciliter la formation et/ou le maintien des tubules-T dans le muscle squelettique, au cours de son développement, chez des individus sains.

En revanche, une étude récente a montré que ce domaine est absent dans les isoformes du muscle cardiaque (Toussaint, Cowling et al. 2010). Cette absence pourrait être due au fait que dans ce tissu, les tubules-T et les triades ne sont pas constitués de la même façon que dans les muscles squelettiques. En effet, dans le muscle cardiaque, il existe de nombreuses différences dans l'architecture même de ce tissu. Par exemple, il ne possède pas de triades, mais des dyades composé d'un tubule-T en contact avec un unique réticulum sarcoplasmique. De plus, dans les cardiomyocytes, des isoformes spécifiques du récepteur RYR (RYR2 au lieu de RYR1 dans le muscle squelettique) et du DHPR sont retrouvées. En effet, la protéine RYR1 est remplacée par l'isoforme RYR2 et la protéine DHPR ne s'organise plus sous la forme de tétrades. Enfin, ces deux protéines ne sont plus en interaction directe même si elles restent à proximité comme cela est le cas dans le muscle squelettique. De ce fait, les protéines DHPR ne peuvent pas provoquer directement l'ouverture des protéines RYR2. En effet, la vague de dépolarisation qui parcourt la membrane plasmique ouvre les protéines DHPR. Des ions calcium extracellulaires entrent dans la cellule, provoquant une petite augmentation de la concentration intracellulaire en calcium. Cette augmentation va directement agir sur les RYR2, entraînant leur ouverture et la libération massive des ions calcium stockés dans le réticulum sarcoplasmique. En revanche, dans le muscle squelettique, la protéine DHPR activée par l'arrivée du potentiel d'action peut directement ouvrir les RYR1 même en absence de calcium extracellulaire.

## Discussion

---

Il se pourrait donc que le positionnement des tubules-T et du réticulum sarcoplasmique ne nécessite peut être pas une régulation aussi minutieuse dans le muscle cardiaque que dans le muscle squelettique.

### **3. Le domaine PI : un domaine liant plusieurs entités de phosphoinositides ?**

Une des premières études sur la fonction de ce domaine PI avait montré qu'il est capable de lier certains phosphoinositides tels que le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (Lee, Marcucci et al. 2002). Si ce PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> apparaissait comme le principal phosphoinositide capable de se lier à ce domaine PI de nouvelles études semblent démontrer qu'il n'est pas le seul. En effet, le PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> ainsi que le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> semblent aussi pouvoir se lier au domaine PI de façon, certes, beaucoup plus faible (Lee, Marcucci et al. 2002). Il semble aussi pouvoir se lier à des phosphoinositides monophosphates tels que le PtdIns(4)P dans des proportions quasi identiques au PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (Lee, Marcucci et al. 2002). Ce PtdIns(4)P est présent au niveau des vésicules émanant du trans-golgi qui sont, par la suite, redirigées vers la membrane plasmique, où ce PtdIns sert de substrat à la PIP5K1C afin de produire le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>.

Les travaux sur l'implication de BIN1 dans les dystrophies myotoniques de Steinert et de type 2 semblent en plus apporter de nouvelles pistes quant aux phosphoinositides capables de se lier à ce domaine. En effet, l'équipe de Nicolas Charlet-Berguerand a montré que ce domaine est aussi capable de lier le PtdIns(3)P et le PtdIns(5)P (publication en préparation). Les mêmes résultats ont été obtenus en parallèle par notre équipe, par Anne Sophie Nicot, et complétés avec l'identification d'une liaison également au PtdIns(4)P et au PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>. Malheureusement, nous n'avons pu identifier le lien avec le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> ainsi que le PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>, bien que ces interactions soient connues depuis plusieurs années (Lee, Marcucci et al. 2002).

Cette différence pourrait être expliquée par les techniques utilisées. En effet, nous avons utilisé la technique de « fat blot », qui consiste à déposer une gamme de PIs sur des membranes appelées liposomes. La quantité de PIs ainsi déposée peut être très variable ce qui expliquerait pourquoi nous n'avons pas détecté le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. Dans l'étude de Lee et collègues, les auteurs ont utilisé la technique de liaison à des liposomes contenant les

## Discussion

---

différents PIs (Lee, Marcucci et al. 2002). Cependant cette étude n'ayant pas utilisé de liposomes contenant le PtdIns(3)P ou le PtdIns(5)P, ils ne peuvent être exclus comme pouvant être candidats à la liaison au domaine PI de BIN1. Comme l'équipe de Nicolas Charlet-Berguerand a utilisé non seulement la technique de liposomes « pull down » mais aussi de localisation cellulaire pour le PtdIns(5)P, il y a de forte probabilité pour que ce domaine PI soit capable de lier ce PtdIns(5)P présent au niveau des tubules-T.

De plus, Lee et collègues ont utilisé une isoforme BIN1 délétée de son domaine SH3 C-terminale, or une récente étude a montré que ce domaine SH3 est capable d'interagir avec le domaine PI de BIN1, cette interaction pourrait donc empêcher la liaison à certains phosphoinositides (Kojima, Hashimoto et al. 2004) et peut être favorisée une autre interaction avec des PIs différents.

Ce domaine semble donc capable de se lier plus ou moins bien à différents phosphoinositides, et cette habilité de BIN1 à lier différents PIs pourrait lui permettre de se localiser au niveau de différents compartiments cellulaires où peu de PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> est retrouvé. Ce PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, en plus de permettre de recruter BIN1 au niveau de la membrane plasmique, semble être impliqué dans l'ouverture de la protéine et permet ainsi la liaison de BIN1 à des protéines comme la dynamine 2 ou la synaptojanine (Kojima, Hashimoto et al. 2004).

Le fait que BIN1 puisse se lier à plusieurs phosphoinositides afin de se localiser à différents compartiments cellulaires, semble en accord avec certaines études. En effet, des expériences de localisation de l'amphiphysine 2 effectuées avec une pré-perméabilisation des cellules ont permis d'observer une localisation réticulo-vésiculaires et une colocalisation partielle avec des endosomes précoces et tardifs ainsi qu'avec des lysosomes et le réticulum endoplasmique de l'amphiphysine 2 (Leprince, Le Scolan et al. 2003). Cette localisation pourrait être due à la liaison du domaine PI de BIN1 au PtdIns(3)P présent au niveau des endosomes précoces (Gillooly, Morrow et al. 2000), ainsi qu'à la liaison de ce domaine au PtdIns(5)P présent au niveau des endosomes tardifs et des lysosomes (Lecompte, Poch et al. 2008).

De plus, une autre étude a montré que l'amphiphysine 2 est capable de se retrouver au niveau des phagosomes précoces après phagocytose de corps étrangers dans les macrophages (Gold, Morrissette et al. 2000).



Cette capacité du domaine PI de BIN1 à lier plusieurs entités de phosphoinositides pourrait permettre à la protéine d'être recrutée au niveau de différents compartiments cellulaires.

Une des isoformes de BIN1 musculaire semble posséder l'exon 17, responsable de la liaison à la protéine c-Myc. Cette protéine c-Myc est aussi bien retrouvée dans le noyau que dans le cytoplasme. Cette isoforme pourrait donc lier le domaine c-Myc afin de jouer un rôle dans la régulation de la transcription puis être recrutée au niveau des endosomes tardifs et des corps multivésiculaires, via le PtdIns(5)P, pour être amenée à la membrane plasmique où BIN1 jouera son rôle dans la formation et la stabilisation des tubules-T (Figure 42).

### **B. Régulation par le domaine BAR**

#### **1. Les protéines à domaine BAR : un domaine capable de tubuler, mais un domaine enfermé ?**

Les membranes biologiques sont sujettes à des remodelages constants et le contrôle de la forme et de la courbure de ces membranes est essentiel pour de nombreuses fonctions cellulaires vitales telles que la division et la motilité cellulaire, l'endocytose ou le trafic membranaire (McMahon and Gallop 2005). De nombreuses études récentes ont démontré que ces processus sont, entre autres, gouvernés par des protéines qui sont capables de sentir et d'induire la courbure des membranes (McMahon and Gallop 2005; Zimmerberg and Kozlov 2006).

La superfamille des protéines à domaine BAR (BIN1/Amphiphysin/Rvs167), qui comporte des protéines telles que FCHo2 (domaine F-BAR), les amphiphysines (domaine N-BAR/BAR) ou encore IRSp53 (domaine I-BAR), rassemblent des protéines capables de se lier aux membranes, avec des préférences de courbures différentes, et sont ainsi capables de sentir et de courber ces membranes.

Ainsi la famille de protéines à domaine N-BAR/BAR est capable de lier des membranes de forte courbure positive, alors que les protéines à domaine F-BAR lient une gamme différente de membranes avec une courbure encore plus positive. Enfin les protéines à domaine I-BAR lient les membranes courbées négativement.

## Discussion

---

Les protéines à domaine BAR sont diverses en séquence et en organisation mais ont en commun leur localisation au niveau de sites de remodelage des membranes.

Ces domaines BAR sont en fait des domaines coiled-coil N-terminaux, formés de trois hélices  $\alpha$ , qui sont capables de former des homo ou/et des hétérodimères. Chaque dimère va former un complexe plus ou moins incurvé qui va pouvoir sentir et courber les membranes en interagissant avec les phospholipides chargés négativement de la membrane plasmique grâce aux acides aminés chargés positivement contenus dans ces domaines (Peter, Kent et al. 2004; Weissenhorn 2005; Gallop, Jao et al. 2006; Masuda, Takeda et al. 2006). Cette fonction est souvent utilisée durant la phase tardive de l'endocytose. Par exemple, les amphiphysines peuvent se lier aux vésicules à clathrine naissantes et recruter alors de nombreuses protéines telles que les dynamines.

De plus, les protéines à domaines I-BAR (Inverse-BAR) aussi appelés domaine IMD (IRSp53/missing-in-metastasis homology domains) sont capables de lier les membranes grâce à leur domaine BAR, mais ce module I-BAR va plutôt stabiliser des tubules de 78 nm grâce à des courbures négatives (Mattila, Pykalainen et al. 2007). Ces domaines I-BAR sont capables de lier les membranes via leurs faces concaves et vont ainsi être impliqués dans les protusions des filopodes et des lamellipodes de la membrane plasmique.

Les protéines à domaine F-BAR telles que hFCH02, hFCH01, hPacsin/Syndapine, la famille hToca, peuvent dimériser et se lier via leurs faces concaves aux membranes forçant ainsi la membrane à se courber de façon extrêmement positive. Ce domaine F-BAR est un domaine très proche du domaine N-BAR rencontré chez les protéines telles que les amphiphysines. Pourtant, la courbure induite n'est pas la même. Ces protéines peuvent dimériser et lier les membranes et cette liaison est augmentée par le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. Certaines de ces protéines comme FBP17 sont aussi capables de tubuler les membranes (Kamioka, Fukuhara et al. 2004).

Le domaine N-BAR des amphiphysines est conservé de la levure à l'homme. Deux domaines BAR des amphiphysines peuvent former un homodimère en forme de banane grâce aux charges positives présentes le long de leurs faces concaves qui peuvent interagir avec les charges négatives de la membrane (Peter, Kent et al. 2004). Les amphiphysines ont la propriété de posséder dans leur partie N-terminale une hélice amphipatique. Le rôle exact de cette hélice semble encore être sujet à discussion. En effet, plusieurs études tendent à penser qu'elle permettrait de s'insérer entre les lipides de la membrane et semblerait ainsi

## Discussion

---

favoriser l'induction de la courbure qui peut alors être stabilisée par le domaine BAR (Peter, Kent et al. 2004; Low, Weininger et al. 2008). Tandis qu'une étude récente semble indiquer que le domaine BAR seul est capable de sentir et d'induire la courbure des membranes et que cette hélice amphipatique ne sert qu'à l'aider à former des tubules membranaires (Arkhipov, Yin et al. 2009).

Ce domaine N-BAR des amphiphysines est capable de tubuler les membranes *in vitro* grâce à la technique de liaison aux liposomes (Takei, Slepnev et al. 1999; Low, Weininger et al. 2008) mais aussi *in vivo* pour l'isoforme musculaire de l'amphiphysine 2, comme nous l'avons montré dans notre étude sur les mutations identifiées dans BIN1 (Nicot, Toussaint et al. 2007). De plus, cette capacité de tubulation semble être dépendante du domaine BAR mais aussi de l'hélice amphipatique puisque le domaine BAR seul ne tubule que peu les membranes des liposomes (Takei, Slepnev et al. 1999).

Pourtant, bien que la surexpression de l'amphiphysine 1 ne provoque pas l'apparition de tubules dans les cellules en culture, cette protéine a la capacité de former des tubules de membranes. En effet, des tubules apparaissent après la surexpression de l'amphiphysine 1 délétée de sa partie C-terminale qui comprend le domaine SH3 d'interaction avec la dynamine (délétion des acides aminés 377-683) (Peter, Kent et al. 2004). L'amphiphysine 1 est capable d'induire la formation de tubules à partir de liposomes, contenant différents lipides tels que la phosphatidylsérine, la phosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine et les phosphoinositides. Ces tubules sont alors fragmentés lors de l'ajout de dynamine 1 et de GTP (Takei, Slepnev et al. 1999).

Il en est de même lors de la surexpression du domaine F-BAR seul de protéine comme la syndapine-1 qui est capable de former des tubules membranaires alors que la protéine entière en est incapable lorsqu'elle est surexprimée dans des cellules (Rao, Ma et al. 2010).

Une première explication à ce phénomène est que ces protéines à domaines BAR ou F-BAR contiennent un domaine SH3 capable de lier la dynamine 1 ou 2. En surexpression dans des cellules, ces protéines peuvent former des tubules mais ces derniers sont probablement fragmentés par les dynamines dans les cellules.

La deuxième explication est démontré par une étude récente dans laquelle le domaine SH3 des protéines à domaine F-BAR telles que la syndapine-1, régule la fonction de tubulation des membranes de leur domaine BAR en se liant à ce dernier (Figure 41a.) (Rao,

Ma et al. 2010). Ainsi la régulation intramoléculaire du domaine BAR par le domaine SH3 pourrait garder en sommeil la capacité des amphiphysines à tubuler les membranes.

### **2. Le domaine N-BAR de BIN1 : un domaine BAR libre, capable de tubuler les membranes ?**

La particularité de l'isoforme musculaire BIN1 de l'amphiphysine 2 est qu'elle possède un domaine PI spécifique du muscle squelettique. Ce domaine est capable de lier le domaine SH3 de BIN1. Ce dernier, lié, ne serait alors plus capable de réguler le domaine BAR (Rao, Ma et al. 2010). Cette particularité permettrait donc de libérer le domaine BAR de BIN1 alors capable de tubuler les membranes sans intervention de la dynamine 2.

L'hélice amphipatique présente avant le domaine BAR va déstabiliser la membrane plasmique en s'y insérant grâce à sa face hydrophobe (Peter, Kent et al. 2004). Elle induit ainsi une courbure locale qui est ensuite amplifiée et/ou stabilisée par l'homodimérisation de BIN1 à la membrane.

Mes résultats semblent en accord avec cette hypothèse. En effet, le domaine BAR ainsi que la protéine BIN1 entière sont capables de tubuler les membranes *in vivo*, ce qui n'est pas le cas pour les autres isoformes de l'amphiphysine 2 et pour l'amphiphysine 1 entière, bien que leurs domaines BAR seuls soient capables de tubuler les membranes en surexpression dans des cellules mais aussi *in vitro* (Peter, Kent et al. 2004; Nicot, Toussaint et al. 2007). De plus, les résultats que j'ai eu lors de l'étude de l'implication de BIN1 dans les dystrophies myotoniques de Steinert et de type 2 plaident en ce sens. En effet, la surexpression de l'isoforme 8 musculaire BIN1, dans des cellules COS-1 et des cellules musculaires C2C12, montre que cette isoforme est bien capable de tubuler les membranes en accord avec les résultats de Lee et collègues (Lee, Marcucci et al. 2002).

La surexpression du domaine N-BAR seul est aussi capable de tubuler les membranes. Enfin, une absence de tubulation de l'isoforme BIN1 déléetée de son domaine PI est observée en surexpression dans des cellules en culture.

En conséquence, ces résultats abondent dans le sens de l'hypothèse de Rao et collègues dans laquelle le domaine SH3 est capable de lier le domaine BAR, ce qui a pour effet d'empêcher la tubulation de BIN1 déléetée de son domaine PI (Rao, Ma et al. 2010). La tubulation de l'isoforme BIN1 semble donc dépendante du domaine N-BAR mais également

de la présence du domaine PI sans lequel le premier serait bloqué par son interaction avec le domaine SH3 (Figure 41b.).

Cette différence de capacité de tubulation permettrait ainsi à BIN1 de maintenir/stabiliser les tubules-T présents dans les cellules musculaires (Lee, Marcucci et al. 2002).

### **C. Régulation par le domaine SH3**

#### **1. Le domaine SH3 : régulation intramoléculaire**

Le domaine SH3 des amphiphysines semble donc être la base de la régulation de ces protéines. En effet, il pourrait être capable de se lier au domaine BAR afin d'inhiber sa fonction de déformation des membranes et seul sa liaison au domaine PRD de la dynamine semble pouvoir lever cette inhibition (Rao, Ma et al. 2010).

Il est aussi capable d'interagir avec le domaine PI de l'isoforme musculaire BIN1, ce qui semble permettre de lever l'inhibition qu'il provoque lorsqu'il est lié au domaine BAR (Kojima, Hashimoto et al. 2004). Dans le cas où ce domaine SH3 lie le domaine PI, seul l'action du PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> permet de libérer ce domaine SH3 qui va alors directement se fixer à la dynamine 2 et ne pourra donc pas se fixer à son domaine BAR.

Le site de liaison de la dynamine 2 au niveau du domaine SH3 semble donc être caché par la liaison de ce domaine avec le domaine PI jusqu'à ce que ce domaine PI lie le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. L'étude de Kojima et collègues n'excluait pas l'hypothèse que cette liaison entre le domaine SH3 et le domaine PI pourrait être régulée par la liaison aux protéines contenant un domaine PRD comme la dynamine 2 et régulerait ainsi la liaison de BIN1 aux phosphoinositides (Kojima, Hashimoto et al. 2004). Mes résultats sembleraient plutôt indiquer que la liaison aux phosphoinositides pourrait être responsable de la régulation de la liaison entre les domaines SH3 et PI. En effet, mes résultats de GST « pull down » montrent que la dynamine 2 est incapable de lier BIN1 entière, ce qui pourrait provenir du fait que le domaine SH3 est bloqué par sa liaison au domaine PI.

Enfin, l'étude de Kojima et collègues a mis en évidence le rôle important du PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> pour abolir la liaison du domaine SH3 au domaine PI (Figure 43) (Kojima,

## Discussion

---

Hashimoto et al. 2004). Cependant serait-il possible que d'autres phosphoinositides aient le même impact sur cette liaison ? Et plus particulièrement les phosphoinositides dépendant de la myotubularine comme le PtdIns(5)P ou encore le PtdIns(3)P. En effet, dans leur étude, Kojima et collègues n'ont testés que le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> et le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> mais pas les autres phosphoinositides. Nos travaux avec l'équipe de Nicolas Charlet-Berguerand et d'Anne-Sophie Nicot semblent montrer qu'il existerait un lien entre le PtdIns(3)P mais surtout entre le PtdIns(5)P et le domaine PI de BIN1. Il serait donc intéressant de déterminer si ce PtdIns(5)P est capable de lever la liaison du domaine SH3 au domaine PI, ce qui permettrait d'expliquer un rôle de ce phosphoinositide dans la régulation de la fonction de BIN1.

### **2. Le domaine SH3 : régulation de la liaison aux protéines à domaine PRD**

Comme nous l'avons vu précédemment, la surexpression de l'isoforme 8 musculaire de l'amphiphysine 2 ou de protéines à domaines F-BAR et SH3 comme FBP17 provoque la formation de longs tubules membranaires (Lee, Marcucci et al. 2002; Itoh, Erdmann et al. 2005). Pourtant l'isoforme musculaire BIN1 se distingue des protéines à domaine F-BAR. En effet, les tubules formés par la surexpression de FBP17 ne se forment plus lorsque cette protéine est surexprimée avec la dynamine 2 alors que dans notre cas, nous avons pu observer que les tubules membranaires de BIN1 sont maintenus lors de mêmes expériences de co-surexpression (Lee, Marcucci et al. 2002; Itoh, Erdmann et al. 2005; Nicot, Toussaint et al. 2007).

De plus même si *in vivo*, l'amphiphysine 1 n'est pas capable de former des tubules membranaires, l'amphiphysine 1 est capable de tubuler les liposomes *in vitro*. Ces tubules sont alors fragmentés par l'ajout de dynamine 1 et de GTP (Takei, Slepnev et al. 1999). La première explication donnée à cette « non tubulation » de l'amphiphysine 1 dans les cellules était que la dynamine 1 ou 2 provoquerait la fission des tubules créés par la surexpression de l'amphiphysine 1. Cette hypothèse semblait être confirmée par le fait que des tubules membranaires apparaissent lors de la surexpression d'une amphiphysine 1 délétée pour sa partie C-terminale, incluant son domaine SH3 (Peter, Kent et al. 2004). Or aujourd'hui, il semblerait plutôt que l'abolition de la fonction de tubulation de l'amphiphysine 1 *in vivo*, soit due à une régulation de cette fonction du domaine BAR par le domaine SH3 (Rao, Ma et al. 2010). Ainsi lorsque l'amphiphysine 1 est surexprimée sans son domaine SH3, il n'y a pas de



## Discussion

---

régulation du domaine BAR qui peut alors tubuler les membranes. Cette hypothèse n'empêche cependant pas la dynamine de venir par la suite fissionner ces tubules grâce à l'ajout de GTP.

L'isoforme BIN1 semble être capable d'empêcher la régulation du domaine BAR par le domaine SH3 via l'interaction du domaine SH3 avec son domaine PI. De plus, en co-surexpression dans des cellules avec la dynamine 2, elle est capable de recruter cette dernière aux tubules membranaires qu'elle forme et d'empêcher la fission de ces tubules par la dynamine 2. L'isoforme BIN1 semble donc capable de promouvoir la fonction de tubulation et de bloquer la fonction de fission de la dynamine 2, via le recrutement de la dynamine 2 par son domaine SH3.

Pourtant la réponse à la question : « comment BIN1 est capable d'augmenter la fonction de tubulation de la dynamine 2 et de bloquer sa fonction de fission ? » reste encore floue.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour répondre à cette question. En effet, BIN1 possède deux particularités par rapport aux autres isoformes de l'amphiphysine 2 et par rapport à l'amphiphysine 1. Tout d'abord, elle ne contient pas de domaine de liaison à AP-2 et à la clathrine mais elle possède un domaine PI spécifique. Pourtant aucun de ces domaines ne semble lui être nécessaire pour inhiber l'activité de fission de la dynamine 2. En effet, les protéines à domaine F-BAR, telles que FBP17, ne contiennent pas de domaines de liaison à la clathrine ni à AP-2, et pourtant elles sont sensibles à la fonction de fission de la dynamine 2 puisque les tubules membranaires formés lors de la surexpression de FBP17 sont fissionnés lors de la co-surexpression avec la dynamine 2. De plus, l'homologue des amphiphysines chez la drosophile ne contient pas de domaine PI, mais est pourtant capable d'avoir un rôle essentiel dans la formation des tubules-T et ne semble donc pas sensible à la fission par la dynamine 2 (Razzaq, Robinson et al. 2001).

Une autre hypothèse qui pourrait être évoquée serait que lors de l'interaction entre le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> et le domaine PI de BIN1, le domaine SH3 soit libéré et puisse donc interagir avec le domaine PRD de la dynamine 2 (Rao, Ma et al. 2010). En interagissant avec le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, ce phosphoinositide est moins disponible pour son interaction avec le domaine PH de la dynamine 2. Or, des études ont montré que la liaison du domaine PH avec le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> pouvait influencer l'activité GTPase de la dynamine (Vallis, Wigge et al. 1999). En effet, certains mutants du domaine PH de la dynamine 2, qui ne lient plus le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>,

## Discussion

---

montrent une diminution dans l'activité GTPase de la dynamine 2. La diminution ou le ralentissement de l'activité GTPase de la dynamine pourrait être responsable de l'inhibition de sa fonction de fission. En effet, des mutations dans le domaine GTPase de la dynamine 2 responsables d'une hydrolyse faible du GTP et donc d'une diminution de l'activité GTPase de la dynamine 2, sont responsables de la formation de tubules membranaires (Marks, Stowell et al. 2001).

Enfin, il a été montré que l'amphiphysine 1 est capable d'influencer l'activité GTPase de la dynamine 1 suivant certaines conditions. L'amphiphysine 1 en présence de liposomes est capable de tubuler ces membranes et si ces liposomes sont de grandes tailles (environ 1500 nm), l'ajout de dynamine 1 est responsable de la fission de ces tubules membranaires par stimulation de l'activité GTPase de la dynamine 1. Tandis que l'amphiphysine 1 semble inhiber l'activité de fission de la dynamine 1 lorsqu'elle est mise en présence de liposomes de petites tailles (environ 80 nm). Dans ce cas, la dynamine 1 n'est plus capable de fissionner les tubules membranaires et semble plutôt les stabiliser (Takei, Slepnev et al. 1999; Yoshida, Kinuta et al. 2004).

L'isoforme musculaire BIN1 est capable de former des tubules de petites tailles et pourrait dans ce cas, inhiber l'activité de fission de la dynamine 2, tout comme l'amphiphysine 1 sur la dynamine 1.

Enfin, Owen et collègues ont montré que la fixation du domaine SH3 de BIN1 à la dynamine était responsable d'une déstabilisation de l'oligomérisation de cette dernière. L'étude de la structure cristallographique du domaine SH3 de l'amphiphysine 2 a montré de nombreuses caractéristiques spécifiques à l'amphiphysine 2 (Owen, Wigge et al. 1998). Ce domaine SH3 possède une large région contenant des charges négatives qui recouvre une importante portion du site de liaison de la dynamine. De plus, dans ce même domaine SH3, il existe une insertion dans la boucle n-Src, adjacente au domaine de liaison de la dynamine. Cette insertion semble responsable du blocage de l'auto-assemblage en anneau de la dynamine et la délétion de cette portion additionnelle provoque un effet inverse sur la dynamine en permettant son auto-assemblage en anneau. Tandis que le domaine SH3 de Grb2 n'est capable de cette inhibition que si sa boucle n-Src est remplacée par celle de l'amphiphysine 2. Cette étude suggère donc que le domaine SH3 de l'amphiphysine 2 est un régulateur important du cycle d'oligomérisation de la dynamine. Or l'oligomérisation de la dynamine est très importante pour sa fonction de fission des vésicules, sans une

## Discussion

---

oligomérisation correcte la dynamine semble plutôt être capable de tubuler/stabiliser les membranes (Roux, Koster et al. 2010).

En résumé, grâce à toutes ces données, il semblerait donc que le domaine SH3 de BIN1 soit capable d'inhiber de plusieurs façons la fonction de fission de la dynamine 2. En effet, grâce à sa boucle n-Src, ce domaine est capable d'inhiber l'auto-assemblage de la dynamine 2 provoquant une diminution de son activité GTPase. Cette inhibition n'est possible que lorsque BIN1 interagit avec le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, diminuant ainsi la liaison de la dynamine 2 avec ce même phosphoinositide. Ceci ayant pour conséquence de diminuer l'activité GTPase de la dynamine 2. De plus, nous avons vu que la formation de petits tubules membranaires semble aussi responsable d'une diminution de l'activité de fission de la dynamine 2. Or, BIN1 forme des tubules membranaires de petites tailles et pourrait donc inhiber encore cette activité de fission. La dynamine 2 devient alors capable de stabiliser les tubules membranaires au détriment de sa fonction de fission (Figure 43).

La protéine BIN1 semble donc être régulée par ces trois domaines grâce à des interactions intramoléculaires. Ainsi, la liaison du domaine SH3 avec les protéines à domaine PRD se fait uniquement lorsque BIN1 est en contact avec certains phosphoinositides. Lorsque BIN1 n'interagit pas avec le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, son domaine PI interagit avec son propre domaine SH3. L'avantage de cette interaction est qu'elle régule ainsi la liaison aux protéines à domaine PRD telles que la dynamine 2 ou encore des protéines comme RIN3. En effet, via ce domaine SH3 de BIN1, l'amphiphysine 2 est capable de recruter la protéine RIN3. Cette dernière est une protéine stimulant et stabilisant la forme Rab5, liée au GTP, en se liant directement à Rab5, permettant ainsi la translocation de l'amphiphysine 2 dans des vésicules positives pour RIN3 et Rab5 que sont les endosomes précoces (Kajiho, Saito et al. 2003). Cette liaison de l'amphiphysine pourrait être la première étape du recyclage de BIN1 à la membrane plasmique et pourrait être dépendante de l'ouverture de la protéine.

Cette interaction entre le domaine SH3 et le domaine PI permet aussi au domaine BAR de BIN1 d'être sous une conformation libre et donc de tubuler les membranes (Figure 43). Nous avons vu précédemment que dans les autres isoformes de l'amphiphysine 2, ce domaine PI n'existant pas, c'est le domaine SH3 qui régule la fonction de tubulation du domaine BAR en se liant à ce dernier. Dans ce cas, seule la liaison avec une protéine à domaine PRD permet au domaine BAR d'être libre.

## Discussion

---

Il semblerait également que ce domaine PI soit capable de lier d'autres phosphoinositides que le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> ou le PtdIns(4)P décrit préalablement tel que le PtdIns(5)P au niveau des tubules membranaires. Ce phosphoinositide est produit par la déphosphorylation du PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> par MTM1 et semble donc être un potentiel lien entre BIN1 et MTM1.

### D.Perspectives

L'intérêt porté par de nombreuses équipes sur l'isoforme musculaire BIN1 a permis de montrer que son domaine PI semble lui conférer une fonction spécifique mais aussi un mode de régulation différent des autres isoformes de l'amphiphysine 2. Il serait nécessaire de définir plus exactement les différents phosphoinositides capables de se lier au domaine PI de BIN1 en utilisant une construction BIN1 entière et des liposomes sur lesquelles les différents phosphoinositides seraient ajoutés.

Des colocalisations dans des cellules en culture pourraient compléter ces expériences. Nous pourrions utiliser des sondes capables de se lier aux phosphoinositides qui interagiraient avec la construction BIN1 entière. Par exemple la sonde 2XFYVE, que nous avons au laboratoire, nous permettrait de localiser le PtdIns(3)P. Ces analyses permettront de vérifier si BIN1 est capable d'interagir avec différentes entités de phosphoinositides et définir au niveau de quel compartiment cette interaction a lieu permettrait de mieux comprendre le rôle de cette protéine dans le muscle squelettique et de mieux définir la possible interaction entre BIN1 et les deux autres protéines, MTM1 et DNM2, impliquées dans les myopathies centronucléaires.

Nous avons également remarqué qu'ils existaient au moins deux isoformes de BIN1 dans le muscle squelettique, avec ou sans l'exon 17. Cloner et tester ces deux isoformes seraient nécessaire afin de vérifier leur localisation cellulaire et leur capacité ou non à induire des tubules membranaires et à y recruter la DNM2. Tous les tests que nous avons déjà réalisés sur l'isoforme BIN1, ne contenant pas cet exon 17, comme la formation de tubules membranaires en surexpression dans des cellules, les tests de GST « pull down » et d'autres tests comme ceux des liposomes « pull down » pourraient être envisagés sur BIN1 avec l'exon 17. Un anticorps spécifique de chaque isoforme serait également nécessaire afin de

mieux les différencier sur des biopsies musculaires, et ainsi de pouvoir les localiser dans le muscle squelettique directement.

Il faudrait aussi pouvoir déterminer si ces deux isoformes subissent des phosphorylations ce qui par exemple, permettraient d'expliquer pourquoi cinq protéines sont observées dans le muscle squelettique avec un anticorps dirigé contre l'exon 11.

Enfin, je propose aussi de vérifier l'hypothèse selon laquelle le domaine BAR de BIN1 est capable d'interagir avec son domaine SH3, en délétant le domaine PI qui empêche cette interaction. L'utilisation de la technique de GST « pull down » permettraient de répondre à cette question.

## **II. Lien entre les trois protéines MTM1-BIN1-DNM2 impliquées dans les myopathies à centralisation des noyaux**

Nos résultats semblent indiquer qu'il existerait une voie moléculaire commune entre les trois protéines MTM1, BIN1 et DNM2 impliquées dans les myopathies centronucléaires. Ce lien pourrait permettre d'ouvrir un nouvel axe de recherche pour identifier de nouvelles thérapies. En effet, si ces trois protéines collaborent dans un même processus, dans un ordre bien déterminé, chaque mutation aboutissant à une forme particulière de CNM, en essayant de moduler le niveau des deux autres protéines ou en utilisant des protéines qui joueraient le même rôle dans le muscle squelettique, nous pourrions réduire les effets nocifs de ces mutations.

### **A.Lien entre MTM1-BIN1**

L'identification de mutations dans le gène BIN1 dans la forme autosomique récessive des myopathies centronucléaires conduit à penser que les trois protéines (MTM1, BIN1 et DNM2) impliquées dans ces maladies invalidantes pouvaient participer à une même voie moléculaire, dans le muscle squelettique, en interagissant entre elles. Ainsi, plusieurs hypothèses se présentaient, à nous :

## Discussion

---

- soit elles interagissent directement entre elles, puisque ces trois protéines sont toutes impliquées dans le trafic membranaire,
- soit elles interagissent via les phosphoinositides, puisque la myotubularine est une phosphatase à phosphoinositides et que BIN1 et DNM2 sont capables de se fixer aux phosphoinositides.

### 1. Un lien direct ?

Les premières études sur l'isoforme musculaire de l'amphiphysine 2, BIN1, dans le muscle squelettique impliquent cette protéine dans la formation/stabilisation des tubules-T membranaires (Lee, Marcucci et al. 2002). Les tubules-T sont des invaginations de membrane nécessaires au muscle dans le processus d'excitation-contraction de la fibre musculaire. Ces structures tubulaires nécessitent l'apport de membrane non seulement pour leur formation mais aussi pour leur maintien. La myotubularine étant une protéine impliquée dans le processus de trafic membranaire par sa fonction de phosphatase, nous avons donc supposé que ces deux protéines pourraient interagir entre elles, directement, afin de former et/ou stabiliser ces tubules membranaires.

Mes travaux semblent indiquer qu'il peut en effet y avoir un lien direct entre BIN1 et MTM1 via le domaine SH3 de BIN1. MTM1 pourrait ainsi être responsable du recrutement de BIN1 au niveau des endosomes précoces ou tardifs, permettant, par la suite, à BIN1 d'être recyclée à la membrane plasmique avec les membranes des endosomes tardifs. Ce recyclage participe ainsi non seulement au rapatriement des membranes mais aussi à celui de BIN1 afin de former/maintenir les tubules membranaires (Figure 44).

Jusqu'ici nous n'avons pas encore pu identifier le domaine de MTM1 qui pourrait interagir avec le domaine SH3 de BIN1. Cependant plusieurs hypothèses, quant à ce domaine, peuvent être émises.

En effet, une récente étude a montré une interaction entre le domaine SH3 de la syndapine avec son propre domaine BAR (Rao, Ma et al. 2010). Dans cette étude, les auteurs proposent qu'il pourrait se produire la même interaction entre les domaines SH3 et BAR de la



## Discussion

---

famille des protéines à domaine N-BAR telles que les amphiphysines 1 et 2. Mes résultats sur la tubulation du domaine BAR seul de BIN1 ainsi que sur la « non tubulation » de l'isoforme BIN1 déléetée de son domaine PI semblent être en accord avec leur hypothèse. Or ce domaine BAR n'est autre qu'un domaine « coiled-coil » formé par trois hélices  $\alpha$ . Ce domaine SH3 pouvant donc lier ce domaine par des interactions intramoléculaires, nous pouvons supposer que BIN1, via son domaine SH3, pourrait interagir avec le domaine « coiled-coil » C-terminal de MTM1.

Une autre hypothèse pourrait être émise du fait de la présence dans la région C-terminale de MTM1, d'un domaine PRD (586-592) qui se trouverait juste après le domaine coiled-coil et huit acides aminés avant le domaine PDZ (Figure 45). Ce domaine a été identifié par alignement de séquence par Jocelyn Laporte et semblerait être un interacteur potentiel du domaine SH3 de BIN1. En effet, le domaine SH3 de BIN1 est connu pour interagir avec le domaine PRD de nombreuses protéines telles que la dynamine 2 ou la synaptojanine.

Dans les deux cas, il semblerait que le site de liaison du domaine de MTM1 avec le domaine SH3 de BIN1 ne soit pas le même que le site de liaison du domaine PRD de la dynamine 2. En effet, au cours de mes travaux, nous avons pu observer que la myotubularine, *in vitro*, est capable d'interagir avec BIN1 entière et avec le domaine SH3 seul, tandis que la dynamine 2 est capable d'interagir uniquement avec le domaine SH3 seul de BIN1 (Kojima, Hashimoto et al. 2004). En effet, le domaine PI de BIN1, qui interagit aussi avec le domaine SH3, empêche la liaison de la dynamine 2, leur site d'interaction se chevauchant en grande partie. La protéine BIN1 entière n'est donc pas capable d'interagir avec la dynamine 2 sauf dans le cas où elle est préalablement mise en contact avec le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. Ce n'est pas le cas pour MTM1, qui semble pouvoir interagir avec BIN1 malgré l'interaction du domaine SH3 avec son propre domaine PI. Il faut noter tout de même que l'interaction avec le domaine SH3 semble plus forte qu'avec la protéine entière, il pourrait donc y avoir un léger chevauchement entre les deux sites de liaison. Ou alors, la conformation « ouverte » de BIN1 la rendrait plus favorable à la liaison de MTM1 que la conformation « fermée », bien que cette dernière ne soit pas un obstacle complet à cette liaison.

En conclusion, il semblerait que MTM1 soit capable d'interagir directement avec BIN1 via le domaine SH3 de cette dernière. Cette interaction pourrait ne pas bloquer ou ne

## Discussion

---

pas être empêchée par la conformation « fermée » de BIN1 due à la liaison du domaine SH3 avec son propre domaine PI. Il se pourrait donc que cette liaison de MTM1 à ce domaine de BIN1 n'empêche pas non plus la liaison du domaine SH3 au domaine PRD de la dynamine 2. Des tests *in vitro* en présence ou en absence de la dynamine 2 pourraient être menés pour vérifier si en présence de la dynamine 2 la liaison entre MTM1 et BIN1 est encore possible. De plus, des tests *in vitro* devront être réalisés afin de déterminer quel est le domaine de MTM1 qui interagit avec le domaine SH3 de BIN1. Ainsi, différentes constructions avec une délétion plus ou moins importante pour les différents domaines de MTM1 seront utilisées en GST « pull down » avec le domaine SH3 de BIN1.

### 2. Lien via les phosphoinositides ?

Une autre hypothèse serait que cette interaction de MTM1 et de BIN1 pourrait être guidée par les phosphoinositides comme cela semble déjà être le cas pour BIN1 et la dynamine 2. En effet, BIN1 semble devoir dans un premier temps, interagir avec le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> afin de pouvoir retrouver une conformation « ouverte » et avoir son domaine SH3 libre pour se lier alors au domaine PRD de la dynamine 2.

Plusieurs cas de figure peuvent alors être envisagés. Dans un premier temps, nous savons que la myotubularine est une phosphatase à phosphoinositides qui déphosphoryle le phosphate en position 3 des phosphoinositides. De plus, la protéine BIN1 est capable de lier le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> via son domaine PI, voir de lier le PtdIns(4)P (Lee, Marcucci et al. 2002). Nous pourrions donc supposer que la myotubularine déphosphorylerait le PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> et/ou le PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> afin de produire du PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> et/ou du PtdIns(4)P respectivement. Ainsi, la myotubularine permettrait le recrutement de BIN1 au niveau des membranes qui contiennent ces deux PIs, comme cela a été montré. Néanmoins, cette hypothèse semble peu probable, car la myotubularine a été longuement étudiée et il en ressort que la myotubularine est une phosphatase à PtdIns(3)P et à PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> uniquement.

Sachant que la myotubularine utilise comme substrat le PtdIns(3)P et le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> en produisant respectivement le PtdIns et le PtdIns(5)P, l'un de ces quatre phosphoinositides pourraient lier BIN1 et/ou la dynamine 2.

## Discussion

---

Comme décrit auparavant, il semblerait que d'autres phosphoinositides, que le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, puissent lier dans une moindre mesure ce domaine PI de BIN1. En effet, dans la première étude montrant la liaison du PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> avec ce domaine lors de la formation des tubules-T dans le muscle squelettique, Lee et collègues ont aussi montré que ce domaine est capable de lier le PtdIns(4)P presque aussi fortement et dans une moindre mesure le PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> et le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> (Lee, Marcucci et al. 2002). Bien que MTM1 ne soit pas capable d'interagir avec les deux phosphoinositides principaux qui se lient au domaine PI, soit le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> et le PtdIns(4)P, il semble qu'un premier lien entre MTM1 et BIN1 via les phosphoinositides soit mis en avant avec ce PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>.

Nous pourrions donc envisager que les substrats ou les produits de MTM1 puissent lier le domaine PI de BIN1 (ce qui est le cas pour le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> d'après (Lee, Marcucci et al. 2002).

Et en effet, les travaux de l'équipe de Nicolas Charlet-Berguerand semblent montrer que ce domaine PI est capable de se lier fortement avec le PtdIns(3)P et le PtdIns(5)P (publication en préparation). Anne Sophie Nicot de l'équipe de Jocelyn Laporte avait obtenu des résultats similaires en plus d'une liaison au PtdIns(4)P et au PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> (données personnelles non publiées). Ainsi MTM1 et BIN1 pourraient être reliées entre elles via le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>, le PtdIns(5)P et le PtdIns(3)P. Pourtant dans nos résultats nous n'avons pas pu identifier le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> préalablement identifié comme le phosphoinositide liant le domaine PI de BIN1 (Lee, Marcucci et al. 2002). Cette différence pourrait être expliquée soit par les isoformes étudiées soit par les techniques utilisées. Ayant déjà discuté des choix des isoformes et des techniques dans un chapitre précédent je ne reviendrai pas sur ce sujet.

Toutefois, les deux résultats sont discutables et nous pouvons donc émettre des réserves sur les résultats que nous avons obtenus. Pourtant, les travaux de Lee et collègues n'incluaient pas le PtdIns(3)P, il faudrait confirmer nos travaux pour affirmer que ce phosphoinositide pourrait être un interacteur du domaine PI de BIN1 (Lee, Marcucci et al. 2002). Cette hypothèse est encore plus probable dans le cas du PtdIns(5)P puisque, même si ce phosphoinositide n'avait pas été testé dans l'étude de Lee et collègues, nous l'avons testé via deux techniques différentes, ce qui semble suffisant pour affirmer qu'il existe bien une interaction entre BIN1 et le PtdIns(5)P.

En conclusion, le domaine PI de BIN1 semble pouvoir être capable de lier une plus grande variété de phosphoinositides que cela était suggéré auparavant. Il ne semble pas

## Discussion

---

impossible aujourd'hui que ce domaine PI puisse lier d'autres phosphoinositides au niveau de compartiments cellulaires bien spécifiques à chacun.

Ainsi nous pourrions imaginer que le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> serve à BIN1 pour son recrutement à la membrane plasmique et lui permette ainsi de se mettre sous une conformation « ouverte ». Tandis qu'elle pourrait lier le PtdIns(3)P et le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> au niveau des endosomes précoces et tardifs afin d'être recyclée à la membrane plasmique. Finalement, BIN1 sous sa conformation « ouverte » ou « fermée » pourrait lier le PtdIns(5)P au niveau des tubules-T qu'elle a formé afin de stabiliser ces tubules membranaires, mais aussi au niveau des endosomes tardifs et des corps multivésiculaires afin d'être recyclée à la membrane plasmique (Figure 42).

### **3. Un lien impliquant une interaction directe et les phosphoinositides ?**

D'après tous nos résultats et les différentes études déjà réalisées sur la myotubularine et BIN1, nous pourrions envisager un lien impliquant toutes les voies citées auparavant. En effet, nous pourrions émettre l'hypothèse que MTM1 et BIN1 interagissent dans les cellules musculaires directement via leurs domaines, mais aussi via les phosphoinositides.

Dans ce cas, la myotubularine présente au niveau des endosomes précoces et tardifs permettrait la formation de PtdIns(5)P au niveau des endosomes tardifs et des corps multivésiculaires. L'augmentation de la concentration de PtdIns(5)P permettrait non seulement de concentrer la myotubularine au niveau de ces structures mais aussi de recruter BIN1 à ces endosomes tardifs et ces corps multivésiculaires. BIN1 pourrait alors interagir d'une part avec MTM1 via son domaine SH3 et d'autre part avec le PtdIns(5)P via son domaine PI. Cette double interaction permettrait de recycler BIN1 via les endosomes de tri et la voie de recyclage. Ces deux voies permettraient de recycler BIN1 à la membrane plasmique afin de faciliter et/ou de maintenir les tubules membranaires créés par BIN1 au niveau de cette membrane plasmique. Finalement, BIN1 interagissant avec le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> de la membrane plasmique se retrouverait sous sa conformation « ouverte » et lierait alors la dynamine 2 afin de stabiliser complètement les structures tubulaires créées (Figure 46).

### 4. Un lien dans le muscle squelettique ?

Toutes les études réalisées sur les trois protéines impliquées dans les myopathies centronucléaires ont montré leur implication dans le trafic membranaire. Nous proposons aujourd'hui en plus, que ces protéines soient impliquées dans un même processus dans lequel elles semblent coopérer pour la formation et/ou le maintien de tubules membranaires du muscle squelettique. Les myopathies centronucléaires étant des pathologies qui touchent principalement le muscle squelettique, nous pouvons donc supposer que ces trois protéines coopèrent dans la formation de structures spécifiques des fibres musculaires : les tubules-T. Ces derniers sont des invaginations membranaires qui entrent en jeu dans le processus d'excitation-contraction afin de passer d'un potentiel d'action à une concentration de calcium intracellulaire augmentée qui sert alors à la contraction musculaire en se liant à la troponine C. Cette liaison permet ainsi l'activation ou plutôt la levée d'inhibition et la mise en place des ponts actine-myosine responsable de la contraction.

Dans cette hypothèse, MTM1 pourrait être impliquée dans le recyclage des membranes permettant de produire et/ou de stabiliser les tubules-T et dans le recyclage de BIN1 à la membrane plasmique. La myotubularine pourrait ainsi avoir deux fonctions distinctes dans le muscle squelettique. Dans un premier temps, elle servirait au recyclage des membranes via la voie de recyclage par les endosomes de tri, en se fixant aux endosomes précoces et tardifs via ces deux substrats : le PtdIns(3)P et le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>, qu'elle déphosphorylerait pour former du PtdIns et surtout du PtdIns(5)P, respectivement. Ce dernier phosphoinositide aurait alors deux fonctions. La première pourrait être expliquée grâce à une étude récente sur le rôle de ce phosphoinositide dans le trafic membranaire (Lecompte, Poch et al. 2008). Dans cette étude les auteurs montrent que le PtdIns(5)P produit à partir de MTM1 et du PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> pourrait intervenir dans le recyclage des membranes à partir des endosomes tardifs vers la membrane plasmique. L'autre rôle de ce phosphoinositide serait de concentrer MTM1 aux endosomes tardifs et aux corps multivésiculaires puisqu'il semble impliqué dans la modulation de la fonction même de la myotubularine (Schaletzky, Dove et al. 2003). Ce PI ainsi qu'une grande concentration de MTM1 permettrait de recruter les domaines PI et SH3 de BIN1, respectivement. Puis, BIN1 emprunterait la voie de recyclage via les endosomes de tri. Ainsi BIN1 serait amené à la membrane plasmique où il pourrait jouer son rôle dans la formation des tubules-T, qui se formeraient en plus via l'apport des

## Discussion

---

membranes des endosomes de tri. BIN1 serait donc responsable, probablement via d'autres protéines aussi, de la formation des tubules-T dans les fibres musculaires.

Lors de ce recyclage à la membrane plasmique, BIN1 pourrait alors interagir avec le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, ce qui lui permettrait de se retrouver sous une conformation « ouverte » où le domaine PI n'interagirait plus avec son domaine SH3. BIN1 serait alors capable de recruter la dynamine 2 aux niveaux de ces tubules-T en formation. A ce moment, il semblerait que BIN1 soit capable d'empêcher l'activité de fission de la dynamine 2. En effet, la dynamine 2 est une protéine connue pour être capable de fissionner les tubules et former des vésicules à clathrine. Or dans le muscle squelettique, cette activité de fission semble être largement diminuée voir absente tandis que sa capacité à tubuler semble être largement augmentée. Cette capacité de BIN1 pourrait être due à une diminution de l'activité GTPase et/ou une diminution de l'oligomérisation comme je l'ai déjà expliqué dans un paragraphe précédent. La diminution de l'activité et/ou de l'oligomérisation inhibe la fonction de fission, la dynamine 2 est ainsi capable de stabiliser ces tubules-T formés par BIN1 (Figure 46).

Toutes ces protéines semblent donc impliquées dans le processus de formation et/ou de maintien des tubules-T dans le muscle squelettique.

De plus, ces protéines pourraient avoir d'autres fonctions à des moments précis dans la cellule. En effet, plusieurs isoformes de BIN1 semblent présentes dans le muscle squelettique comme Anne Toussaint et Belinda Cowling l'ont mis en évidence (Nicot, Toussaint et al. 2007; Toussaint, Cowling et al. 2010). Il semblerait qu'il y ait au moins deux isoformes différentes avec ou sans l'exon 17. Cet exon code, avec l'exon 18, pour un domaine spécifique de liaison à la protéine c-Myc. Or la surexpression de BIN1 dans des cellules d'hépatocarcinome HepG2, a mis en évidence une localisation nucléaire de la protéine (Sakamuro, Elliott et al. 1996). Cette localisation nucléaire pourrait être expliquée par la liaison de BIN1 à la protéine c-Myc. En effet, c-Myc est une protéine impliquée dans le processus transcriptionnel. C'est à partir de cette découverte que BIN1 fut décrite comme un suppresseur de tumeur.

Pourtant, notre étude ainsi que deux autres ont démontré que dans les cellules musculaires, où BIN1 est largement surexprimée de façon endogène, la localisation de cette protéine ne semble pas nucléaire (Butler, David et al. 1997; Lee, Marcucci et al. 2002; Nicot, Toussaint et al. 2007). Une des explications serait que cette isoforme musculaire pourrait être capable de permuter entre le cytoplasme et le noyau. Le processus régulant cette migration



## Discussion

---

pourrait être en réponse à des signaux cellulaires qui doivent encore être identifiés (Butler, David et al. 1997). A la suite de ces signaux cellulaires, les différentes isoformes de BIN1 présentes à la membrane plasmique au niveau des tubules-T doivent donc être internalisées. Une des explications à ce phénomène d'internalisation pourrait être la liaison du domaine PI au PtdIns(3)P. En effet, le PtdIns(3)P est impliqué dans la formation des endosomes précoces et ce phosphoinositide peut être déphosphorylé par la myotubularine au niveau de ces endosomes précoces, ce qui permettrait de libérer BIN1 dans le cytoplasme. A ce moment l'isoforme de BIN1 contenant l'exon 17 et plus particulièrement le domaine de liaison à c-Myc serait capable de se lier à c-Myc qui suite à des signaux est capable d'être relocalisée dans le noyau où elle pourrait entraîner avec elle BIN1 (Figure 42).

Enfin, il est à noter que cette voie ne semble pas avoir lieu dans le muscle cardiaque. Nous avons montré qu'il n'existe pas d'isoforme contenant l'exon 11 de l'amphiphysine 2 dans le muscle cardiaque (Nicot, Toussaint et al. 2007), mais qu'il existe une isoforme sans exon 11 mais contenant l'exon 17 codant pour le domaine MBD de liaison à la protéine c-Myc.

Dans le muscle cardiaque, les tubules-T et l'organisation des protéines du réticulum sarcoplasmique ne semblent donc pas être contrôlés de la même façon que dans le muscle squelettique, ce qui pourrait être lié à l'absence d'isoforme contenant l'exon 11.

### 5. Perspectives

Dans un premier temps, il serait nécessaire de définir quel est le domaine de MTM1 qui interagit avec le domaine SH3 de BIN1. Pour cela, des tests de GST « pull down » pourraient être facilement effectués puisque nous possédons déjà plusieurs constructions des différents domaines de MTM1, tous fusionnés à la GST.

Nous pourrions aussi chercher à observer la localisation de BIN1 dans des cellules et plus particulièrement au niveau des compartiments endosomaux, dans des cellules musculaires en absence de MTM1. Comme nous possédons plusieurs lignées de cellules musculaires déficientes en MTM1, nous pourrions donc mener ces expériences rapidement.

### **B. Impact sur la physiopathologie des CNM**

MTM1, BIN1 et DNM2 semblent donc impliquées dans un même processus de formation et/ou de maintien des tubules-T dans le muscle squelettique. Deux études récentes semblent confirmer notre hypothèse (Al-Qusairi, Weiss et al. 2009; Toussaint, Cowling et al. 2010). En effet, l'analyse de biopsies musculaires de patients atteints de XLCNM (mutations dans MTM1) ainsi que le modèle souris KO-mtm1, ont révélé des anomalies de tubules-T (Al-Qusairi, Weiss et al. 2009). Les tubules-T présentent une orientation longitudinale au lieu d'une orientation transversale et ils semblent parfois absents au niveau des triades. D'autre part, l'analyse de biopsies musculaires de patients atteints d'ARCNM et d'ADCNM (mutations dans BIN1 et dans DNM2 respectivement) montre aussi une réorganisation des tubules-T et des triades avec une orientation longitudinale au lieu d'une orientation transversale (Toussaint, Cowling et al. 2010). Tous ces résultats semblent donc en accord avec l'hypothèse selon laquelle ces trois protéines impliquées dans les CNM sont toutes retrouvées dans le mécanisme de formation et/ou de maintien des tubules-T dans le muscle squelettique. Dans ce cas, comprendre les mécanismes déficients qui mènent à ces pathologies invalidantes pourrait permettre de mieux les traiter.

#### **1. La myotubularine : une spécificité de fonction ou d'expression**

La myotubularine fut la première protéine identifiée comme impliquée dans la forme sévère des myopathies centronucléaires appelées à l'époque myopathies myotubulaires (Laporte, Hu et al. 1996). Depuis cette identification plus de 200 mutations différentes et variées (faux-sens, non-sens, délétion, insertion) ont été répertoriées. Pourtant, dans 91 % des cas, comme nous l'avons vu précédemment, ces mutations mènent à une diminution, presque à chaque fois totale, de la protéine. Si la protéine est perdue, plusieurs impacts peuvent apparaître et dans le cas de mutations dans la myotubularine chez les patients atteints de la forme XLCNM, plusieurs hypothèses peuvent être émises.

Dans un premier temps, la liaison directe entre MTM1 et BIN1 ne pourra plus se faire, BIN1 ne pouvant donc plus être recrutée au niveau des endosomes tardifs et des corps multivésiculaires. Cette conséquence pourrait aussi avoir lieu dans le cas où l'interaction entre

## Discussion

---

MTM1 et BIN1 se feraient via les phosphoinositides et plus particulièrement via le PtdIns(5)P. En effet, une absence de MTM1 résulterait en une augmentation du PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> et une diminution du PtdIns(5)P dans les fibres musculaires, au niveau des endosomes tardifs. Le transport membranaire et le recyclage de BIN1 des endosomes tardifs vers la membrane plasmique pourraient donc être affectés. En effet, BIN1 serait dans l'incapacité de se lier aux endosomes tardifs via son domaine SH3 pour MTM1 directement ou via son domaine PI pour le PtdIns(5)P. BIN1 serait dans ce cas dans l'incapacité de se retrouver à la membrane plasmique pour y fixer le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> et la dynamine 2. La formation des tubules-T grâce à la courbure et à la tubulation membranaires de BIN1 et de la DNM2 conjuguées seraient donc fortement altérée.

De plus, il se pourrait que même si BIN1 arrivait tout de même à se lier au PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> de la membrane plasmique, BIN1 pourrait être internalisée de façon excessive puisqu'elle semble capable de lier le PtdIns(3)P, qui est impliqué dans l'endocytose au niveau des endosomes précoces. Or en l'absence de MTM1, ce PtdIns(3)P serait présent en excès dans les fibres musculaires des patients.

Pourtant plusieurs questions subsistent encore, auxquelles je vais tenter de répondre. Tout d'abord, il est assez étonnant que le muscle squelettique soit principalement touché chez les patients atteints de la forme XLCNM puisque la myotubularine est une protéine ubiquitairement exprimée dans l'organisme. En fait, comme je l'ai expliqué dans mon introduction la myotubularine fait partie de la grande famille des myotubularines qui compte 14 membres dont MTM1 chez l'homme. Parmi ces membres, on retrouve des protéines actives, qui sont capables de déphosphoryler les mêmes substrats que MTM1 et des protéines inactives qui semblent plutôt collaborer avec les protéines actives en se liant à celles-ci. MTM1 est une protéine active et son plus proche homologue MTMR2 est principalement exprimé dans le tissu nerveux. Ainsi MTMR2 pourrait compenser la perte de MTM1 dans les tissus nerveux en remplissant les fonctions de MTM1 dans ce tissu, telles que sa fonction de déphosphorylation du PtdIns(3)P et du PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>. Il pourrait en être de même dans les autres tissus, grâce à d'autres membres de la famille de myotubularines. Cette hypothèse fut vérifiée dans le poisson zèbre où l'injection de MTMR2 et de MTMR1 dans des poissons zèbres KO pour MTM1 permettent de corriger la perte de fonction de MTM1 dans le muscle squelettique (Dowling, Vreede et al. 2009).

Une autre hypothèse pourrait être la formation d'un hétérodimère spécifique du muscle squelettique entre la myotubularine MTM1 et une phosphatase morte. L'absence de

## Discussion

---

MTM1 empêcherait cet hétérodimère de se créer et amènerait à un phénotype musculaire. La deuxième protéine impliquée dans cet hétérodimère pourrait être MTMR12, puisque Nandurkar et collègues l'ont identifiée comme possible interacteur de MTM1 (Nandurkar, Layton et al. 2003).

Pourtant, dans le muscle squelettique, une autre phosphatase à phosphoinositides a été découverte il y a peu de temps : hJUMPY (Tosch, Rohde et al. 2006). Cette phosphatase est la plus proche phosphatase à phosphoinositides de la famille des myotubularines. J'ai discuté plus amplement de notre décision de ne pas inclure cette protéine dans la famille des myotubularines dans la revue d'introduction. En effet, hJUMPY comporte le même site actif que MTM1 mais c'est l'unique domaine qu'elle partage avec cette famille.

Cette phosphatase est capable de déphosphoryler le PtdIns(3)P ainsi que le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> tout comme MTM1. Pourtant, son expression au cours de la myogenèse est différente de celle de la myotubularine. En effet, hJUMPY semble plutôt impliquée dans les cinq premiers jours de la différenciation des cellules musculaires puis son activité semble diminuée. Tandis, qu'au contraire, MTM1 semble avoir une activité beaucoup plus forte au neuvième jour de la différenciation (Tosch, Rohde et al. 2006). Pourtant, même s'il semble qu'il existe une autre phosphatase à phosphoinositides dans le muscle squelettique, hJUMPY ne peut pas compenser la perte de MTM1 dans le muscle tandis que les autres membres de la famille des myotubularines pourraient compenser cette perte dans les autres tissus, d'où la présence d'un phénotype musculaire chez les patients atteints de XLCNM. En effet, une récente étude a démontré que chez le KO MTM1 de poissons zèbres, l'ajout de hJUMPY ne pouvait pas compenser la perte de MTM1 contrairement aux deux myotubularines les plus proches de MTM1 : MTMR1 et MTMR2 (Dowling, Vreede et al. 2009).

Une autre question peut être posée : Pourquoi les tubules-T des patients n'ont pas totalement disparu si MTM1 est la première protéine impliquée dans la formation/le maintien des tubules-T ?

Nous pouvons supposer que BIN1, malgré l'absence de MTM1, puisse toujours être recrutée à la membrane plasmique soit par d'autres protéines soit via le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> qui n'est pas touché par l'absence de MTM1. De plus, même si hJUMPY n'est pas capable de compenser les phénotypes musculaires observés chez les poissons zèbres, elle est tout de même capable de produire du PtdIns(5)P via son activité phosphatase. BIN1 pourrait donc

## Discussion

---

être recrutée, mais de façon moindre, au niveau des endosomes tardifs et participer ainsi à la voie de recyclage vers la membrane plasmique. Pourtant, il est à noter que dans le cas des patients XLCNM, BIN1 semble être plus spécifiquement exprimée de façon diffuse dans les fibres musculaires des biopsies de patients atteints de la forme XLCNM (Toussaint, Cowling et al. 2010). Cette expression diffuse pourrait refléter le manque de recrutement au niveau des endosomes tardifs par un manque de PtdIns(5)P et par le fait que le domaine PI puisse lier le PtdIns(3)P qui est plus présent au niveau des endosomes précoces et des endosomes tardifs du fait que MTM1 soit absente. hJUMPY ayant été montrée comme utilisant préférentiellement le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> pour produire du PtdIns(5)P par rapport au PtdIns(3)P, il se peut qu'il y ait du PtdIns(5)P formé mais en plus petite quantité et qu'il y ait trop de PtdIns(3)P dans la cellule par rapport aux fibres musculaires d'individus sains (Figure 47) (Romero-Suarez, Shen et al. 2010).

La dernière question restante serait : que se passe-t-il dans les 9% des cas où MTM1 n'est pas absente ?

En effet, dans ma partie résultats, j'ai mentionné deux types de mutations qui ne semblent pas être responsables d'une diminution de MTM1. La première mutation est une délétion d'une glycine en position 294 (p.delG294), sans changement du cadre de lecture. Cette délétion pourrait être trop minime pour causer la perte de la protéine. Pourtant, cette délétion apparaissant dans le site catalytique de la myotubularine, elle pourrait toutefois avoir un impact sur l'activité de la myotubularine. De plus, l'acide aminé touché, la glycine n'a pas de chaîne latérale et elle est donc le seul acide aminé à ne pas avoir de pouvoir rotatoire puisque son carbone en position  $\alpha$  n'est pas substitué de façon asymétrique. Or dans ce site catalytique vient se fixer les substrats de MTM1, le PtdIns(3)P et le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>. La délétion de cette glycine pourrait empêcher soit les deux soit l'un de ces substrats de venir se fixer. Ces deux caractéristiques de la glycine pourraient donc être handicapantes lorsque celle-ci est absente.

La deuxième mutation est un missense p.Ser376Asn. Elle se trouve dans le motif essentiel et caractéristique des PTPs : CX5R (CSDGWDR chez MTM1). La sérine et l'asparagine étant deux acides aminés polaires, il se pourrait que ce changement ne déstabilise pas suffisamment la myotubularine pour diminuer son niveau cellulaire, mais ce changement se situant juste dans le site actif, il pourrait impacter sur la fonction de déphosphorylation de MTM1.

## Discussion

---

Dans ces deux cas, la fonction de déphosphorylation de MTM1 pourrait être touchée, la production de PtdIns(5)P pourrait donc diminuer dans la cellule, ce qui aurait pour conséquence une diminution du recrutement de BIN1 aux endosomes tardifs et aux corps multivésiculaires et donc une diminution du recyclage de BIN1 vers la membrane plasmique. Tandis qu'on observerait une augmentation du PtdIns(3)P et donc une augmentation de l'internalisation de BIN1 (Figure 47).

Dans tous les cas, il se pourrait donc que BIN1 soit mal recyclée vers la membrane plasmique ce qui pourrait expliquer les défauts dans la structure des tubules-T et des triades observés chez les patients atteints de la forme XLCNM. De plus, BIN1 pourrait être internalisée de façon excessive via l'augmentation de PtdIns(3)P dans la cellule. C'est pourquoi une localisation anormalement cytoplasmique de BIN1 est observée dans les biopsies musculaires de patients atteints de XLCNM (Figure 47) (Toussaint, Cowling et al. 2010).

### **2. Mutations de BIN1 : impact sur la physiopathologie**

Nous avons montré dans deux études différentes, que l'isoforme musculaire de l'amphiphysine 2, BIN1, est impliquée dans deux types de maladies invalidantes : la forme autosomique récessive des myopathies centronucléaires et les dystrophies myotoniques de type 1 et 2 (Nicot, Toussaint et al. 2007) (Hammer et al., publication en cours). Nous avons observé que les mutations responsables de l'une ou l'autre de ces maladies n'étaient pas les mêmes. Dans le cas des dystrophies myotoniques, les patients atteints ont une isoforme musculaire de BIN1 mal épissée qui ne contient plus l'exon 11 spécifique de cette isoforme. Tandis que les patients atteints d'ARCNM, peuvent présenter des mutations missense dans le domaine BAR ou des mutations non-sens dans le domaine SH3 de cette isoforme musculaire, mais aucune mutation n'a pour le moment été identifiée dans le domaine PI spécifique du muscle squelettique.



## Discussion

---

### a. Les myopathies centronucléaires autosomiques récessives

Dans notre hypothèse sur un possible lien entre les trois protéines impliquées dans les myopathies centronucléaires, nous avons placé BIN1 au centre de ce lien. Ainsi lorsque BIN1 est retrouvée mutée chez des patients ARCNM, MTM1 est toujours présente et ne devrait pas être affectée par les mutations de BIN1 puisqu'elle se trouve en amont. MTM1 doit donc être capable de jouer son rôle de 3-phosphatase et convertir le PtdIns(3)P en PtdIns au niveau des endosomes précoces et le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> en PtdIns(5)P au niveau des endosomes tardifs et des corps multivésiculaires. Les mutations de BIN1 dans le cas des myopathies centronucléaires n'affectent pas le domaine PI de cette protéine, elle peut donc logiquement toujours être recrutée par le PtdIns(5)P au niveau des endosomes tardifs et des corps multivésiculaires et être recyclée vers la membrane plasmique.

Deux cas se présentent, puisque soit le domaine BAR est muté soit le domaine SH3 est muté. Je commencerais par discuter des mutations du domaine SH3 puisque ce domaine est impliqué dans la liaison avec d'autres protéines et que mes résultats semblent l'impliquer dans la liaison avec MTM1. Dans un deuxième temps, je discuterai de l'impact probable des mutations du domaine BAR.

Les mutations du domaine SH3 semblent avoir plusieurs conséquences d'après nos résultats. En effet, nous avons mis en évidence une diminution du recrutement de la dynamine 2 aux tubules membranaires formés par la surexpression de BIN1 dans des cellules en culture (Nicot, Toussaint et al. 2007). Nous avons alors pensé que la principale cause du phénotype observé chez les patients ayant une mutation dans ce domaine SH3 était la diminution du recrutement de la dynamine 2. Pourtant, l'étude que j'ai réalisé par la suite sur une nouvelle mutation identifiée dans ce domaine, la mutation p.Q573X ainsi que sur l'ancienne mutation identifiée, p.K575X, semblent plutôt indiquer qu'elles sont responsables d'un changement dans la conformation de la protéine, sans affecter son niveau d'expression. En effet, dans le cas de ces mutations, la protéine BIN1 semble se retrouver dans une conformation « ouverte » sans avoir besoin de lier le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> préalablement, comme une récente étude l'avait montré pour la protéine sauvage (Kojima, Hashimoto et al. 2004). La conséquence de cette conformation « ouverte » pourrait être que BIN1 soit alors capable de lier des protéines à domaine PRD en continu sans avoir besoin d'être régulée par sa liaison au PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. Le site de liaison du domaine PI au domaine SH3 et du domaine PRD de la dynamine 2 avec ce

## Discussion

---

même domaine SH3 se chevauchant en grande partie, cette conséquence ne peut donc pas être appliquée dans le cas de la dynamine 2. En effet, nous avons observé dans les cellules en culture et par des expériences d'interaction que le recrutement de la dynamine 2 est presque totalement aboli (Nicot, Toussaint et al. 2007). En revanche, cela pourrait être le cas pour d'autres protéines à domaine PRD telles que la synaptojanine, qui pourrait venir se fixer en continu à BIN1.

Il est toutefois surprenant d'observer que ces mutations ont un impact sur la liaison au domaine PI et à la dynamine 2. En effet, le site de liaison au domaine PI et à la dynamine se retrouve dans la partie N-terminale du domaine SH3 tandis que les mutations se retrouvent dans la partie C-terminale de ce domaine. Une explication à ce phénomène semble venir du fait qu'une boucle située en C-terminale du domaine SH3 est capable d'interagir avec une séquence située en N-terminale du domaine. Les mutations stop de ce domaine SH3 empêcheraient donc le repliement correct de cette boucle sur la région N-terminale et pourraient ainsi cacher le site de liaison de la dynamine 2.

La conformation « fermée » de BIN1, dans laquelle le domaine SH3 interagit avec le domaine PI, ne semble pas être un obstacle à la liaison de MTM1 au domaine SH3 de BIN1. En effet j'ai montré *in vitro* que MTM1 était capable d'interagir avec BIN1 entière alors que cela n'est pas le cas pour la dynamine 2. Cependant, il reste à savoir si ces mutations du domaine SH3 ont un impact sur le lien direct entre BIN1 et MTM1. Nous pouvons donc nous demander si ces mutations pourraient avoir un impact sur la liaison de MTM1 à ce domaine SH3. Si tel était le cas, il se pourrait alors que BIN1 soit moins bien recruté au niveau des endosomes tardifs et des corps multivésiculaires. Le recyclage de BIN1 se faisant moins bien, ces hypothèses expliqueraient pourquoi les tubules-T chez les patients ARCNM présentent une mauvaise orientation (Figure 48) (Toussaint, Cowling et al. 2010).

Ces hypothèses restent à être confirmées ou infirmées par des études plus poussées sur l'impact des mutations du domaine SH3 sur le lien direct que j'ai identifié entre MTM1 et BIN1.

Les mutations du domaine N-BAR de BIN1 semblent quant à elles, responsables d'un défaut dans la fonction de tubulation des membranes. Nos études montrent que les trois mutations p.Lys35Asn, p.Asp151Asn et p.Arg154Glu sont responsables d'un arrêt de la tubulation des membranes en surexpression dans des cellules en culture.

## Discussion

---

La mutation p.Lys35Asn se trouve dans l'hélice N-terminale située juste avant le domaine BAR de BIN1. Cette hélice amphipatique a pour rôle de déstabiliser la bicouche lipidique en s'y insérant à l'aide de sa face hydrophobe (Peter, Kent et al. 2004). Elle permet d'induire une petite courbure locale qui va par la suite permettre au domaine BAR d'amplifier puis de stabiliser cette courbure afin de tubuler les membranes, via son homodimérisation. Cette mutation p.Lys35Asn remplace un acide aminé hydrophobe par un acide aminé polaire non chargé et surtout hydrophile (Nicot, Toussaint et al. 2007). Il semblerait donc que ce changement d'acide aminé provoque un changement dans la face hydrophobe de cette hélice amphipatique. Cette modification pourrait alors être responsable d'une déstabilisation de cette face hydrophobe qui aurait alors du mal à s'insérer dans la membrane plasmique pour induire un début de courbure. La courbure ne pouvant donc pas se faire, les tubules membranaires qui s'en suivent normalement ne peuvent donc plus se former.

De nombreuses études semblent indiquer que cette hélice est importante mais pas essentielle pour la tubulation des membranes (Peter, Kent et al. 2004; Arkhipov, Yin et al. 2009). Cependant, une récente étude semble en accord avec nos résultats. En effet, dans cette dernière, Löw et collègues en réalisant la structure par RMN de cette hélice ont montré qu'elle était importante pour l'induction et la tubulation en elle-même (Low, Weininger et al. 2008).

Les deux mutations du domaine BAR, p.Asp151Asn et p.Arg154Glu, sont situées au niveau de la région nécessaire à l'ancrage du domaine BAR à la membrane plasmique. Nos résultats montrent qu'en surexpression dans des cellules, ces mutations abolissent presque totalement la fonction de tubulation de ce domaine BAR, suggérant que ce domaine muté est dans l'incapacité de se positionner correctement au niveau de la membrane plasmique.

Il semble d'après nos résultats, que l'hélice amphipatique et le domaine BAR soient nécessaires pour la tubulation des membranes. Dans le cas des mutations du domaine N-BAR nous avons observé que ces mutants étaient encore capable de tubuler en partie les membranes. En effet, nous avons remarqué la formation de petits tubules membranaires. Ces petits tubules semblent plus nombreux pour les mutants du domaine BAR que pour le mutant de l'hélice amphipatique. Il semblerait donc que cette hélice soit plus importante pour la tubulation membranaire qu'elle ne semble l'être dans la littérature.

Cependant, une étude récente a montré que dans les biopsies musculaires des patients atteints des mutations p.Asp151Asn et p.Arg154Glu, les tubules-T ainsi que les triades ont quelques anomalies mais présentent aussi une organisation correcte (Toussaint, Cowling et al.

## Discussion

---

2010). Il semblerait donc que le phénotype observé chez les patients soit plus modéré que dans les cellules en culture. Une explication reposerait sur le fait que d'autres protéines à domaine BAR pourraient être capables d'induire la courbure et la tubulation nécessaire à la formation des ces tubules-T comme par exemple l'endophiline ou encore des protéines de la famille des « sorting nexin » (SNX) (Masuda, Takeda et al. 2006; Shin, Ahn et al. 2008). Une autre explication serait que BIN1 pourrait former des hétérodimères malgré les mutations, avec d'autres protéines de la famille des protéines à domaine BAR (Figure 49). En effet, il a déjà été montré que BIN1 est capable de former des hétérodimères avec l'amphiphysine 1 et la protéine sorting-nexin 4 (SNX4) (Wigge, Kohler et al. 1997; Leprince, Le Scolan et al. 2003). Ces hétérodimères formés avec BIN1 pourraient alors venir s'insérer dans la membrane plasmique et ainsi compenser ces défauts. Par la suite, BIN1 pourrait alors jouer son rôle en interagissant avec le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> ce qui permettra de libérer son domaine SH3 pour qu'il se lie à la dynamine 2 et ainsi de stimuler la fonction de tubulation de la dynamine 2 en inhibant sa fonction de fission.

Pourtant même si une ou les deux de ces hypothèses se déroulent dans le muscle squelettique chez les patients atteints, cela ne semble pas suffisant. En effet, non seulement les tubules-T et les triades des patients ne sont pas tous normaux mais, en plus, le phénotype des patients démontre bien que la compensation n'est pas totale.

### **b. Les dystrophies myotoniques**

Les dystrophies myotoniques sont des pathologies invalidantes qui ressemblent histologiquement, pour la forme la plus sévère, à la forme XLCNM. Nous avons donc mené une étude en collaboration avec l'équipe de Nicolas Charlet-Berguerand, qui travaille plus spécifiquement sur les dystrophies myotoniques et les défauts d'épissage de gènes dans ces pathologies, au sein de l'IGBMC.

Cette étude a montré que l'épissage du domaine PI de BIN1 chez les patients atteints de dystrophies myotoniques de Steinert et de type 2 ne se faisait pas correctement. Ainsi dans la forme la plus sévère de dystrophie de Steinert, la forme congénitale, l'exon 11 de BIN1 est totalement épissé dans les fibres musculaires des patients, alors que normalement cet exon est spécifique du muscle squelettique. Au contraire, les fibres musculaires des patients atteints

## Discussion

---

des autres formes de dystrophies myotoniques de Steinert et de DM de type 2 présentent une exclusion partielle de ce même exon 11.

Ce gène BIN1 n'est pas le seul gène dont l'épissage alternatif n'est pas correct chez les patients atteints de DM. En effet, les gènes touchés dans ces deux types de dystrophies : les gènes DMPK et ZNF9 pour les formes DM de Steinert et de type 2 respectivement, vont créer des agrégats dans le noyau des cellules, qui vont alors séquestrer des facteurs d'épissage tels que « muscleblind ». Cette séquestration est à l'origine des défauts d'épissage observés. Ainsi, il a été démontré que l'épissage alternatif défectueux des ARN messagers du canal chlore musculaire CLCN1 et du récepteur à l'insuline était responsable de la myotonie et d'une résistance à l'insuline, respectivement, chez les patients (Savkur, Philips et al. 2001; Charlet, Savkur et al. 2002).

L'épissage anormal de BIN1 pourrait donc être responsable de la faiblesse musculaire et/ou de l'anomalie de positionnement des noyaux observés chez les patients. Cette hypothèse pourrait être confirmée par le fait qu'une faiblesse musculaire plus sévère est observée chez les patients atteints de la forme congénitale sévère de dystrophie myotonique de Steinert pour lesquels l'exon 11 y est totalement épissé.

D'après mes résultats, cette exclusion totale influe fortement sur la capacité de tubulation des membranes de BIN1 *in vivo*. De plus, cette isoforme ne semble plus être capable de lier le PtdIns(5)P, comme cela est le cas pour la protéine normale (Figure 50). Il se pourrait donc qu'il y ait un recrutement plus faible de BIN1 à la membrane plasmique puisque BIN1 est incapable de lier les phosphoinositides. Cette hypothèse pourrait expliquer les anomalies d'orientation et de formes des tubules-T observées chez les patients adultes atteints de DM de Steinert.

Enfin, dans le cas des mutations identifiées dans BIN1 chez les patients atteints d'ARCNM, les mutations ne font pas disparaître tout un domaine de la protéine. Au plus, elles sont responsables d'une perte partielle de la fin d'un domaine. Il semble donc normal que l'impact de la disparition d'un domaine entier soit plus important au niveau phénotypique dans le cas de la forme congénitale des DM de Steinert par rapport à la forme ARCNM.

Cette étude a permis d'identifier des anomalies d'épissage dans un gène impliqué dans une autre forme de pathologie que la forme autosomique récessive des myopathies centronucléaires. Dans les deux pathologies, la protéine BIN1 est toujours présente chez les patients mais les mutations retrouvées se situent dans différents domaines et semblent donc

## Discussion

---

toucher différentes fonctions de la protéine. Dans ce cas, nous pourrions nous demander ce qui cause la maladie ? Est-ce le domaine touché, puisque les patients DM sont mutés au niveau du domaine PI de BIN1 tandis que les deux autres domaines BAR et SH3, sont touchés chez les patients ARCNM ? Ou est ce tout simplement le fait que chez les patients DM, tout un domaine est totalement ou partiellement exclu, tandis que chez les patients ARCNM, les mutations semblent avoir un impact moins important.

Afin, de répondre à cette question, il faudrait pouvoir identifier une mutation dans le domaine PI chez un patient ARCNM. Si la mutation amène à la perte de la fonction de cette exon, le phénotype observé chez ces patients devrait être très sévère voir proche du phénotype des patients XLCNM.

### 3. Mutations de DNM2

Dans notre hypothèse de départ, la dynamine 2, qui est mutée dans la forme autosomique dominante des myopathies centronucléaires, est la dernière protéine impliquée dans le processus de formation/maintien des tubules-T dans le muscle squelettique.

Cette protéine est connue pour son implication dans la fission de vésicules, en particulier la fission des tubules membranaires formés par les amphiphysines. Cette capacité de la dynamine à former des vésicules lui permet de participer à de nombreux processus d'endocytose tels que l'endocytose des vésicules de clathrine, ou encore l'endocytose des cavéoles. Afin de comprendre ce mécanisme, de nombreuses études ont été entreprises sur cette protéine et ont montré que la dynamine est capable de former un anneau autour du cou des vésicules en formation. Grâce à l'hydrolyse du GTP, l'énergie en résultant lui permet de resserrer l'anneau formé et provoque ainsi la rupture de la membrane et la libération des vésicules.

La dynamine 2 est une protéine qui a été identifiée comme mutée dans deux types de pathologies invalidantes mais assez différentes. En effet, elle a été caractérisée chez des patients atteints de la forme autosomique dominante des myopathies centronucléaires mais aussi dans une forme intermédiaire dominante de neuropathies de Charcot-Marie-Tooth. Chez les patients atteints de la première maladie, les mutations identifiées sont essentiellement retrouvées dans le domaine intermédiaire et dans le domaine PH de la dynamine 2. Il en est de même pour les mutations identifiées chez les patients atteints de neuropathies de Charcot-



## Discussion

---

Marie-Tooth, où elles sont retrouvées plus particulièrement dans le domaine PH de la dynamine 2 et en un peu moins grand nombre dans le domaine intermédiaire. Si la fonction du domaine PH a été largement étudiée, la fonction du domaine intermédiaire reste encore assez floue. Deux études semblent pourtant impliquer ce domaine intermédiaire dans la cohésion du centrosome (Thompson, Cao et al. 2004) et dans l'oligomérisation de la protéine (McNiven 2005). Tandis que de nombreuses études ont montré que le domaine PH de la dynamine 2 est impliqué dans la liaison de la dynamine 2 aux phosphoinositides et plus particulièrement au PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (Yarar, Surka et al. 2008).

Au début de mon travail, les mutations des patients ADCNM étaient plus spécifiquement retrouvées dans le domaine intermédiaire et les mutations identifiées chez les patients CMT se retrouvaient plus fréquemment dans le domaine PH. Nous voulions donc savoir si suivant le domaine impliqué, différentes fonctions de la dynamine 2 étaient touchées. Cela aurait ainsi pu expliquer pourquoi des patients mutés dans une même protéine pouvaient avoir soit une myopathie soit une neuropathie.

Mes résultats semblent indiquer que les mutations du domaine PH de la dynamine 2 pourraient être responsables d'un défaut d'endocytose tandis que les mutations dans le domaine intermédiaire pourraient être responsables d'un défaut de localisation de la dynamine 2.

Mes résultats sur des défauts d'endocytose des mutations dans le domaine PH semblent confirmés par deux publications récentes. La première a étudié deux types de mutations toutes dans le domaine PH, et toutes concernant des mutations identifiées chez des patients atteints de neuropathie de Charcot-Marie-Tooth (Tanabe and Takei 2009). Une de ces deux mutations se trouve être la même que celle que j'ai étudié. Tanabe et Takei ont ainsi montré que ce mutant est responsable d'un défaut dans l'endocytose de la transferrine. De plus, ils ont également mis en évidence que la deuxième mutation n'est pas responsable d'un défaut d'endocytose mais d'une augmentation significative de la forme acétylée des microtubules (forme stable mais dynamique).

Enfin, dans la deuxième étude, Bitoun et collègues ont montré que trois mutations dans le domaine intermédiaire, le domaine PH et le domaine GED, retrouvées chez des patients atteints d'ADCNM, présentent toutes les trois des défauts d'internalisation de la transferrine (Bitoun, Durieux et al. 2009). Mes travaux sur la même mutation dans le domaine intermédiaire semblent plutôt montrer qu'il n'y a pas d'impact sur l'internalisation de la transferrine et Catherine Koch de l'équipe de Jocelyn Laporte, qui a continué cette étude des

## Discussion

---

mutants de la dynamine 2, a trouvé une petite diminution de l'endocytose de la transférine en utilisant la technique du FACS. Les différences, dont j'ai déjà discuté auparavant, que nous avons observé avec Bitoun et collègues peuvent être dues à la différence de temps de surexpression dans les cellules en culture (Bitoun, Durieux et al. 2009).

Il semblerait donc que la mutation p.Lys562Glu identifiée chez un patient DI-CMT soit responsable d'un défaut d'internalisation et donc d'un défaut d'endocytose (Figure 51). Pour les autres mutations, de nouvelles études restent à être menées pour pouvoir conclure quant à leur réel impact.

Catherine Koch, en poursuivant ces travaux sur l'impact des mutations de la dynamine 2, semble avoir trouvé un impact au niveau de la localisation de la dynamine 2 aux microtubules pour les mutants retrouvés chez les patients atteints de CNM. Grâce à un lavage permettant de voir la localisation de la dynamine 2 au niveau des microtubules, elle a pu mettre en évidence une localisation anormale de ces mutants CNM alors que les mutants CMT semblent se localiser correctement aux microtubules (Tanabe and Takei 2009).

Il semblerait que suivant la mutation identifiée, différents impacts peuvent se produire, que ce soit pour des mutations identifiées chez des patients ADCNM ou des patients DI-CMT. Cela voudrait donc dire que le domaine touché ne serait pas important pour différencier la myopathie de la neuropathie ni même la fonction de la dynamine 2 touchée.

Ce résultat semble en accord avec une étude récente menée sur les symptômes des patients atteints de myopathies et ceux atteints de neuropathie et tous mutés dans la dynamine 2 (Echaniz-Laguna, Nicot et al. 2007).

En effet, cette étude montre une possible superposition des symptômes d'ADCNM et de DI-CMT, avec une atteinte possible du cerveau chez des patients ADCNM, qui présentent des troubles du système nerveux et périphérique qui sont cependant légers. Ces signes d'atteinte neurologique chez des patients ADCNM avaient déjà été décrits auparavant dans des études cliniques (van Wijngaarden, Fleury et al. 1969; Fischer, Herasse et al. 2006). Ces signes bien que peu sévères semblent plutôt caractéristiques des formes axonales des CMT (CMT2) dans lesquelles sont parfois classés les patients mutés dans la dynamine 2. A l'inverse il semble que les patients atteints de DI-CMT due à des mutations dans la dynamine 2 présentent en plus de leurs symptômes neurologiques, une faiblesse musculaire, mais aucune biopsie musculaire n'a été faite à ce jour chez ces patients afin de vérifier la présence ou non de noyaux centraux.

## Discussion

---

Enfin, il semblerait que comme pour les deux autres formes de myopathies centronucléaires, l'analyse de biopsies musculaires des patients atteints montre des défauts dans l'organisation et la structure des tubules-T et des triades du muscle squelettique (Toussaint, Cowling et al. 2010).

Il semble donc évident que ces trois formes (XLCNM, ARCNM et ADCNM) et, directement ou non, ces trois protéines (MTM1, BIN1 et DNM2) soient impliquées dans la formation et/ou le maintien des tubules-T et des triades dans le muscle squelettique. Notre hypothèse d'une voie moléculaire commune, semble donc se justifier de plus en plus même si de nombreuses études restent à être effectuées pour confirmer cette implication dans la formation/le maintien des tubules-T.

### 4. Perspectives

Dans le cas de la forme XLCNM, il serait important d'identifier les fonctions atteintes lorsque le niveau de la protéine MTM1 n'est pas diminué. En effet, les deux mutations p.delG294 et p.Ser376Asn semblent avoir un niveau de myotubularine égal à celui des individus sains. Comme ces mutations se retrouvent dans le site actif de la myotubularine, j'ai émis l'hypothèse qu'elles pourraient influencer sur l'activité phosphatase de MTM1. Il serait informatif de vérifier cette hypothèse afin de comprendre quels sont les mécanismes déficients chez ces patients, en testant la déphosphorylation des phosphoinositides avec ces deux mutations.

Il serait également important de rechercher des gènes pouvant être des régulateurs de la myotubularine qui seraient responsables des cas dans lesquels aucune mutation ni dans les exons ni dans les introns n'a été trouvée. En effet, notre nouvelle technique de diagnostic pourrait permettre de diminuer à environ 1% le nombre de patients XLCNM dont aucune mutation n'a pu être identifiée dans le gène MTM1. Toutefois la découverte de la cause des cas sans mutation dans le gène MTM1 permettrait de mieux comprendre la maladie et les mécanismes en jeu et serait la première étape indispensable à la mise en place d'éventuelles stratégies thérapeutiques. Cette découverte permettrait de faire un grand pas en avant pour les patients, puisque cette avancée permettrait de poser un diagnostic précis et d'envisager pour les couples à risque, un diagnostic prénatal.

## Discussion

---

Dans le cas de la forme ARCNM, l'identification du premier gène impliqué dans cette forme de myopathies centronucléaires a permis de faire une grande avancée pour le diagnostic des patients. Il a de plus, permis de mieux comprendre les mécanismes en jeu dans les myopathies centronucléaires. Par contre, le peu de mutations identifiées chez les patients ARCNM (environ 10% des patients semblent être mutés dans le gène BIN1), nous laisse supposer qu'un ou plusieurs autres gènes doivent être impliqués dans ces pathologies. La recherche de nouveaux gènes semble donc être une priorité aujourd'hui.

Dans le cas des dystrophies myotoniques, il semble de plus en plus évident que de nombreux gènes ont un épissage alternatif altéré chez ces patients. Cette étude pourrait expliquer la faiblesse musculaire et/ou le positionnement anormal des noyaux chez ces patients.

De plus, la présence de noyaux centraux dans les fibres musculaires chez ces patients DM et chez les patients CNM semble indiquer que les trois protéines, MTM1, BIN1 et DNM2 doivent avoir un rôle prépondérant dans le maintien structural des noyaux des fibres musculaires. Il semble donc important de chercher à mieux comprendre ce phénomène de positionnement des noyaux dans le muscle squelettique.

Dans le cas de la forme ADCNM, de nombreuses études restent à être réalisées. Mes résultats n'ont donné qu'une indication vers de possibles défauts. De nouvelles mutations sont découvertes assez régulièrement chez les patients ADCNM mais aussi chez les patients DI-CMT. Ces mutations semblent toucher aussi bien le domaine intermédiaire que le domaine PH, voir même le domaine GED, dans les deux types de maladie. Il semble que dans les deux pathologies, des superpositions des symptômes aient lieu ce qui pourrait indiquer que les mêmes mécanismes seraient touchés dans ces deux pathologies. Cette hypothèse reste à être vérifiée en étudiant les différentes fonctions connues de la dynamine 2 telles que sa liaison au PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, son activité GTPase ou son oligomérisation, aussi bien dans le cas de mutations retrouvées chez les patients ADCNM que DI-CMT.

### **III. Les myopathies à centralisation des noyaux : pour aller plus loin?**

#### **A. JUMPY et RYR1 : deux nouveaux gènes formant une nouvelle famille de myopathie, proche des myopathies centronucléaires ?**

Les myopathies centronucléaires, dont la myopathie myotubulaire fait partie, semblent être caractérisées par des anomalies dans l'organisation/la formation et/ou le maintien de structures particulières au muscle squelettique : les tubules-T et les triades. De plus, elles semblent caractériser aussi par la présence de noyaux centraux dans la plupart des fibres musculaires des patients atteints.

Pourtant ces caractéristiques ne semblent pas être spécifiques aux myopathies centronucléaires. En effet, comme nous l'avons observé dans l'étude en collaboration avec l'équipe de Nicolas Charlet-Berguerand, les biopsies musculaires de patients atteints de dystrophies myotoniques de Steinert et de type 2 montrent aussi des anomalies des tubules-T et des triades ainsi que des noyaux centraux.

Des mutations/variants dans deux autres gènes, RYR1 et hJUMPY, avaient déjà été identifiées chez des patients dont le diagnostic de myopathies centronucléaires était posé. Cependant, une récente étude semble aujourd'hui remettre en question la classification du gène RYR1 dans les gènes pouvant être impliqué dans les myopathies centronucléaires (Bevilacqua, Monnier et al. 2010; Wilmshurst, Lillis et al. 2010).

Des études sur le poisson zèbre, semblent indiquer que JUMPY pourrait être responsable d'une myopathie plus bénigne que les myopathies centronucléaires. Cette protéine qui est capable de déphosphoryler les mêmes substrats que MTM1 n'est pourtant pas capable de réverser le phénotype observé chez les poissons zèbres KO pour MTM1 tandis que les deux plus proches homologues de la famille de myotubularines, MTMR1 et MTMR2, en sont capables (Dowling, Vreede et al. 2009; Dowling, Low et al. 2010).

D'après toutes les études sur ces deux gènes hJUMPY et RYR1, je propose donc aujourd'hui qu'ils soient considérés comme impliqués dans des myopathies congénitales à noyaux centraux et fassent ainsi partie d'une grande famille de myopathies, que je nommerai

## Discussion

---

les myopathies à centralisation des noyaux. Cette grande famille comporterait aussi les myopathies centronucléaires.

En effet, comme j'en ai discuté dans ma revue ainsi que dans mon introduction, il semblerait que ces deux gènes soient impliqués dans l'homéostasie calcique. De plus, deux très récentes études semblent démontrer l'implication de RYR1 dans ces myopathies avec une diminution plus ou moins forte suivant la mutation de l'expression de RYR1 chez les patients (Bevilacqua, Monnier et al. 2010; Wilmshurst, Lillis et al. 2010). Dans ces deux études, l'analyse histologique de biopsies musculaires de patients semble montrer des caractéristiques communes au CNM, comme la présence de noyaux centraux mais aussi des caractéristiques différentes avec la présence de noyaux internalisés en grande quantité, une forte désorganisation myofibrillaire. Ces études semblent donc considérer que des mutations dans le gène RYR1 mènent à des myopathies ressemblant très fortement phénotypiquement et histologiquement aux myopathies centronucléaires mais avec quelques différences qui permettraient de les classer dans la famille des myopathies congénitales à noyaux centraux.

De récentes études semblent montrer que hJUMPY pourrait être responsable d'une myopathie chez le poisson zèbre et chez la souris et que cette myopathie pourrait être due à une accumulation de  $\text{PtdIns}(3,5)\text{P}_2$  responsable de l'activation continue de la protéine RYR1 (Shen, Yu et al. 2009; Dowling, Low et al. 2010; Romero-Suarez, Shen et al. 2010). Au final, ces mutations, aussi bien chez le poisson zèbre que chez la souris, semblent responsables de défauts dans le mécanisme d'excitation/contraction et de défauts dans la structure des tubules-T et des triades.

Comme le KO de JUMPY chez la souris semble avoir un impact direct sur RYR1 et que d'autres études semblent l'impliquer dans l'autophagie (Vergne, Roberts et al. 2009), j'ai considéré que JUMPY pouvait faire partie de cette nouvelle sous famille de myopathie (Figure 52).

En conclusion, ces cinq protéines, MTM1, BIN1, DNM2, JUMPY et RYR1 semblent toutes impliquées dans le processus d'excitation/contraction et de contrôle de l'homéostasie calcique ainsi que dans le positionnement des noyaux dans les fibres musculaires. Ces anomalies histologiques et physiologiques peuvent être une caractéristique commune aux myopathies à centralisation des noyaux, et certaines caractéristiques comme un nombre plus important de noyaux internalisés dans le cas de mutation dans RYR1, des défauts d'autophagie pour JUMPY peuvent orienter vers tel ou tel gène pour le diagnostic génétique.



### **B. Pourquoi des noyaux centraux dans les myopathies à centralisation des noyaux ?**

L'une des plus anciennes questions posées depuis l'identification des myopathies à centralisation des noyaux concerne la présence de fibres à noyaux centraux. Peu de réponses ont été apportées jusqu'à aujourd'hui, surtout du fait de la complexité et du nombre de protéines pouvant être responsables du positionnement de ces noyaux. Mais aussi parce que lors de la découverte de cette anomalie chez l'homme, les patients présentaient déjà des noyaux centraux et que nous ne pouvions pas savoir à l'époque, si ces noyaux étaient centraux dès la naissance ou non. L'analyse des biopsies musculaires des animaux modèles pour ces pathologies a permis de répondre à quelques questions. En effet, il semblerait que ces noyaux centraux ne soient pas dus à une nécrose excessive dans les fibres musculaires de patients mais seraient probablement dus à un défaut de maintien structural dans les fibres musculaires. Cette hypothèse est étayée par le fait que chez la souris KO pour le gène MTM1 ainsi que chez les chiens labradors qui développent une myopathie centronucléaire autosomique récessive, les biopsies musculaires chez ces animaux sont normales à la naissance et présentent des noyaux centraux après quelques semaines pour la souris et quelques mois pour les labradors.

Une des hypothèses pouvant expliquer ces anomalies de positionnement serait le lien entre les protéines MTM1, BIN1, DNM 2 et le cytosquelette.

En effet, deux études récentes peuvent laisser penser que BIN1 et la dynamine 2 sont en contact indirectement avec le réseau de microtubules (Zuchner, Noureddine et al. 2005; Meunier, Quaranta et al. 2009) et que MTM1 régule et lie directement les filaments intermédiaires (Hnia, Tronchere et al. 2010).

Meunier et collègues ont identifié une interaction entre l'isoforme musculaire BIN1 et la protéine CLIP-170 (Meunier, Quaranta et al. 2009). Le terme de CLIPs pour Cytoplasmic Linker Proteins, ou protéines de lien cytoplasmique, désigne une vaste famille de protéines assurant l'interaction d'organelles avec les microtubules (MTs) (Pierre, Scheel et al. 1992). CLIP-170 fait partie de la sous-famille des protéines nommées +TIP pour « + end microtubules interacting proteins » qui comprend de nombreuses autres protéines telles que EB1 et APC.

Les deux protéines : CLIP-170 et EB1, semblent impliquées dans le positionnement du noyau chez la levure bourgeonnante. En effet, Bim1p et Bik1p, respectivement les

## Discussion

---

orthologues de EB1 et de CLIP-170 chez *S. cerevisiae*, assurent la haute dynamique des MTs, caractéristique de la phase G1 chez la levure bourgeonnante (Berlin, Styles et al. 1990; Schwartz, Richards et al. 1997). En se localisant aux extrémités (+) des MTs, elles assurent le mécanisme de recherche et de capture de sites d'arrimage corticaux. Ces derniers, en interagissant avec les MTs, permettront d'orienter le noyau en direction du bourgeon naissant.

Nous pourrions ainsi imaginer que CLIP-170 puisse être impliquée dans le positionnement périphérique des noyaux au cours de la myogenèse dans le muscle squelettique humain.

La deuxième étude faite par Zuchner et collègues a montré que la surexpression de la dynamine 2 produisait des tubules qui colocalisent avec la tubuline  $\alpha$ , un des principaux composants des MTs. En effet, un microtubule est formé de treize protofilaments de dimères de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$ , reliés par des liaisons non covalentes (Zuchner, Nouredine et al. 2005). De plus, Tanabe et Takei ont montré que la dynamine 2 se localisait au niveau des microtubules après avoir utilisé un lavage stringent sur les cellules (Tanabe and Takei 2009).

La liaison de ces deux protéines aux MTs, pourrait donc expliquer la position périphérique des noyaux dans les fibres musculaires d'individus sains (Figure 53). En effet, le réseau de microtubules subit une réorganisation complète lors de la différenciation musculaire. Ces microtubules sont nucléés au niveau du centre d'organisation des microtubules (MTOC) périnucléaire dans les myoblastes, tandis que ces microtubules nucléés s'étendent tout autour du noyau au cours de la différenciation (Tassin, Maro et al. 1985; Bugnard, Zaal et al. 2005). Les mutations identifiées chez les patients CNM ainsi que les défauts d'épissage de BIN1 chez les patients DM de Steinert et de type 2, pourraient expliquer la position anormalement centrale des noyaux dans les fibres musculaires chez ces patients.

Enfin, une étude récente a montré une interaction directe entre la dynamine 2 et l'actine elle-même (Gu, Yaddanapudi et al. 2010). Dans cette étude, Gu et collègues proposent que l'assemblage de la dynamine 2 puisse se faire via l'interaction de cette dernière avec de petits filaments d'actine. Cet assemblage provoque alors la polymérisation de l'actine via le déplacement de la protéine gelsoline qui recouvre l'actine.

## Discussion

---

Ces données semblent indiquer une nouvelle voie de régulation médiée par les protéines CNM sur les trois familles du cytosquelette et ouvrent ainsi des perspectives intéressantes sur la compréhension des anomalies structurales observées dans le muscle squelettique des patients CNM. Cette nouvelle orientation pourrait approfondir nos connaissances sur les défauts de positionnement des organelles observés chez les patients CNM (répartitions des mitochondries, du réticulum sarcoplasmique etc...).

### IV. CONCLUSION GENERALE

Le but de ma thèse était de comprendre les mécanismes impliqués dans les différentes formes de myopathies centronucléaires ainsi que de rechercher le potentiel lien qui pouvait relier MTM1 aux deux autres protéines impliquées dans ces maladies invalidantes, BIN1 et DNM2.

Le développement d'une nouvelle technique de diagnostic pour les patients atteints de la forme liée au chromosome X de myopathies centronucléaires a permis de faciliter la détection de la myotubularine et donc d'améliorer le diagnostic génétique. De plus, nous avons montré que 91% des mutations dans cette protéine sont responsables d'une diminution de niveau de la myotubularine dans les cellules. Nous avons de plus permis d'identifier une nouvelle mutation intronique jamais identifiée jusqu'à présent, qui permet de proposer la technique de RT-PCR comme la nouvelle technique de diagnostic de routine des XLCNM.

Nous avons aussi identifié un gène muté dans la forme autosomique récessive des CNM, BIN1. Même si d'autres gènes doivent être impliqués dans cette forme puisque pour le moment peu de patients sont mutés dans BIN1, nous avons mieux compris les mécanismes en jeu dans cette forme. En effet, soit le domaine BAR de cette protéine est muté et dans ce cas la tubulation membranaire chez les patients semblent être touchée, soit le domaine SH3 est muté, et la conformation de la protéine et/ou le recrutement de protéines par BIN1 semblent être mise en jeu.

Nous avons également mis en évidence, en collaboration avec l'équipe de Nicolas Charlet-Berguerand, qu'un défaut d'épissage de ce même gène BIN1 pouvait être responsable de la faiblesse musculaire et/ou des anomalies de positionnement des noyaux observés chez les patients atteints de dystrophies myotoniques de Steinert et de type 2.

J'ai aussi étudié quelques mutations identifiées dans le gène DNM2 responsables de la forme autosomique dominante des myopathies centronucléaires et de la forme intermédiaire dominante des neuropathies de Charcot-Marie-Tooth.

Enfin j'ai établi un lien direct entre MTM1 et BIN1 via le domaine SH3 de BIN1. Cette interaction permet ainsi de relier ces trois protéines dans un mécanisme commun qui pourrait être la formation/le maintien des tubules-T dans le muscle squelettique.

## Conclusion générale

---

Cette thèse a permis de cibler le mécanisme déficient dans les CNM et de comprendre certains mécanismes dans les dystrophies myotoniques et les neuropathies de Charcot-Marie-Tooth, mais beaucoup de questions restent posées. En particulier il nous faudra comprendre si la faiblesse musculaire et la désorganisation des fibres musculaires des patients peuvent être reliées à un défaut des tubules-T ou du cytosquelette. Il nous reste également à comprendre pourquoi et comment dans toutes ces pathologies invalidantes, un positionnement centralisé des noyaux apparaît. Enfin tous les gènes à l'origine des CNM n'ont pas été identifiés, il va donc falloir trouver ces gènes et chercher leur implication si elle existe dans la formation des tubules-T.

# BIBLIOGRAPHIE



## BIBLIOGRAPHIE

- Al-Qusairi, L., N. Weiss, A. Toussaint, C. Berbey, N. Messaddeq, C. Kretz, D. Sanoudou, A. H. Beggs, B. Allard, J. L. Mandel, J. Laporte, V. Jacquemond and A. Buj-Bello (2009). "T-tubule disorganization and defective excitation-contraction coupling in muscle fibers lacking myotubularin lipid phosphatase." Proc Natl Acad Sci U S A 106(44): 18763-8.
- Albi, E. and M. P. Viola Magni (2004). "The role of intranuclear lipids." Biol Cell 96(8): 657-67.
- Alonso, A., J. Sasin, N. Bottini, I. Friedberg, I. Friedberg, A. Osterman, A. Godzik, T. Hunter, J. Dixon and T. Mustelin (2004). "Protein tyrosine phosphatases in the human genome." Cell 117(6): 699-711.
- Arkhipov, A., Y. Yin and K. Schulten (2009). "Membrane-bending mechanism of amphiphysin N-BAR domains." Biophys J 97(10): 2727-35.
- Bachinski, L. L., B. Udd, G. Meola, V. Sansone, G. Bassez, B. Eymard, C. A. Thornton, R. T. Moxley, P. S. Harper, M. T. Rogers, K. Jurkat-Rott, F. Lehmann-Horn, T. Wieser, J. Gamez, C. Navarro, A. Bottani, A. Kohler, M. D. Shriver, R. Sallinen, M. Wessman, S. Zhang, F. A. Wright and R. Krahe (2003). "Confirmation of the type 2 myotonic dystrophy (CCTG)n expansion mutation in patients with proximal myotonic myopathy/proximal myotonic dystrophy of different European origins: a single shared haplotype indicates an ancestral founder effect." Am J Hum Genet 73(4): 835-48.
- Balla, A., G. Tuymetova, A. Tsiomenko, P. Varnai and T. Balla (2005). "A plasma membrane pool of phosphatidylinositol 4-phosphate is generated by phosphatidylinositol 4-kinase type-III alpha: studies with the PH domains of the oxysterol binding protein and FAPP1." Mol Biol Cell 16(3): 1282-95.
- Barbosa, J., F. Q. Nutall, W. Kennedy and F. Goetz (1974) "Plasma insulin in patients with myotonic dystrophy and their relatives" Medicine (Baltimore) 53(4): 307-23.
- Batten, F. E. and H. P. Gibb (1909). "Two Cases of Myotonia Atrophica, showing a peculiar Distribution of Muscular Atrophy." Proc R Soc Med 2(Neurol Sect): 32-3.
- Beggs, A.H., J. Bohm, E. Snead, M. Kozlowski, M. Maurer, K. Minor, M.K. Childers, S.M. Taylor, C. Hitte, J.R. Mickelson, L.T. Guo, A.P. Mizisin, A. Buj-Bello, L. Thiriet, J. Laporte and G.D. Shelton (2010) "MTM1 mutation associated with X-linked myotubular myopathy in Labrador Retrievers" Proc Natl Acad Sci U S A 107(33): 14697-702.
- Begley, M. J. and J. E. Dixon (2005). "The structure and regulation of myotubularin phosphatases." Curr Opin Struct Biol 15(6): 614-20.
- Berlin, V., C. A. Styles and G. R. Fink (1990). "BIK1, a protein required for microtubule function during mating and mitosis in *Saccharomyces cerevisiae*, colocalizes with tubulin." J Cell Biol 111(6 Pt 1): 2573-86.
- Berridge, M. J. and R. F. Irvine (1984). "Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction." Nature 312(5992): 315-21.
- Berridge, M. J. and R. F. Irvine (1989). "Inositol phosphates and cell signalling." Nature 341(6239): 197-205.
- Bertini, E., V. Biancalana, A. Bolino, A. Buj Bello, M. Clague, P. Guicheney, H. Jungbluth, W. Kress, A. Musaro, H. Nandurkar, L. Pirola, N. Romero, J. Senderek, U. Suter, C. Sewry, H. Tronchere, C. Wallgren-Pettersson, M. J. Wishart and J. Laporte (2004). "118th ENMC International Workshop on Advances in Myotubular Myopathy. 26-28 September 2003, Naarden, The Netherlands. (5th Workshop of the International Consortium on Myotubular Myopathy)." Neuromuscul Disord 14(6): 387-96.
- Bevilacqua, J. A., N. Monnier, M. Bitoun, B. Eymard, A. Ferreiro, S. Monges, F. Lubieniecki, A. L. Taratuto, A. Laquerriere, K. G. Claeys, I. Marty, M. Fardeau, P. Guicheney, J. Lunardi and N. B. Romero (2010). "Recessive RYR1 mutations cause unusual congenital myopathy with prominent nuclear internalisation and large areas of myofibrillar disorganisation." Neuropathol Appl Neurobiol.
- 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). "Dynamitin 2 mutations cause sporadic centronuclear myopathy with neonatal onset." Ann Neurol 62(6): 666-70.
- 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). "Dynamitin 2 mutations associated with human diseases impair clathrin-mediated receptor endocytosis." Hum Mutat 30(10): 1419-27.

## Bibliographie

---

- 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): 1207-9.
- Bonsch, D., C. Neumann, R. Lang-Roth, O. Witte, A. Lamprecht-Dinnensen and T. Deufel (2003). "PROMM and deafness : exclusion of ZNF9 as the disease gene in DFNA18 suggests a polygenic origin of the PROMM/DM2 phenotype." *Clin Genet* 63(1): 73-5.
- Brosma, J.F. and D.R. Brodie (1969). "Cineradiographic demonstration of pharyngeal area myotonia in myotonic dystrophy patients." *Radiology* 92(1): 104-9 passim.
- Braga, S.E., A. Gerber, C. Meier, A. Weiersmuller, A. Zimmermann, U. Herrmann, S. Liechti and H. Moser (1990). "Severe neonatal asphyxia due to X-linked centronuclear myopathy." *Eur J Pediatr* 150(2): 132-5.
- Brook, J. D., M. E. McCurrach, H. G. Harley, A. J. Buckler, D. Church, H. Aburatani, K. Hunter, V. P. Stanton, J. P. Thirion, T. Hudson and et al. (1992). "Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member." *Cell* 69(2): 385.
- Bugnard, E., K. J. Zaal and E. Ralston (2005). "Reorganization of microtubule nucleation during muscle differentiation." *Cell Motil Cytoskeleton* 60(1): 1-13.
- Buj-Bello, A., F. Fougerousse, Y. Schwab, N. Messaddeq, D. Spehner, C. R. Pierson, M. Durand, C. Kretz, O. Danos, A. M. Douar, A. H. Beggs, P. Schultz, M. Montus, P. Deneffe and J. L. Mandel (2008). "AAV-mediated intramuscular delivery of myotubularin corrects the myotubular myopathy phenotype in targeted murine muscle and suggests a function in plasma membrane homeostasis." *Hum Mol Genet* 17(14): 2132-43.
- Burd, C. G. and S. D. Emr (1998). "Phosphatidylinositol(3)-phosphate signaling mediated by specific binding to RING FYVE domains." *Mol Cell* 2(1): 157-62.
- Butler, M. H., C. David, G. C. Ochoa, Z. Freyberg, L. Daniell, D. Grabs, O. Cremona and P. De Camilli (1997). "Amphiphysin II (SH3P9; BIN1), a member of the amphiphysin/Rvs family, is concentrated in the cortical cytomatrix of axon initial segments and nodes of ranvier in brain and around T tubules in skeletal muscle." *J Cell Biol* 137(6): 1355-67.
- Buxton, J., P. Shelbourne, J. Davies, C. Jones, T. Van Tongeren, C. Aslanidis, P. de Jong, G. Jansen, M. Anvret, B. Riley and et al. (1992). "Detection of an unstable fragment of DNA specific to individuals with myotonic dystrophy." *Nature* 355(6360): 547-8.
- Cao, C., J. Laporte, J. M. Backer, A. Wandinger-Ness and M. P. Stein (2007). "Myotubularin lipid phosphatase binds the hVPS15/hVPS34 lipid kinase complex on endosomes." *Traffic* 8(8): 1052-67.
- Cao, H., F. Garcia and M. A. McNiven (1998). "Differential distribution of dynamin isoforms in mammalian cells." *Mol Biol Cell* 9(9): 2595-609.
- Cao, S., J. Yao, T. J. McCabe, Q. Yao, Z. S. Katusic, W. C. Sessa and V. Shah (2001). "Direct interaction between endothelial nitric-oxide synthase and dynamin-2. Implications for nitric-oxide synthase function." *J Biol Chem* 276(17): 14249-56.
- Chang, M. Y., J. Boulden, J. B. Katz, L. Wang, T. J. Meyer, A. P. Soler, A. J. Muller and G. C. Prendergast (2007). "Bin1 ablation increases susceptibility to cancer during aging, particularly lung cancer." *Cancer Res* 67(16): 7605-12.
- Chanzy, S., M. C. Routon, S. Moretti, C. de Gennes and J. C. Mselati (2003). "[Unusual good prognosis for X-linked myotubular myopathy]." *Arch Pediatr* 10(8): 707-9.
- Charlet, B. N., R. S. Savkur, G. Singh, A. V. Philips, E. A. Grice and T. A. Cooper (2002). "Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing." *Mol Cell* 10(1): 45-53.
- Cheever, M. L., T. K. Sato, T. de Beer, T. G. Kutateladze, S. D. Emr and M. Overduin (2001). "Phox domain interaction with PtdIns(3)P targets the Vam7 t-SNARE to vacuole membranes." *Nat Cell Biol* 3(7): 613-8.
- 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): 583-6.
- Chen, Y. J., P. Zhang, E. H. Egelman and J. E. Hinshaw (2004). "The stalk region of dynamin drives the constriction of dynamin tubes." *Nat Struct Mol Biol* 11(6): 574-5.
- Ching, T. T., D. S. Wang, A. L. Hsu, P. J. Lu and C. S. Chen (1999). "Identification of multiple phosphoinositide-specific phospholipases D as new regulatory enzymes for phosphatidylinositol 3,4, 5-trisphosphate." *J Biol Chem* 274(13): 8611-7.

## Bibliographie

---

- Chow, C. Y., Y. Zhang, J. J. Dowling, N. Jin, M. Adamska, K. Shiga, K. Szigeti, M. E. Shy, J. Li, X. Zhang, J. R. Lupski, L. S. Weisman and M. H. Meisler (2007). "Mutation of FIG4 causes neurodegeneration in the pale tremor mouse and patients with CMT4J." *Nature* 448(7149): 68-72.
- Ciafaloni, E., E. Mignot, V. Sansone, J.E. Hilbert, L. Lin, X. Lin, L.C. Liu, W.R. Pigeon, M.L. Perlis and C.A. Thornton (2008). "The hypocretin neurotransmission system in myotonic dystrophy type 1." *Neurology* 70(3): 226-30.
- Claeys, K.G., T. Maisonobe, J. Bohm, J. Laporte, M. Hezode, N.B. Romero, G. Brochier, M. Bitoun, R.Y. Carlier and T. Stojkovic (2010). "Phenotype of a patient with recessive centronuclear myopathy and a novel BIN1 mutation." *Neurology* 74(6): 519-21.
- Cockcroft, S., A. Ball, A. Fensome, S. Hara, D. Jones, S. Prosser and P. Swigart (1997). "Phosphatidylinositol transfer proteins: an essential requirement in inositol lipid signalling." *Biochem Soc Trans* 25(4): 1125-31.
- Cremona, O., G. Di Paolo, M. R. Wenk, A. Luthi, W. T. Kim, K. Takei, L. Daniell, Y. Nemoto, S. B. Shears, R. A. Flavell, D. A. McCormick and P. De Camilli (1999). "Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling." *Cell* 99(2): 179-88.
- Day, J. W. and L. P. Ranum (2005). "RNA pathogenesis of the myotonic dystrophies." *Neuromuscul Disord* 15(1): 5-16.
- Day, J. W., K. Ricker, J. F. Jacobsen, L. J. Rasmussen, K. A. Dick, W. Kress, C. Schneider, M. C. Koch, G. J. Beilman, A. R. Harrison, J. C. Dalton and L. P. Ranum (2003). "Myotonic dystrophy type 2: molecular, diagnostic and clinical spectrum." *Neurology* 60(4): 657-64.
- De Braekeleer, M. (1991). "Hereditary disorders in Saguenay-Lac-St-Jean (Quebec, Canada)." *Hum Hered* 41(3): 141-6.
- De Camilli, P., A. Thomas, R. Cofield, F. Folli, B. Lichte, G. Piccolo, H. M. Meinck, M. Austoni, G. Fassetta, G. Bottazzo and et al. (1993). "The synaptic vesicle-associated protein amphiphysin is the 128-kD autoantigen of Stiff-Man syndrome with breast cancer." *J Exp Med* 178(6): 2219-23.
- de Gouyon, B. M., W. Zhao, J. Laporte, J. L. Mandel, A. Metzenberg and G. E. Herman (1997). "Characterization of mutations in the myotubularin gene in twenty six patients with X-linked myotubular myopathy." *Hum Mol Genet* 6(9): 1499-504.
- De Luca, A., I. Torrente, M. Mangino, E. Bertini, B. Dallapiccola and G. Novelli (1999). "A novel mutation (R271X) in the myotubularin gene causes a severe myotubular myopathy." *Hum Hered* 49(1): 59-60.
- De Matteis, M. A. and A. Godi (2004). "PI-losing membrane traffic." *Nat Cell Biol* 6(6): 487-92.
- Denu, J.M. and J.E. Dixon (1998). "Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation." *Curr Opin Chem Biol* 2(5): 633-41.
- Di Paolo, G. and P; De Camilli (2006). "Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics." *Nature* 443(7112): 651-7.
- Di Paolo, G., H. S. Moskowitz, K. Gipson, M. R. Wenk, S. Voronov, M. Obayashi, R. Flavell, R. M. Fitzsimonds, T. A. Ryan and P. De Camilli (2004). "Impaired PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> synthesis in nerve terminals produces defects in synaptic vesicle trafficking." *Nature* 431(7007): 415-22.
- Dove, S. K., R. C. Piper, R. K. McEwen, J. W. Yu, M. C. King, D. C. Hughes, J. Thuring, A. B. Holmes, F. T. Cooke, R. H. Michell, P. J. Parker and M. A. Lemmon (2004). "Svp1p defines a family of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate effectors." *Embo J* 23(9): 1922-33.
- Dowling, J. J., S. E. Low, A. S. Busta and E. L. Feldman (2010). "Zebrafish MTMR14 is required for excitation-contraction coupling, developmental motor function and the regulation of autophagy." *Hum Mol Genet* 19(13): 2668-81.
- Dowling, J. J., A. P. Vreede, S. E. Low, E. M. Gibbs, J. Y. Kuwada, C. G. Bonnemann and E. L. Feldman (2009). "Loss of myotubularin function results in T-tubule disorganization in zebrafish and human myotubular myopathy." *PLoS Genet* 5(2): e1000372.
- Downes, C. P., A. Gray and J. M. Lucocq (2005). "Probing phosphoinositide functions in signaling and membrane trafficking." *Trends Cell Biol* 15(5): 259-68.
- 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): 955-9.
- Elliott, K., D. Sakamuro, A. Basu, W. Du, W. Wunner, P. Staller, S. Gaubatz, H. Zhang, E. Prochownik, M. Eilers and G. C. Prendergast (1999). "Bin1 functionally interacts with Myc and inhibits cell proliferation via multiple mechanisms." *Oncogene* 18(24): 3564-73.

## Bibliographie

---

- Ellson, C. D., S. Gobert-Gosse, K. E. Anderson, K. Davidson, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, J. W. Thuring, M. A. Cooper, Z. Y. Lim, A. B. Holmes, P. R. Gaffney, J. Coadwell, E. R. Chilvers, P. T. Hawkins and L. R. Stephens (2001). "PtdIns(3)P regulates the neutrophil oxidase complex by binding to the PX domain of p40(phox)." *Nat Cell Biol* 3(7): 679-82.
- Endtz, L. J. (1983). "[Neurology and photographic illustration in the medical book]." *Rev Neurol (Paris)* 139(6-7): 439-44.
- Fabrizi, G. M., M. Ferrarini, T. Cavallaro, I. Cabrini, R. Cerini, L. Bertolasi and N. Rizzuto (2007). "Two novel mutations in dynamin-2 cause axonal Charcot-Marie-Tooth disease." *Neurology* 69(3): 291-5.
- Fernando, P., J.S. Sandoz, W. Ding, Y. de Repentigny, S. Brunette, J.F. Kelly, R. Kothary and L.A. Megeney (2009). "Bin1 SRC homology 3 domain acts as a scaffold for myofiber sarcomere assembly." *J Biol Chem* 284(40): 27674-86.
- Fischer, D., M. Herasse, M. Bitoun, H. M. Barragan-Campos, J. Chiras, P. Laforet, M. Fardeau, B. Eymard, P. Guicheney and N. B. Romero (2006). "Characterization of the muscle involvement in dynamin 2-related centronuclear myopathy." *Brain* 129(Pt 6): 1463-9.
- Ford, M. G., B. M. Pearse, M. K. Higgins, Y. Vallis, D. J. Owen, A. Gibson, C. R. Hopkins, P. R. Evans and H. T. McMahon (2001). "Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P2 and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes." *Science* 291(5506): 1051-5.
- Fotin, A., Y. Cheng, N. Grigorieff, T. Walz, S. C. Harrison and T. Kirchhausen (2004). "Structure of an auxilin-bound clathrin coat and its implications for the mechanism of uncoating." *Nature* 432(7017): 649-53.
- Gallop, J. L., C. C. Jao, H. M. Kent, P. J. Butler, P. R. Evans, R. Langen and H. T. McMahon (2006). "Mechanism of endophilin N-BAR domain-mediated membrane curvature." *Embo J* 25(12): 2898-910.
- Gaullier, J.M., A. Simonsen, A. D'Arrigo, B. Bremnes, H. Stenmark and R Aasland (1998). "FYVE fingers bind PtdIns(3)P." *Nature* 394(6692): 432-3.
- Ge, K., J. DuHadaway, W. Du, M. Herlyn, U. Rodeck and G. C. Prendergast (1999). "Mechanism for elimination of a tumor suppressor: aberrant splicing of a brain-specific exon causes loss of function of Bin1 in melanoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(17): 9689-94.
- Ge, K., F. Minhas, J. Duhadaway, N. C. Mao, D. Wilson, R. Buccafusca, D. Sakamuro, P. Nelson, S. B. Malkowicz, J. Tomaszewski and G. C. Prendergast (2000). "Loss of heterozygosity and tumor suppressor activity of Bin1 in prostate carcinoma." *Int J Cancer* 86(2): 155-61.
- Gillooly, D. J., I. C. Morrow, M. Lindsay, R. Gould, N. J. Bryant, J. M. Gaullier, R. G. Parton and H. Stenmark (2000). "Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells." *Embo J* 19(17): 4577-88.
- Gold, E. S., N. S. Morrissette, D. M. Underhill, J. Guo, M. Bassetti and A. Aderem (2000). "Amphiphysin II, a novel amphiphysin II isoform, is required for macrophage phagocytosis." *Immunity* 12(3): 285-92.
- Gold, E. S., D. M. Underhill, N. S. Morrissette, J. Guo, M. A. McNiven and A. Aderem (1999). "Dynamin 2 is required for phagocytosis in macrophages." *J Exp Med* 190(12): 1849-56.
- Groh, W. J., M. R. Groh, C. Saha, J. C. Kincaid, Z. Simmons, E. Ciafaloni, R. Pourmand, R. F. Otten, D. Bhakta, G. V. Nair, M. M. Marashdeh, D. P. Zipes and R. M. Pascuzzi (2008). "Electrocardiographic abnormalities and sudden death in myotonic dystrophy type 1." *N Engl J Med* 358(25): 2688-97.
- Gu, C., S. Yaddanapudi, A. Weins, T. Osborn, J. Reiser, M. Pollak, J. Hartwig and S. Sever (2010). "Direct dynamin-actin interactions regulate the actin cytoskeleton." *Embo J* 29(21): 3593-606.
- Hammans, S. R., D. O. Robinson, C. Moutou, C. R. Kennedy, N. R. Dennis, P. J. Hughes and D. W. Ellison (2000). "A clinical and genetic study of a manifesting heterozygote with X-linked myotubular myopathy." *Neuromuscul Disord* 10(2): 133-7.
- Han, J., K. Luby-Phelps, B. Das, X. Shu, Y. Xia, R. D. Mosteller, U. M. Krishna, J. R. Falck, M. A. White and D. Broek (1998). "Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav." *Science* 279(5350): 558-60.
- Harper, P. S., B. G. van Engelen, B. Eymard, M. Rogers and D. Wilcox (2002). "99th ENMC international workshop: myotonic dystrophy: present management, future therapy. 9-11 November 2001, Naarden, The Netherlands." *Neuromuscul Disord* 12(6): 596-9.
- Harper, P. S. Myotonic Dystrophy. Philadelphia : W. B. Saunders (pub.) 2<sup>nd</sup> ed. 1989 (Not available in Pubmed).
- Harris, S., C. Moncrieff and K. Johnson (1996). "Myotonic dystrophy: will the real gene please step forward!" *Hum Mol Genet* 5 Spec No: 1417-23.
- Heckmatt, J. Z., C. A. Sewry, D. Hodes and V. Dubowitz (1985). "Congenital centronuclear (myotubular) myopathy. A clinical, pathological and genetic study in eight children." *Brain* 108 ( Pt 4): 941-64.



## Bibliographie

---

- Helliwell, T. R., I. H. Ellis and R. E. Appleton (1998). "Myotubular myopathy: morphological, immunohistochemical and clinical variation." *Neuromuscul Disord* 8(3-4): 152-61.
- Herman, G. E., M. Finegold, W. Zhao, B. de Gouyon and A. Metzberg (1999). "Medical complications in long-term survivors with X-linked myotubular myopathy." *J Pediatr* 134(2): 206-14.
- Hilpela, P., M. K. Vartiainen and P. Lappalainen (2004). "Regulation of the actin cytoskeleton by PI(4,5)P2 and PI(3,4,5)P3." *Curr Top Microbiol Immunol* 282: 117-63.
- Hinchliffe, K. A. (2001). "Cellular signalling: stressing the importance of PIP3." *Curr Biol* 11(9): R371-2.
- Hnia, K., H. Tronchere, K.K. Tomczak, L. Amoasii, P. Schultz, A.H. Beggs, B. Payraastre, J.L. Mandel and J. Laporte (2010). "Myotubularin controls desmin intermediate filament architecture and mitochondrial dynamics in human and mouse skeletal muscle." *J Clin Invest*.
- Hoffjan, S., C. Thiels, M. Vorgerd, E. Neuen-Jacob, J. T. Epplen and W. Kress (2006). "Extreme phenotypic variability in a German family with X-linked myotubular myopathy associated with E404K mutation in MTM1." *Neuromuscul Disord* 16(11): 749-53.
- Homma, K., S. Kurata and S. Natori (1994). "Purification, characterization, and cDNA cloning of procathepsin L from the culture medium of NIH-Sape-4, an embryonic cell line of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly), and its involvement in the differentiation of imaginal discs." *J Biol Chem* 269(21): 15258-64.
- Huang, S., L. Lifshitz, V. Patki-Kamath, R. Tuft, K. Fogarty and M. P. Czech (2004). "Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-rich plasma membrane patches organize active zones of endocytosis and ruffling in cultured adipocytes." *Mol Cell Biol* 24(20): 9102-23.
- Huet, C., J. F. Ash and S. J. Singer (1980). "The antibody-induced clustering and endocytosis of HLA antigens on cultured human fibroblasts." *Cell* 21(2): 429-38.
- 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-1 regulates actin assembly via Cdc42 and N-WASP." *Nat Cell Biol* 3(10): 927-32.
- Itoh, T., K. S. Erdmann, A. Roux, B. Habermann, H. Werner and P. De Camilli (2005). "Dynamin and the actin cytoskeleton cooperatively regulate plasma membrane invagination by BAR and F-BAR proteins." *Dev Cell* 9(6): 791-804.
- Itoh, T., S. Koshiba, T. Kigawa, A. Kikuchi, S. Yokoyama and T. Takenawa (2001). "Role of the ENTH domain in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding and endocytosis." *Science* 291(5506): 1047-51.
- Jeannet, P. Y., G. Bassez, B. Eymard, P. Laforet, J. A. Urtizberea, A. Rouche, P. Guicheney, M. Fardeau and N. B. Romero (2004). "Clinical and histologic findings in autosomal centronuclear myopathy." *Neurology* 62(9): 1484-90.
- Jefferies, H. B., F. T. Cooke, P. Jat, C. Boucheron, T. Koizumi, M. Hayakawa, H. Kaizawa, T. Ohishi, P. Workman, M. D. Waterfield and P. J. Parker (2008). "A selective PIKfyve inhibitor blocks PtdIns(3,5)P(2) production and disrupts endomembrane transport and retroviral budding." *EMBO Rep* 9(2): 164-70.
- Jones, S.M., K.E. Howell, J.R. Henley, H. Cao and M.A. McNiven (1998). "Role of dynamin in the formation of transport vesicles from the trans-Golgi network." *Science* 279(5350): 573-7.
- Jungbluth, H., C. R. Muller, B. Halliger-Keller, M. Brockington, S. C. Brown, L. Feng, A. Chattopadhyay, E. Mercuri, A. Y. Manzur, A. Ferreira, N. G. Laing, M. R. Davis, H. P. Roper, V. Dubowitz, G. Bydder, C. A. Sewry and F. Muntoni (2002). "Autosomal recessive inheritance of RYR1 mutations in a congenital myopathy with cores." *Neurology* 59(2): 284-7.
- Jungbluth, H., C. Wallgren-Pettersson and J. Laporte (2008). "Centronuclear (myotubular) myopathy." *Orphanet J Rare Dis* 3: 26.
- Jungbluth, H., H. Zhou, C. A. Sewry, S. Robb, S. Treves, M. Bitoun, P. Guicheney, A. Buj-Bello, C. Bonnemann and F. Muntoni (2007). "Centronuclear myopathy due to a de novo dominant mutation in the skeletal muscle ryanodine receptor (RYR1) gene." *Neuromuscul Disord* 17(4): 338-45.
- Kajiho, H., K. Saito, K. Tsujita, K. Kontani, Y. Araki, H. Kurosu and T. Katada (2003). "RIN3: a novel Rab5 GEF interacting with amphiphysin II involved in the early endocytic pathway." *J Cell Sci* 116(Pt 20): 4159-68.
- Kamioka, Y., S. Fukuhara, H. Sawa, K. Nagashima, M. Masuda, M. Matsuda and N. Mochizuki (2004). "A novel dynamin-associating molecule, formin-binding protein 17, induces tubular membrane invaginations and participates in endocytosis." *J Biol Chem* 279(38): 40091-9.
- Kanzaki, M., M. Furukawa, W. Raab and J. E. Pessin (2004). "Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates adipocyte actin dynamics and GLUT4 vesicle recycling." *J Biol Chem* 279(29): 30622-33.
- Kassubek, J., F. D. Juengling, S. Hoffmann, A. Rosenbohm, A. Kurt, K. Jurkat-Rott, P. Steinbach, M. Wolf, A. C. Ludolph, F. Lehmann-Horn, H. Lerche and Y. G. Weber (2003). "Quantification of brain atrophy in

## Bibliographie

---

- patients with myotonic dystrophy and proximal myotonic myopathy: a controlled 3-dimensional magnetic resonance imaging study." *Neurosci Lett* 348(2): 73-6.
- Kim, S. A., P. O. Vacratsis, R. Firestein, M. L. Cleary and J. E. Dixon (2003). "Regulation of myotubularin-related (MTMR)2 phosphatidylinositol phosphatase by MTMR5, a catalytically inactive phosphatase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(8): 4492-7.
- Klarlund, J. K., A. Guilherme, J. J. Holik, J. V. Virbasius, A. Chawla and M. P. Czech (1997). "Signaling by phosphoinositide-3,4,5-trisphosphate through proteins containing pleckstrin and Sec7 homology domains." *Science* 275(5308): 1927-30.
- Klarlund, J. K., L. E. Rameh, L. C. Cantley, J. M. Buxton, J. J. Holik, C. Sakelis, V. Patki, S. Corvera and M. P. Czech (1998). "Regulation of GRP1-catalyzed ADP ribosylation factor guanine nucleotide exchange by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate." *J Biol Chem* 273(4): 1859-62.
- Koenig, J. H. and K. Ikeda (1989). "Disappearance and reformation of synaptic vesicle membrane upon transmitter release observed under reversible blockage of membrane retrieval." *J Neurosci* 9(11): 3844-60.
- Kojima, C., A. Hashimoto, I. Yabuta, M. Hirose, S. Hashimoto, Y. Kanaho, H. Sumimoto, T. Ikegami and H. Sabe (2004). "Regulation of Bin1 SH3 domain binding by phosphoinositides." *Embo J* 23(22): 4413-22.
- Krueger, E. W., J. D. Orth, H. Cao and M. A. McNiven (2003). "A dynamin-cortactin-Arp2/3 complex mediates actin reorganization in growth factor-stimulated cells." *Mol Biol Cell* 14(3): 1085-96.
- Kutateladze, T. G., K. D. Ogburn, W. T. Watson, T. de Beer, S. D. Emr, C. G. Burd and M. Overduin (1999). "Phosphatidylinositol 3-phosphate recognition by the FYVE domain." *Mol Cell* 3(6): 805-11.
- Lamaze, C., A. Dujeancourt, T. Baba, C. G. Lo, A. Benmerah and A. Dautry-Varsat (2001). "Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway." *Mol Cell* 7(3): 661-71.
- Lamaze, C. and S. L. Schmid (1995). "The emergence of clathrin-independent pinocytic pathways." *Curr Opin Cell Biol* 7(4): 573-80.
- Laporte, J., F. Bedez, A. Bolino and J. L. Mandel (2003). "Myotubularins, a large disease-associated family of cooperating catalytically active and inactive phosphoinositides phosphatases." *Hum Mol Genet* 12 Spec No 2: R285-92.
- Laporte, J., V. Biancalana, S. M. Tanner, W. Kress, V. Schneider, C. Wallgren-Pettersson, F. Herger, A. Buj-Bello, F. Blondeau, S. Liechti-Gallati and J. L. Mandel (2000). "MTM1 mutations in X-linked myotubular myopathy." *Hum Mutat* 15(5): 393-409.
- Laporte, J., F. Blondeau, A. Buj-Bello and J. L. Mandel (2001). "The myotubularin family: from genetic disease to phosphoinositide metabolism." *Trends Genet* 17(4): 221-8.
- Laporte, J., F. Blondeau, A. Buj-Bello, D. Tentler, C. Kretz, N. Dahl and J. L. Mandel (1998). "Characterization of the myotubularin dual specificity phosphatase gene family from yeast to human." *Hum Mol Genet* 7(11): 1703-12.
- Laporte, J., C. Guiraud-Chaumeil, M. C. Vincent, J. L. Mandel, S. M. Tanner, S. Liechti-Gallati, C. Wallgren-Pettersson, N. Dahl, W. Kress, P. A. Bolhuis, M. Fardeau, F. Samson and E. Bertini (1997). "Mutations in the MTM1 gene implicated in X-linked myotubular myopathy. ENMC International Consortium on Myotubular Myopathy. European Neuro-Muscular Center." *Hum Mol Genet* 6(9): 1505-11.
- 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): 175-82.
- Laporte, J., W. Kress and J. L. Mandel (2001). "Diagnosis of X-linked myotubular myopathy by detection of myotubularin." *Ann Neurol* 50(1): 42-6.
- Lauvrak, S. U., M. L. Torgersen and K. Sandvig (2004). "Efficient endosome-to-Golgi transport of Shiga toxin is dependent on dynamin and clathrin." *J Cell Sci* 117(Pt 11): 2321-31.
- Laux, T., K. Fukami, M. Thelen, T. Golub, D. Frey and P. Caroni (2000). "GAP43, MARCKS, and CAP23 modulate PI(4,5)P(2) at plasmalemmal rafts, and regulate cell cortex actin dynamics through a common mechanism." *J Cell Biol* 149(7): 1455-72.
- Le Ber, I., M. Martinez, D. Campion, A. Laquerriere, C. Betard, G. Bassez, C. Girard, P. Saugier-Verber, G. Raux, N. Sergeant, P. Magnier, T. Maisonobe, B. Eymard, C. Duyckaerts, A. Delacourte, T. Frebourg and D. Hannequin (2004). "A non-DM1, non-DM2 multisystem myotonic disorder with frontotemporal dementia: phenotype and suggestive mapping of the DM3 locus to chromosome 15q21-24." *Brain* 127(Pt 9): 1979-92.



## Bibliographie

---

- Lecompte, O., O. Poch and J. Laporte (2008). "PtdIns5P regulation through evolution: roles in membrane trafficking?" Trends Biochem Sci 33(10): 453-60.
- Lee, E. and P. De Camilli (2002). "Dynamin at actin tails." Proc Natl Acad Sci U S A 99(1): 161-6.
- Lee, E., M. Marcucci, L. Daniell, M. Pypaert, O. A. Weisz, G. C. Ochoa, K. Farsad, M. R. Wenk and P. De Camilli (2002). "Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle." Science 297(5584): 1193-6.
- Leprince, C., E. Le Scolan, B. Meunier, V. Fraissier, N. Brandon, J. De Gunzburg and J. Camonis (2003). "Sorting nexin 4 and amphiphysin 2, a new partnership between endocytosis and intracellular trafficking." J Cell Sci 116(Pt 10): 1937-48.
- Leprince, C., F. Romero, D. Cussac, B. Vayssiere, R. Berger, A. Tavitian and J. H. Camonis (1997). "A new member of the amphiphysin family connecting endocytosis and signal transduction pathways." J Biol Chem 272(24): 15101-5.
- Li, S., L. Tiab, X. Jiao, F. L. Munier, L. Zografos, B. E. Frueh, Y. Sergeev, J. Smith, B. Rubin, M. A. Meallet, R. K. Forster, J. F. Hejtmancik and D. F. Schorderet (2005). "Mutations in PIP5K3 are associated with Francois-Neetens mouchetee fleck corneal dystrophy." Am J Hum Genet 77(1): 54-63.
- Lin, C. W., F. Yan, S. Shimamura, S. Barg and S. L. Shyng (2005). "Membrane phosphoinositides control insulin secretion through their effects on ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel activity." Diabetes 54(10): 2852-8.
- Liquori, C. L., K. Ricker, M. L. Moseley, J. F. Jacobsen, W. Kress, S. L. Naylor, J. W. Day and L. P. Ranum (2001). "Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9." Science 293(5531): 864-7.
- Low, C., U. Weininger, H. Lee, K. Schweimer, I. Neundorf, A. G. Beck-Sickinger, R. W. Pastor and J. Balbach (2008). "Structure and dynamics of helix-0 of the N-BAR domain in lipid micelles and bilayers." Biophys J 95(9): 4315-23.
- Lowe, C. U., M. Terrey and L. E. Mac (1952). "Organic-aciduria, decreased renal ammonia production, hydrophthalmos, and mental retardation; a clinical entity." AMA Am J Dis Child 83(2): 164-84.
- Lundmark, R. and S. R. Carlsson (2003). "Sorting nexin 9 participates in clathrin-mediated endocytosis through interactions with the core components." J Biol Chem 278(47): 46772-81.
- Maffucci, T., A. Brancaccio, E. Piccolo, R. C. Stein and M. Falasca (2003). "Insulin induces phosphatidylinositol-3-phosphate formation through TC10 activation." Embo J 22(16): 4178-89.
- Magee, K. R. and G. M. Shy (1956). "A new congenital non-progressive myopathy." Brain 79(4): 610-21.
- Mankodi, A., M.P. Takahashi, H. Jiang, C.L. Beck, W.J. Bowers, R.T. Moxley, S.C. Cannon and C.A. Thornton (2002). "Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of CC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy." Mol Cell 10(1): 35-44.
- Marks, B., M. H. Stowell, Y. Vallis, I. G. Mills, A. Gibson, C. R. Hopkins and H. T. McMahon (2001). "GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis." Nature 410(6825): 231-5.
- Martin, T. F. (1998). "Phosphoinositide lipids as signaling molecules: common themes for signal transduction, cytoskeletal regulation, and membrane trafficking." Annu Rev Cell Dev Biol 14: 231-64.
- Masuda, M., S. Takeda, M. Sone, T. Ohki, H. Mori, Y. Kamioka and N. Mochizuki (2006). "Endophilin BAR domain drives membrane curvature by two newly identified structure-based mechanisms." Embo J 25(12): 2889-97.
- Mathieu, J., M. De Braekeleer and C. Prevost (1990). "Genealogical reconstruction of myotonic dystrophy in the Saguenay-Lac-Saint-Jean area (Quebec, Canada)." Neurology 40(5): 839-42.
- Mattila, P. K., A. Pykalainen, J. Saarikangas, V. O. Paavilainen, H. Vihinen, E. Jokitalo and P. Lappalainen (2007). "Missing-in-metastasis and IRSp53 deform PI(4,5)P<sub>2</sub>-rich membranes by an inverse BAR domain-like mechanism." J Cell Biol 176(7): 953-64.
- Mauco, G., C. A. Dangelmaier and J. B. Smith (1984). "Inositol lipids, phosphatidate and diacylglycerol share stearyl arachidonoylglycerol as a common backbone in thrombin-stimulated human platelets." Biochem J 224(3): 933-40.
- Maurage, C.A., B. Udd, M.M. Ruchoux, P. Vermersch, H. Kalimo, R. Krahe, A. Delacourte and N. Sergeant (2005). "Similar brain tau pathology in DM2/PROMM and DM1/Steinert diseases." Neurology 65(10): 1636-8.
- 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): 939-46.
- McLaughlin, S., J. Wang, A. Gambhir and D. Murray (2002). "PIP(2) and proteins: interactions, organization, and information flow." Annu Rev Biophys Biomol Struct 31: 151-75.

## Bibliographie

---

- McMahon, H. T. and J. L. Gallop (2005). "Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling." *Nature* 438(7068): 590-6.
- McNiven, M. A. (2005). "Dynamin in disease." *Nat Genet* 37(3): 215-6.
- McNiven, M. A., H. Cao, K. R. Pitts and Y. Yoon (2000). "The dynamin family of mechanoenzymes: pinching in new places." *Trends Biochem Sci* 25(3): 115-20.
- 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): 187-98.
- McPherson, P. S., E. P. Garcia, V. I. Slepnev, C. David, X. Zhang, D. Grabs, W. S. Sossin, R. Bauerfeind, Y. Nemoto and P. De Camilli (1996). "A presynaptic inositol-5-phosphatase." *Nature* 379(6563): 353-7.
- 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): 30132-9.
- Mejaddam, A.Y., I. Nennesmo and T. Sejersen (2009). "Severe phenotype of a patient with autosomal recessive centronuclear myopathy due to a BIN1 mutation." *Acta Myol* 28(3): 91-3.
- Mejillano, M., M. Yamamoto, A. L. Rozelle, H. Q. Sun, X. Wang and H. L. Yin (2001). "Regulation of apoptosis by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate inhibition of caspases, and caspase inactivation of phosphatidylinositol phosphate 5-kinases." *J Biol Chem* 276(3): 1865-72.
- Meola, G., V. Sansone, D. Perani, S. Scarone, S. Cappa, C. Dragoni, E. Cattaneo, M. Cotelli, C. Gobbo, F. Fazio, G. Siciliano, M. Mancuso, E. Vitelli, S. Zhang, R. Krahe and R. T. Moxley (2003). "Executive dysfunction and avoidant personality trait in myotonic dystrophy type 1 (DM-1) and in proximal myotonic myopathy (PROMM/DM-2)." *Neuromuscul Disord* 13(10): 813-21.
- Meola, G., Sansone, v., Rotondo, G., Nobile-Orazio, E., Mongini, T., Angelini, C., Toscano, A., Mancuso, M., Siciliano, G., PROMM in Italy : clinical and biomolecular findings. *Acta Myol.* 2: 21-26, 1998 (Not available in PubMed).
- Mettlen, M., T. Pucadyil, R. Ramachandran and S. L. Schmid (2009). "Dissecting dynamin's role in clathrin-mediated endocytosis." *Biochem Soc Trans* 37(Pt 5): 1022-6.
- Meunier, B., M. Quaranta, L. Daviet, A. Hatzoglou and C. Leprince (2009). "The membrane-tubulating potential of amphiphysin 2/BIN1 is dependent on the microtubule-binding cytoplasmic linker protein 170 (CLIP-170)." *Eur J Cell Biol* 88(2): 91-102.
- Michell, R. H. and D. Allan (1975). "Inositol cyclis phosphate as a product of phosphatidylinositol breakdown by phospholipase C (Bacillus cereus)." *FEBS Lett* 53(3): 302-4.
- Michell, R. H., V. L. Heath, M. A. Lemmon and S. K. Dove (2006). "Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate: metabolism and cellular functions." *Trends Biochem Sci* 31(1): 52-63.
- Miller, G., M. Tunnecliffe and P. S. Douglas (1985). "IQ, prognosis and Duchenne muscular dystrophy." *Brain Dev* 7(1): 7-9.
- Mochizuki, Y. and P. W. Majerus (2003). "Characterization of myotubularin-related protein 7 and its binding partner, myotubularin-related protein 9." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(17): 9768-73.
- Monckton, D. G., L. J. Wong, T. Ashizawa and C. T. Caskey (1995). "Somatic mosaicism, germline expansions, germline reversions and intergenerational reductions in myotonic dystrophy males: small pool PCR analyses." *Hum Mol Genet* 4(1): 1-8.
- Morgan, J.E. (1976). "Letter: Preparation of high-dose methotrexate intravenous solutions." *AM J Hosp Pharm* 33(4): 329.
- Muhlberg, A. B., D. E. Warnock and S. L. Schmid (1997). "Domain structure and intramolecular regulation of dynamin GTPase." *Embo J* 16(22): 6676-83.
- Murray, J. T., C. Panaretou, H. Stenmark, M. Miaczynska and J. M. Backer (2002). "Role of Rab5 in the recruitment of hVps34/p150 to the early endosome." *Traffic* 3(6): 416-27.
- Nandurkar, H. H., M. Layton, J. Laporte, C. Selan, L. Corcoran, K. K. Caldwell, Y. Mochizuki, P. W. Majerus and C. A. Mitchell (2003). "Identification of myotubularin as the lipid phosphatase catalytic subunit associated with the 3-phosphatase adapter protein, 3-PAP." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(15): 8660-5.
- Nicot, A. S. and J. Laporte (2008). "Endosomal phosphoinositides and human diseases." *Traffic* 9(8): 1240-9.
- 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): 1134-9.

## Bibliographie

---

- Nicoziani, P., F. Vilhardt, A. Llorente, L. Hilout, P. J. Courtoy, K. Sandvig and B. van Deurs (2000). "Role for dynamin in late endosome dynamics and trafficking of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor." *Mol Biol Cell* 11(2): 481-95.
- 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): 256-61.
- Ochoa, G. C., V. I. Slepnev, L. Neff, N. Ringstad, K. Takei, L. Daniell, W. Kim, H. Cao, M. McNiven, R. Baron and P. De Camilli (2000). "A functional link between dynamin and the actin cytoskeleton at podosomes." *J Cell Biol* 150(2): 377-89.
- Odorizzi, G., D. J. Katzmann, M. Babst, A. Audhya and S. D. Emr (2003). "Bro1 is an endosome-associated protein that functions in the MVB pathway in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Cell Sci* 116(Pt 10): 1893-903.
- Orth, J. D., E. W. Krueger, H. Cao and M. A. McNiven (2002). "The large GTPase dynamin regulates actin comet formation and movement in living cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(1): 167-72.
- Owen, D. J., P. Wigge, Y. Vallis, J. D. Moore, P. R. Evans and H. T. McMahon (1998). "Crystal structure of the amphiphysin-2 SH3 domain and its role in the prevention of dynamin ring formation." *Embo J* 17(18): 5273-85.
- Page, R. K., O. J. Fletcher, Jr. and P. Villegas (1982). "Infectious tenosynovitis in young turkeys." *Avian Dis* 26(4): 924-7.
- Palade, G. E. (1953). "An electron microscope study of the mitochondrial structure." *J Histochem Cytochem* 1(4): 188-211.
- Pant, S., M. Sharma, K. Patel, S. Caplan, C.M. Carr and B.D. Grant (2009). "AMPH-1/Amphiphysin/Bin1 functions with RME-1/Ehd1 in endocytic recycling." *Nat Cell Biol* 11(12): 1399-410.
- Parrish, W.R., C.J. Stefan and S.D. Emr (2004). "Essential role for the myotubularin-related phosphatase Ymr1p and the synoptojanin-like phosphatases Sjl2p and Sjl3p in regulation of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast." *Mol Biol Cell* 15(8): 3567-79.
- Payraastre, B. (2004). "Phosphoinositides: lipid kinases and phosphatases." *Methods Mol Biol* 273: 201-12.
- Pele, M., L. Tired, J. L. Kessler, S. Blot and J. J. Panthier (2005). "SINE exonic insertion in the PTPLA gene leads to multiple splicing defects and segregates with the autosomal recessive centronuclear myopathy in dogs." *Hum Mol Genet* 14(11): 1417-27.
- Peter, B. J., H. M. Kent, I. G. Mills, Y. Vallis, P. J. Butler, P. R. Evans and H. T. McMahon (2004). "BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure." *Science* 303(5657): 495-9.
- Petiot, A., E. Ogier-Denis, E. F. Blommaert, A. J. Meijer and P. Codogno (2000). "Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells." *J Biol Chem* 275(2): 992-8.
- Philips, A. V., L. T. Timchenko and T. A. Cooper (1998). "Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy." *Science* 280(5364): 737-41.
- Pierre, P., J. Scheel, J. E. Rickard and T. E. Kreis (1992). "CLIP-170 links endocytic vesicles to microtubules." *Cell* 70(6): 887-900.
- Pierson, C. R., K. Tomczak, P. Agrawal, B. Moghadaszadeh and A. H. Beggs (2005). "X-linked myotubular and centronuclear myopathies." *J Neuropathol Exp Neurol* 64(7): 555-64.
- Praefcke, G. J. and H. T. McMahon (2004). "The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules?" *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(2): 133-47.
- Prendergast, G.C., A.J. Muller, A. Ramalingam and M.Y. Chang (2009). "BAR the door: cancer suppression by amphiphysin-like genes." *Biochim Biophys Acta* 1795(1): 25-36.
- Quane, K.A., J.M. Healy, K.E. Keating, B.M. Manning, F.J. Couch, L.M. Palmucci, C. Doriguzzi, T.H. Fagerlund, K. Berg, H. Ording and et al. (1993). "Mutations in the ryanodine receptor gene in central core disease and malignant hyperthermia." *Nat Genet* 5(1):51-5.
- Ramachandran, R., M. Surka, J. S. Chappie, D. M. Fowler, T. R. Foss, B. D. Song and S. L. Schmid (2007). "The dynamin middle domain is critical for tetramerization and higher-order self-assembly." *Embo J* 26(2): 559-66.
- Rameh, L. E. and L. C. Cantley (1999). "The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function." *J Biol Chem* 274(13): 8347-50.
- Rameh, L. E., K. F. Talias, B. C. Duckworth and L. C. Cantley (1997). "A new pathway for synthesis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate." *Nature* 390(6656): 192-6.
- Ramjaun, A. R., K. D. Micheva, I. Bouchelet and P. S. McPherson (1997). "Identification and characterization of a nerve terminal-enriched amphiphysin isoform." *J Biol Chem* 272(26): 16700-6.

## Bibliographie

---

- Ranum, L. P., P. F. Rasmussen, K. A. Benzow, M. D. Koob and J. W. Day (1998). "Genetic mapping of a second myotonic dystrophy locus." *Nat Genet* 19(2): 196-8.
- Rao, Y., Q. Ma, A. Vahedi-Faridi, A. Sundborger, A. Pechstein, D. Puchkov, L. Luo, O. Shupliakov, W. Saenger and V. Haucke (2010). "Molecular basis for SH3 domain regulation of F-BAR-mediated membrane deformation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(18): 8213-8.
- Razzaq, A., I. M. Robinson, H. T. McMahon, J. N. Skepper, Y. Su, A. C. Zelhof, A. P. Jackson, N. J. Gay and C. J. O'Kane (2001). "Amphiphysin is necessary for organization of the excitation-contraction coupling machinery of muscles, but not for synaptic vesicle endocytosis in *Drosophila*." *Genes Dev* 15(22): 2967-79.
- Rhee, S. G. and Y. S. Bae (1997). "Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes." *J Biol Chem* 272(24): 15045-8.
- Ricker, K., M. C. Koch, F. Lehmann-Horn, D. Pongratz, M. Otto, R. Heine and R. T. Moxley, 3rd (1994). "Proximal myotonic myopathy: a new dominant disorder with myotonia, muscle weakness, and cataracts." *Neurology* 44(8): 1448-52.
- Robinson, F. L. and J. E. Dixon (2005). "The phosphoinositide-3-phosphatase MTMR2 associates with MTMR13, a membrane-associated pseudophosphatase also mutated in type 4B Charcot-Marie-Tooth disease." *J Biol Chem* 280(36): 31699-707.
- Roggo, L., V. Bernard, A. L. Kovacs, A. M. Rose, F. Savoy, M. Zetka, M. P. Wymann and F. Muller (2002). "Membrane transport in *Caenorhabditis elegans*: an essential role for VPS34 at the nuclear membrane." *Embo J* 21(7): 1673-83.
- Romero-Suarez, S., J. Shen, L. Brotto, T. Hall, C. Mo, H. H. Valdivia, J. Andresen, M. Wacker, T. M. Nosek, C. K. Qu and M. Brotto (2010). "Muscle-specific inositide phosphatase (MIP/MTMR14) is reduced with age and its loss accelerates skeletal muscle aging process by altering calcium homeostasis." *Aging (Albany NY)* 2(8): 504-13.
- Romero, N. B. (2010). "Centronuclear myopathies: a widening concept." *Neuromuscul Disord* 20(4): 223-8.
- Roth, M.G (2004). "Phosphoinositides in constitutive membrane traffic." *Physiol Rev* 84(3): 699-730.
- Roux, A., G. Koster, M. Lenz, B. Sorre, J. B. Manneville, P. Nassoy and P. Bassereau (2010). "Membrane curvature controls dynamin polymerization." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(9): 4141-6.
- Roux, A., K. Uyhazi, A. Frost and P. De Camilli (2006). "GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission." *Nature* 441(7092): 528-31.
- Rudnik-Schoneborn, S., C. Schneider-Gold, U. Raabe, W. Kress, K. Zerres and B.G. Schoser (2006). "Outcome and effect of pregnancy in myotonic dystrophy type 2." *Neurology* 66(4): 579-80.
- Rutherford, A. C., C. Traer, T. Wassmer, K. Pattni, M. V. Bujny, J. G. Carlton, H. Stenmark and P. J. Cullen (2006). "The mammalian phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase (PIKfyve) regulates endosome-to-TGN retrograde transport." *J Cell Sci* 119(Pt 19): 3944-57.
- Sakamuro, D., K. J. Elliott, R. Wechsler-Reya and G. C. Prendergast (1996). "BIN1 is a novel MYC-interacting protein with features of a tumour suppressor." *Nat Genet* 14(1): 69-77.
- Sansone, V., R. C. Griggs and R. T. Moxley, 3rd (2000). "Hypothyroidism unmasking proximal myotonic myopathy." *Neuromuscul Disord* 10(3): 165-72.
- Santagata, S., T. J. Boggon, C. L. Baird, C. A. Gomez, J. Zhao, W. S. Shan, D. G. Myszka and L. Shapiro (2001). "G-protein signaling through tubby proteins." *Science* 292(5524): 2041-50.
- Savkur, R. S., A. V. Philips and T. A. Cooper (2001). "Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy." *Nat Genet* 29(1): 40-7.
- Sawchak, J. A., J. H. Sher, M. G. Norman, R. W. Kula and S. A. Shafiq (1991). "Centronuclear myopathy heterogeneity: distinction of clinical types by myosin isoform patterns." *Neurology* 41(1): 135-40.
- Sbrissa, D. and A. Shisheva (2005). "Acquisition of unprecedented phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate rise in hyperosmotically stressed 3T3-L1 adipocytes, mediated by ArPIKfyve-PIKfyve pathway." *J Biol Chem* 280(9): 7883-9.
- Scacheri, P.C., E.P. Hoffman, J.D. Fratkin, C. Semino-Mora, A. Senchak, M.R. Davis, N.G. Laing, V. Vedanarayanan and S.H. Subramony (2000). "A novel ryanodine receptor gene mutation causing both cores and rods in congenital myopathy." *Neurology* 55(11): 1689-96.
- Schafer, D. A. (2004). "Regulating actin dynamics at membranes: a focus on dynamin." *Traffic* 5(7): 463-9.
- Schaletzky, J., S. K. Dove, B. Short, O. Lorenzo, M. J. Clague and F. A. Barr (2003). "Phosphatidylinositol-5-phosphate activation and conserved substrate specificity of the myotubularin phosphatidylinositol 3-phosphatases." *Curr Biol* 13(6): 504-9.



## Bibliographie

---

- Schessl, J., L. Medne, Y. Hu, Y. Zou, M. J. Brown, J. T. Huse, D. A. Torigian, H. Jungbluth, H. H. Goebel and C. G. Bonnemann (2007). "MRI in DNM2-related centronuclear myopathy: evidence for highly selective muscle involvement." *Neuromuscul Disord* 17(1): 28-32.
- Schmid, S. L., M. A. McNiven and P. De Camilli (1998). "Dynamin and its partners: a progress report." *Curr Opin Cell Biol* 10(4): 504-12.
- Schwartz, K., K. Richards and D. Botstein (1997). "BIM1 encodes a microtubule-binding protein in yeast." *Mol Biol Cell* 8(12): 2677-91.
- Seroude, L., T. Brummel, P. Kapahi and S. Benzer (2002). "Spatio-temporal analysis of gene expression during aging in *Drosophila melanogaster*." *Aging Cell* 1(1): 47-56.
- Sever, S., A. B. Muhlberg and S. L. Schmid (1999). "Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis." *Nature* 398(6727): 481-6.
- Shen, J., W. M. Yu, M. Brotto, J. A. Scherman, C. Guo, C. Stoddard, T. M. Nosek, H. H. Valdivia and C. K. Qu (2009). "Deficiency of MIP/MTMR14 phosphatase induces a muscle disorder by disrupting Ca(2+) homeostasis." *Nat Cell Biol* 11(6): 769-76.
- Shimada, A., H. Niwa, K. Tsujita, S. Suetsugu, K. Nitta, K. Hanawa-Suetsugu, R. Akasaka, Y. Nishino, M. Toyama, L. Chen, Z. J. Liu, B. C. Wang, M. Yamamoto, T. Terada, A. Miyazawa, A. Tanaka, S. Sugano, M. Shirouzu, K. Nagayama, T. Takenawa and S. Yokoyama (2007). "Curved EFC/F-BAR-domain dimers are joined end to end into a filament for membrane invagination in endocytosis." *Cell* 129(4): 761-72.
- Shin, N., N. Ahn, B. Chang-Ileto, J. Park, K. Takei, S. G. Ahn, S. A. Kim, G. Di Paolo and S. Chang (2008). "SNX9 regulates tubular invagination of the plasma membrane through interaction with actin cytoskeleton and dynamin 2." *J Cell Sci* 121(Pt 8): 1252-63.
- Shisheva, A. (2001). "PIKfyve: the road to PtdIns 5-P and PtdIns 3,5-P(2)." *Cell Biol Int* 25(12): 1201-6.
- Shpetner, H. S. and R. B. Vallee (1989). "Identification of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules." *Cell* 59(3): 421-32.
- Siegel, I. M. (1983). "Foot deformity in myotubular myopathy. Pathology of intrinsic foot musculature." *Arch Neurol* 40(9): 589.
- Simonsen, A., R. Lippe, S. Christoforidis, J. M. Gaullier, A. Brech, J. Callaghan, B. H. Toh, C. Murphy, M. Zerial and H. Stenmark (1998). "EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion." *Nature* 394(6692): 494-8.
- Song, X., W. Xu, A. Zhang, G. Huang, X. Liang, J. V. Virbasius, M. P. Czech and G. W. Zhou (2001). "Phox homology domains specifically bind phosphatidylinositol phosphates." *Biochemistry* 40(30): 8940-4.
- Sontag, J. M., E. M. Fykse, Y. Ushkaryov, J. P. Liu, P. J. Robinson and T. C. Sudhof (1994). "Differential expression and regulation of multiple dynamins." *J Biol Chem* 269(6): 4547-54.
- Spiegelhalter, C., V. Tosch, D. Hentsch, M. Koch, P. Kessler, Y. Schwab and J. Laporte (2010). "From dynamic live cell imaging to 3D ultrastructure: novel integrated methods for high pressure freezing and correlative light-electron microscopy." *Plos One* 5(2): e9014.
- Spiro, A. J., G. M. Shy and N. K. Gonatas (1966). "Myotubular myopathy. Persistence of fetal muscle in an adolescent boy." *Arch Neurol* 14(1): 1-14.
- Stauffer, T. P., S. Ahn and T. Meyer (1998). "Receptor-induced transient reduction in plasma membrane PtdIns(4,5)P2 concentration monitored in living cells." *Curr Biol* 8(6): 343-6.
- Steinberg, H. and A. Wagner (2008). "[Hans Steinert: 100 years of myotonic dystrophy]." *Nervenarzt* 79(8): 961-2, 965-70.
- Stephens, L., F. T. Cooke, R. Walters, T. Jackson, S. Volinia, I. Gout, M. D. Waterfield and P. T. Hawkins (1994). "Characterization of a phosphatidylinositol-specific phosphoinositide 3-kinase from mammalian cells." *Curr Biol* 4(3): 203-14.
- Sutton, I. J., J. B. Winer, A. N. Norman, S. Liechti-Gallati and F. MacDonald (2001). "Limb girdle and facial weakness in female carriers of X-linked myotubular myopathy mutations." *Neurology* 57(5): 900-2.
- Sweitzer, S. M. and J. E. Hinshaw (1998). "Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation." *Cell* 93(6): 1021-9.
- Taguchi-Atarashi, N., M. Hamasaki, K. Matsunaga, H. Omori, N.T. Ktistakis, T. Yoshimori and T. Noda (2010). "Modulation of local PtdIns3P levels by the PI phosphatase MTMR3 regulates constitutive autophagy." *Traffic* 11(4): 468-78.
- Takei, K., V. I. Slepnev, V. Haucke and P. De Camilli (1999). "Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis." *Nat Cell Biol* 1(1): 33-9.

## Bibliographie

---

- Takenawa, T. and T. Itoh (2001). "Phosphoinositides, key molecules for regulation of actin cytoskeletal organization and membrane traffic from the plasma membrane." *Biochim Biophys Acta* 1533(3): 190-206.
- Tall, E. G., I. Spector, S. N. Pentylala, I. Bitter and M. J. Rebecchi (2000). "Dynamics of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in actin-rich structures." *Curr Biol* 10(12): 743-6.
- 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): 939-48.
- Tanner, S. M., J. Laporte, C. Guiraud-Chaumeil and S. Liechti-Gallati (1998). "Confirmation of prenatal diagnosis results of X-linked recessive myotubular myopathy by mutational screening, and description of three new mutations in the MTM1 gene." *Hum Mutat* 11(1): 62-8.
- Tassin, A. M., B. Maro and M. Bornens (1985). "Fate of microtubule-organizing centers during myogenesis in vitro." *J Cell Biol* 100(1): 35-46.
- 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): 335-42.
- Thompson, H. M., A. R. Skop, U. Euteneuer, B. J. Meyer and M. A. McNiven (2002). "The large GTPase dynamin associates with the spindle midzone and is required for cytokinesis." *Curr Biol* 12(24): 2111-7.
- Timchenko, L. T., N. A. Timchenko, C. T. Caskey and R. Roberts (1996). "Novel proteins with binding specificity for DNA CTG repeats and RNA CUG repeats: implications for myotonic dystrophy." *Hum Mol Genet* 5(1): 115-21.
- Tiret, L., S. Blot, J. L. Kessler, H. Gailliot, M. Breen and J. J. Panthier (2003). "The cnm locus, a canine homologue of human autosomal forms of centronuclear myopathy, maps to chromosome 2." *Hum Genet* 113(4): 297-306.
- Toker, A. (1998). "The synthesis and cellular roles of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate." *Curr Opin Cell Biol* 10(2): 254-61.
- Toker, A., M. Meyer, K. K. Reddy, J. R. Falck, R. Aneja, S. Aneja, A. Parra, D. J. Burns, L. M. Ballas and L. C. Cantley (1994). "Activation of protein kinase C family members by the novel polyphosphoinositides PtdIns-3,4-P2 and PtdIns-3,4,5-P3." *J Biol Chem* 269(51): 32358-67.
- Tosch, V., H. M. Rohde, H. Tronchere, E. Zanoteli, N. Monroy, C. Kretz, N. Dondaine, B. Payrastre, J. L. Mandel and J. Laporte (2006). "A novel PtdIns3P and PtdIns(3,5)P2 phosphatase with an inactivating variant in centronuclear myopathy." *Hum Mol Genet* 15(21): 3098-106.
- Toussaint, A., B. S. Cowling, K. Hnia, M. Mohr, A. Oldfors, Y. Schwab, U. Yis, T. Maisonobe, T. Stojkovic, C. Wallgren-Pettersson, V. Laugel, A. Echaniz-Laguna, J. L. Mandel, I. Nishino and J. Laporte (2010). "Defects in amphiphysin 2 (BIN1) and triads in several forms of centronuclear myopathies." *Acta Neuropathol.*
- Treves, S., A. A. Anderson, S. Ducreux, A. Divet, C. Bleunven, C. Grasso, S. Paesante and F. Zorzato (2005). "Ryanodine receptor 1 mutations, dysregulation of calcium homeostasis and neuromuscular disorders." *Neuromuscul Disord* 15(9-10): 577-87.
- Tronchere, H., J. Laporte, C. Pendaries, C. Chaussade, L. Liaubet, L. Pirola, J.L. Mandel and B. Payrastre (2004). "Production of phosphatidylinositol 5-phosphate by the phosphoinositide 3-phosphatase myotubularin in mammalian cells." *J Biol Chem* 279(8): 7304-12.
- Tsujita, K., T. Itoh, T. Ijuin, A. Yamamoto, A. Shisheva, J. Laporte and T. Takenawa (2004). "Myotubularin regulates the function of the late endosome through the gram domain-phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate interaction." *J Biol Chem* 279(14): 13817-24.
- Vallis, Y., P. Wigge, B. Marks, P. R. Evans and H. T. McMahon (1999). "Importance of the pleckstrin homology domain of dynamin in clathrin-mediated endocytosis." *Curr Biol* 9(5): 257-60.
- van Wijngaarden, G. K., P. Fleury, J. Bethlem and A. E. Meijer (1969). "Familial "myotubular" myopathy." *Neurology* 19(9): 901-8.
- Vanhaesebroeck, B., S. J. Leever, K. Ahmadi, J. Timms, R. Katso, P. C. Driscoll, R. Woscholski, P. J. Parker and M. D. Waterfield (2001). "Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids." *Annu Rev Biochem* 70: 535-602.
- Vanier, T. M. (1960). "Dystrophia myotonica in childhood." *Br Med J* 2(5208): 1284-8.
- Varnai, P. and T. Balla (2006). "Live cell imaging of phosphoinositide dynamics with fluorescent protein domains." *Biochim Biophys Acta* 1761(8): 957-67.
- Vergne, I., E. Roberts, R. A. Elmaoued, V. Tosch, M. A. Delgado, T. Proikas-Cezanne, J. Laporte and V. Deretic (2009). "Control of autophagy initiation by phosphoinositide 3-phosphatase Jumpy." *Embo J* 28(15): 2244-58.



## Bibliographie

---

- Volinia, S., R. Dhand, B. Vanhaesebroeck, L. K. MacDougall, R. Stein, M. J. Zvelebil, J. Domin, C. Panaretou and M. D. Waterfield (1995). "A human phosphatidylinositol 3-kinase complex related to the yeast Vps34p-Vps15p protein sorting system." *Embo J* 14(14): 3339-48.
- Wallgren-Pettersson, C., A. Clarke, F. Samson, M. Fardeau, V. Dubowitz, H. Moser, T. Grimm, R. J. Barohn and P. G. Barth (1995). "The myotubular myopathies: differential diagnosis of the X linked recessive, autosomal dominant, and autosomal recessive forms and present state of DNA studies." *J Med Genet* 32(9): 673-9.
- Wallgren-Pettersson, C., K. Pelin, P. Hilpela, K. Donner, B. Porfirio, C. Graziano, K. J. Swoboda, M. Fardeau, J. A. Urtizberea, F. Muntoni, C. Sewry, V. Dubowitz, S. Iannaccone, C. Minetti, M. Pedemonte, M. Seri, R. Cusano, M. Lammens, A. Castagna-Sloane, A. H. Beggs, N. G. Laing and A. de la Chapelle (1999). "Clinical and genetic heterogeneity in autosomal recessive nemaline myopathy." *Neuromuscul Disord* 9(8): 564-72.
- 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): 2553-62.
- Wechsler-Reya, R. J., K. J. Elliott and G. C. Prendergast (1998). "A role for the putative tumor suppressor Bin1 in muscle cell differentiation." *Mol Cell Biol* 18(1): 566-75.
- Weissenhorn, W. (2005). "Crystal structure of the endophilin-A1 BAR domain." *J Mol Biol* 351(3): 653-61.
- Wigge, P., K. Kohler, Y. Vallis, C. A. Doyle, D. Owen, S. P. Hunt and H. T. McMahon (1997). "Amphiphysin heterodimers: potential role in clathrin-mediated endocytosis." *Mol Biol Cell* 8(10): 2003-15.
- Wigge, P. and H. T. McMahon (1998). "The amphiphysin family of proteins and their role in endocytosis at the synapse." *Trends Neurosci* 21(8): 339-44.
- Wilmshurst, J. M., S. Lillis, H. Zhou, K. Pillay, H. Henderson, W. Kress, C. R. Muller, A. Ndong, V. Cloke, T. Cullup, E. Bertini, C. Boennemann, V. Straub, R. Quinlivan, J. J. Dowling, S. Al-Sarraj, S. Treves, S. Abbs, A. Y. Manzur, C. A. Sewry, F. Muntoni and H. Jungbluth (2010). "RYR1 mutations are a common cause of congenital myopathies with central nuclei." *Ann Neurol* 68(5): 717-26.
- Wishart, M. J., G. S. Taylor, J. T. Slama and J. E. Dixon (2001). "PTEN and myotubularin phosphoinositide phosphatases: bringing bioinformatics to the lab bench." *Curr Opin Cell Biol* 13(2): 172-81.
- Witke, W., A. V. Podtelejnikov, A. Di Nardo, J. D. Sutherland, C. B. Gurniak, C. Dotti and M. Mann (1998). "In mouse brain profilin I and profilin II associate with regulators of the endocytic pathway and actin assembly." *Embo J* 17(4): 967-76.
- Wurmser, A. E. and S. D. Emr (2002). "Novel PtdIns(3)P-binding protein Etf1 functions as an effector of the Vps34 PtdIns 3-kinase in autophagy." *J Cell Biol* 158(4): 761-72.
- Xu, Y., L. F. Seet, B. Hanson and W. Hong (2001). "The Phox homology (PX) domain, a new player in phosphoinositide signalling." *Biochem J* 360(Pt 3): 513-30.
- Yamaguchi, S., K. Homma and S. Natori (1999). "A novel egg-derived tyrosine phosphatase, EDTP, that participates in the embryogenesis of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly)." *Eur J Biochem* 259(3): 946-53.
- Yarar, D., M. C. Surka, M. C. Leonard and S. L. Schmid (2008). "SNX9 activities are regulated by multiple phosphoinositides through both PX and BAR domains." *Traffic* 9(1): 133-46.
- Yin, H. L. and P. A. Janmey (2003). "Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton." *Annu Rev Physiol* 65: 761-89.
- Yoshida, Y., M. Kinuta, T. Abe, S. Liang, K. Araki, O. Cremona, G. Di Paolo, Y. Moriyama, T. Yasuda, P. De Camilli and K. Takei (2004). "The stimulatory action of amphiphysin on dynamin function is dependent on lipid bilayer curvature." *Embo J* 23(17): 3483-91.
- Yu, S., J. Manson, S. White, A. Bourne, H. Waddy, M. Davis and E. Haan (2003). "X-linked myotubular myopathy in a family with three adult survivors." *Clin Genet* 64(2): 148-52.
- Yu, X., S. Odera, C. H. Chuang, N. Lu and Z. Zhou (2006). "C. elegans Dynamin mediates the signaling of phagocytic receptor CED-1 for the engulfment and degradation of apoptotic cells." *Dev Cell* 10(6): 743-57.
- Zhao, R., Y. Qi, J. Chen and Z. J. Zhao (2001). "FYVE-DSP2, a FYVE domain-containing dual specificity protein phosphatase that dephosphorylates phosphatidylinositol 3-phosphate." *Exp Cell Res* 265(2): 329-38.
- Zimmerberg, J. and M. M. Kozlov (2006). "How proteins produce cellular membrane curvature." *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(1): 9-19.
- Zimmermann, P. (2006). "PDZ domain-phosphoinositide interactions in cell-signaling." *Verh K Acad Geneeskd Belg* 68(4): 271-86.
- Zini, N., G. Lisignoli, L. Solimando, A. Bavelloni, A. Valmori, S. Cristino, A. M. Martelli, A. Facchini and N. M. Maraldi (2005). "Quantitative immunodetection of key elements of polyphosphoinositide signal

## Bibliographie

---

transduction in osteoblasts from arthritic patients shows a direct correlation with cell proliferation." Histochem Cell Biol 124(2): 131-7.

Zou, J., S. C. Chang, J. Marjanovic and P. W. Majerus (2009). "MTMR9 increases MTMR6 enzyme activity, stability, and role in apoptosis." J Biol Chem 284(4): 2064-71.

Zuchner, S., M. Nouredine, 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): 289-94.

**Site internet :**

<http://www.endocytosis.org/Amphiphysin/amphiphysin.html>  
<http://thesesups.ups-tlse.fr/655/>).

## Résumé

---

Les myopathies centronucléaires sont des maladies congénitales rares caractérisées par une faiblesse musculaire généralisée et des fibres musculaires à noyaux anormalement centraux. La forme sévère néonatale liée au chromosome X (XLCNM) est due à des mutations dans le gène myotubularine codant pour une phosphatase à phosphoinositides, MTM1. La forme autosomique récessive apparaît durant l'enfance voir au début de l'adolescence. J'ai participé à l'étude de l'impact de mutations identifiées par l'équipe de Jocelyn Laporte, dans l'isoforme musculaire spécifique de l'amphiphysine 2 : BIN1, peu de temps avant mon arrivée en stage de Master 2. Des mutations dans le gène codant pour la dynamine 2 (DNM2), une protéine impliquée dans la fission et la tubulation des membranes, ont été identifiées dans la forme autosomique dominante des myopathies centronucléaires (ADCNM).

La mise au point d'une nouvelle technique de diagnostic génétique par RT-PCR pour les patients atteints de XLCNM a permis de mettre en évidence une mutation intronique jamais identifiée jusque là, et de diminuer le nombre de patients dont aucune mutation n'avait été préalablement identifiées dans MTM1.

L'étude fonctionnelle des mutations identifiées dans le gène BIN1 m'a permis de mettre en évidence que les mutations pouvaient être responsables soit d'une perte de la formation de tubules membranaires soit d'une anomalie de la conformation tridimensionnelle de la protéine soit encore d'une forte altération du recrutement de la dynamine 2. De plus, en collaboration avec l'équipe du Dr N. Charlet-Berguerand, j'ai montré que la perte de l'exon 11 et donc du domaine PI spécifique de BIN1 était responsable d'un arrêt de la tubulation membranaire dans des cellules musculaires.

Enfin, l'étude de mutations identifiées dans la dynamine 2 chez des patients atteints d'ADCNM mais aussi de neuropathie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) a permis de montrer un défaut d'internalisation de la transférine chez les patients atteints de CMT.

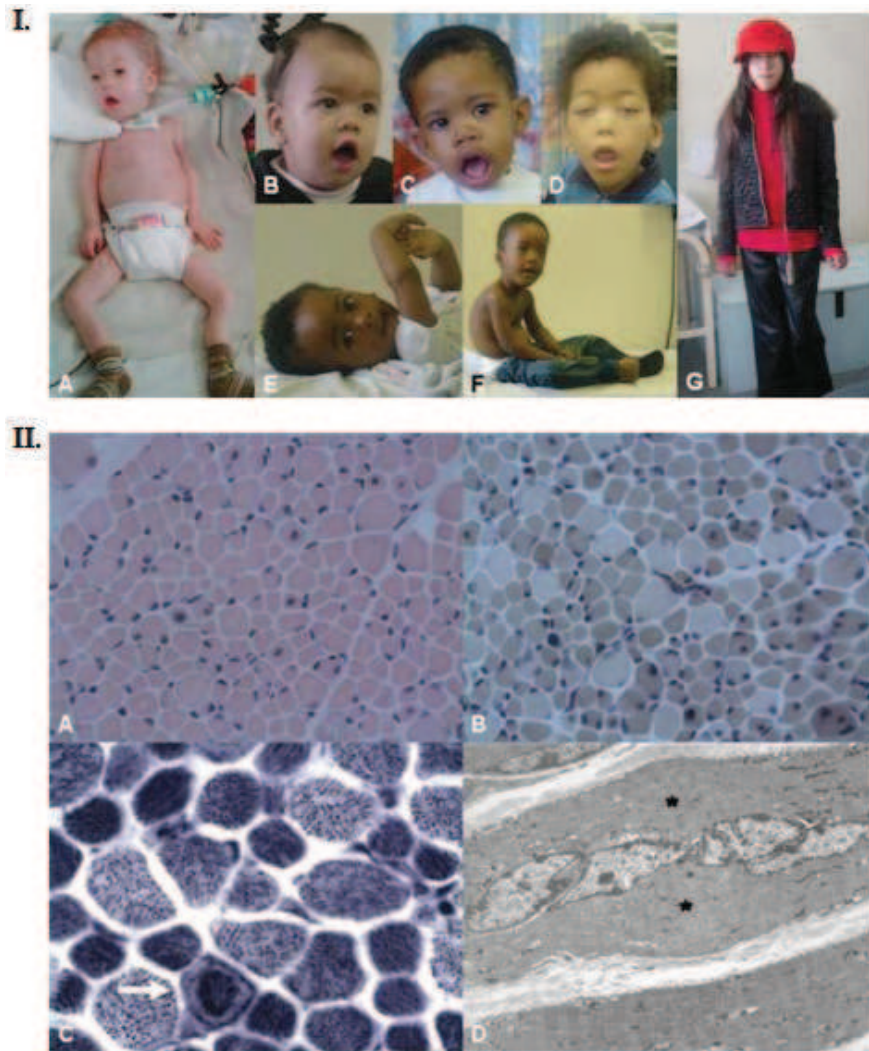
Finalement, j'ai montré par des expériences d'interaction protéiques que les protéines MTM1 et BIN1 sont capables d'interagir directement entre elles, via le domaine SH3 de BIN1. Ce résultat permet de relier ces trois protéines dans un mécanisme commun puisqu'il avait déjà été démontré que BIN1 et DNM2 interagissent ensemble.

Toutes ces données suggèrent que ces trois protéines pourraient être impliquées dans un mécanisme commun dans le muscle squelettique et que ce mécanisme pourrait avoir un lien avec la formation et/ou le maintien des tubules-transverses.

Gène	Exon	Variante	Protéine/site	% Patient touché sur 20 patients testés
hJUMPY	3	Ht : t (-168)t/c	Dans l'intron	32%
hJUMPY	4	Ht : a(-24) a/g	Dans l'intron	35%
hJUMPY	5	Ht : a(-85)a/g	Dans l'intron	5%
hJUMPY	7	Ht : a(-210)a/g	Dans l'intron	15%
hJUMPY	9	Hm : a(-33) a/t	Dans l'intron	5%
hJUMPY	9	Ht : c(+125) c/delc	Dans l'intron	10%
hJUMPY	11	Ht : g(ex11nt45) g/a	R336Q (ccg>cag)	5% (SSCP réalisée)
hJUMPY	12	Ht : g(-147) g/c	Dans l'intron	5%
hJUMPY	12	Ht : g(-57) g/t	Dans l'intron	5%
hJUMPY	13	Ht : g(+71) g/c	Dans l'intron	40%
hJUMPY	15	Ht : a(-96) a/g	Dans l'intron	5%
hJUMPY	16	Ht : a(nt91) a/g	Y462C	5%
hJUMPY	17	Ht : g(-4) g/a	Dans l'intron	5%
hJUMPY	18	Ht : c(-66) c/t	Dans l'intron	15%

**Tableau 1 : Récapitulatif des variants identifiés dans le gène hJUMPY**

Le séquençage du gène hJUMPY chez 20 patients a permis d'identifier deux variants présents chacun chez un patient (R336Q et Y462C) mais aussi douze polymorphismes présents dans les introns du gène qui jusque là n'était pas répertorié.

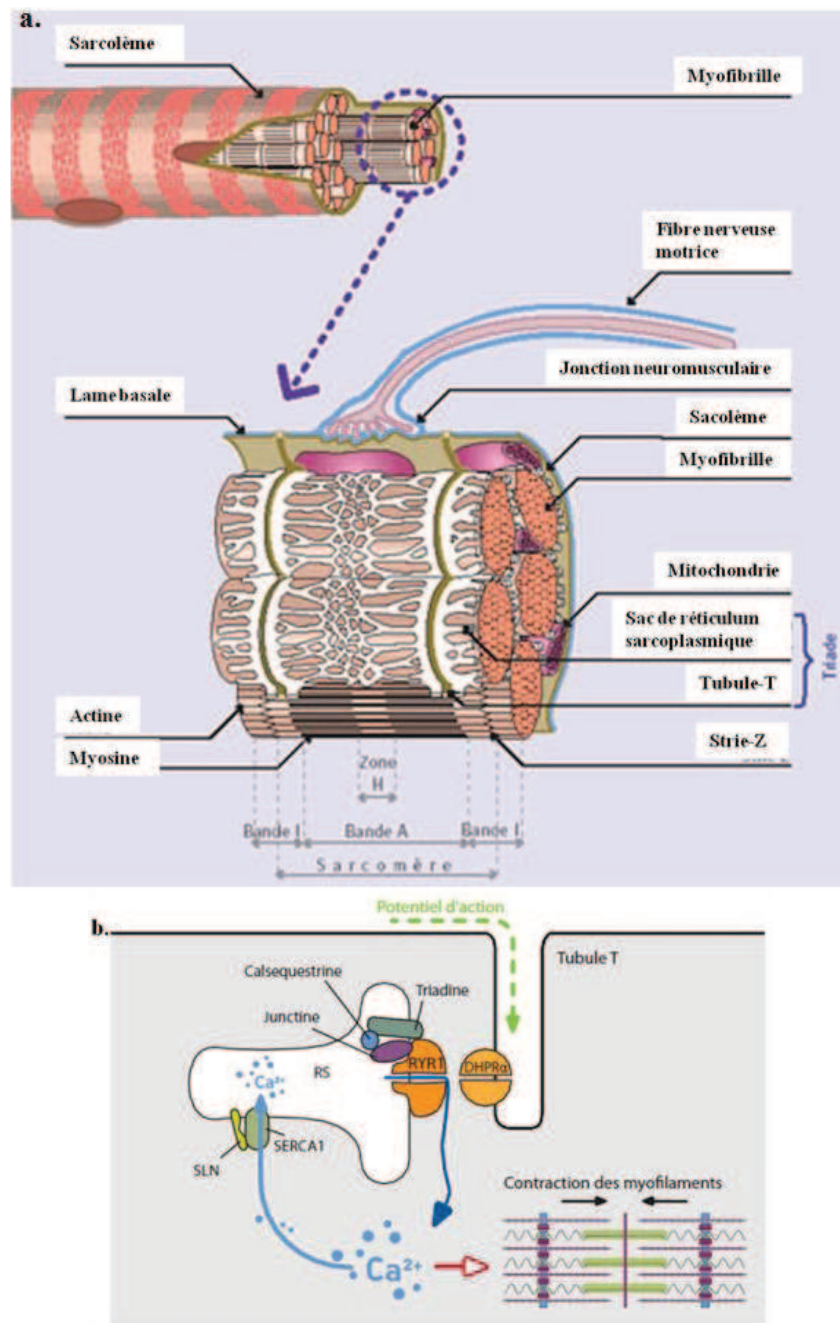


**Figure 1: Description clinique et histologique des patients atteints de myopathies congénitales à noyaux centraux liées au gène RyR1**

- I. Variabilité phénotypique associée aux myopathies congénitales liées à RyR1
  - (A) Enfant sévèrement affecté avec un ptosis, une implication du muscle extraoculaire, une hypotonie, et une aide ventilatoire permanente
  - (B) (C) (D) Faciès typique avec une bouche en V et un ptosis marqué, ressemblant à une dystrophie myotonique
  - (E) (F) Développement progressif de certains patients de l'enfance à l'âge de 2 ans. L'enfant est capable de s'asseoir mais n'est pas capable de marcher
  - (G) Une adolescente atteinte capable de marcher avec quelques difficultés malgré une hypotonie profonde
- II. Caractéristiques histologiques associées aux myopathies congénitales à noyaux centraux
  - (A) Hématoxyline-éosine, avec une taille variable des fibres, une petite augmentation du tissu endosomal et adipeux. Plusieurs fibres présentent des noyaux centralisés et d'autres des noyaux internalisés
  - (B) Marquage de l'ATPase après une préincubation acide. Prédominance des fibres hypotrophiques de type 1 avec quelques fibres élargies de type 2
  - (C) Marquage NADH-TR. Prédominance des fibres petites oxydatives
  - (D) Microscopie électronique. Noyaux centraux alignés à la chaîne. Il y a une formation de minicores proche des noyaux (\*)

(D'après Wilmschurst et al., 2010)





**Figure 2: Organisation de la triade du muscle squelettique**

(a.) Organisation du muscle squelettique

Les fibres musculaires sont de longues cellules multinucléées, constituées de myofibrilles, ces dernières étant constituées d'unités contractiles, les sarcomères.

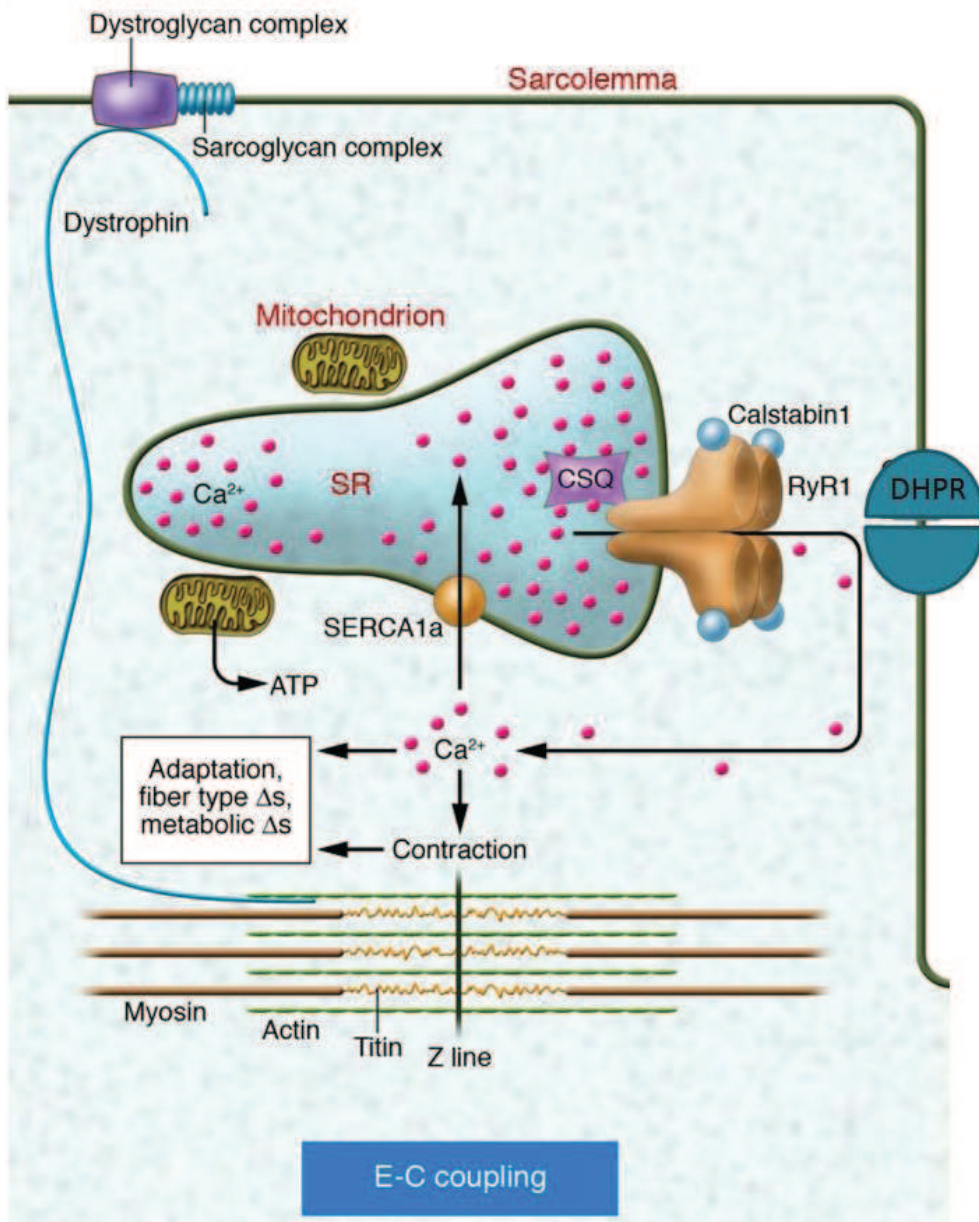
Entre les myofibrilles se trouve un réseau de réticulum sarcoplasmique et de tubules-T.

(b.) Schéma du mécanisme de couplage excitation-contraction

La dépolarisation parcourt la membrane du tubule-T et active le canal voltage dépendant DHPR. Cela induit l'ouverture du canal RYR1 qui libère alors le  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol. Il va alors se fixer à la troponine et activer la contraction musculaire.

(D'après [http://www.institut-myologie.org/ewb\\_pages/m/muscle\\_introduction\\_3450.php](http://www.institut-myologie.org/ewb_pages/m/muscle_introduction_3450.php))

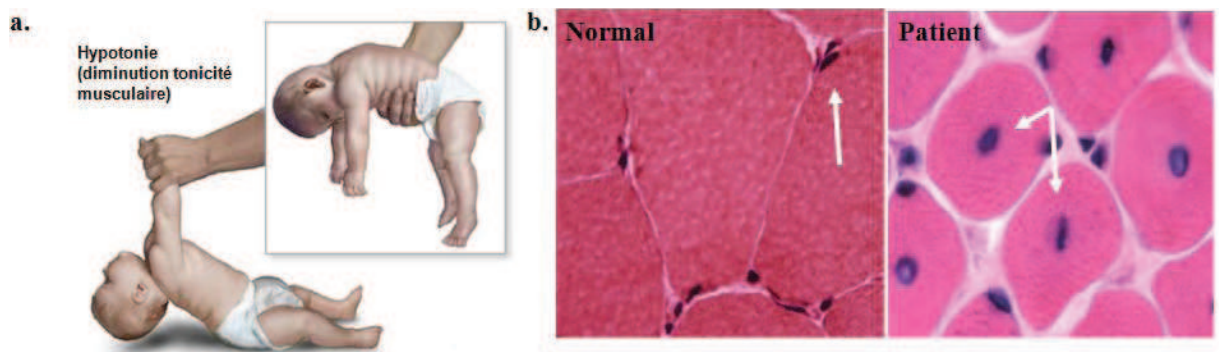




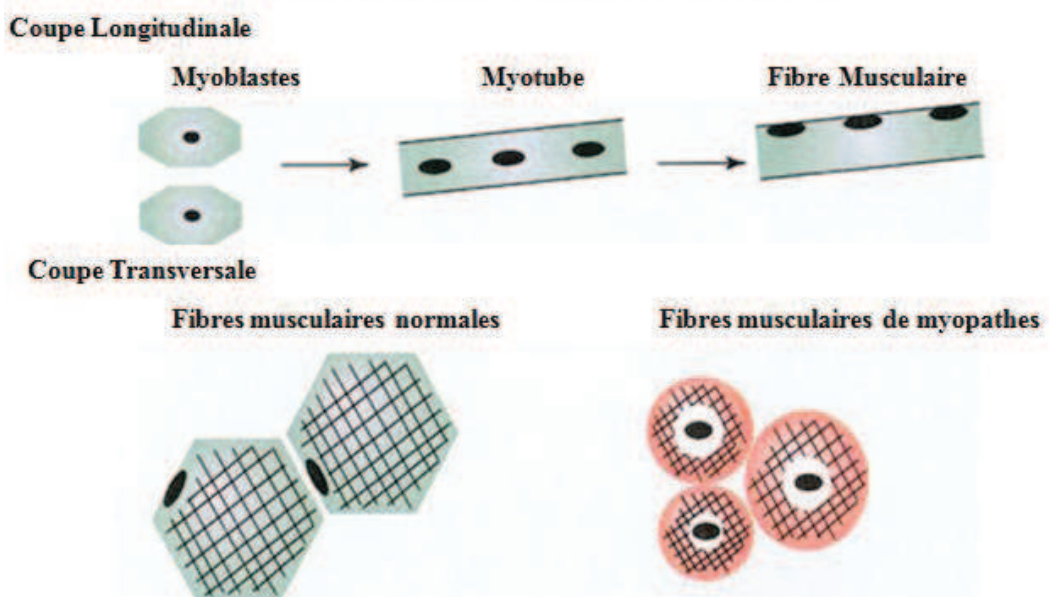
**Figure 3 : Structure et organisation de RYR1**

Le canal RYR1 est formé de 4 sous-unités. Les parties transmembranaires forment le canal proprement parlé, et les parties cytosoliques constituent le pied qui entre en contact avec les tétrades du canal Dihydropyridine (DHPR).

(D'après Andrew Bellinger, J Clin Invest, 2008)



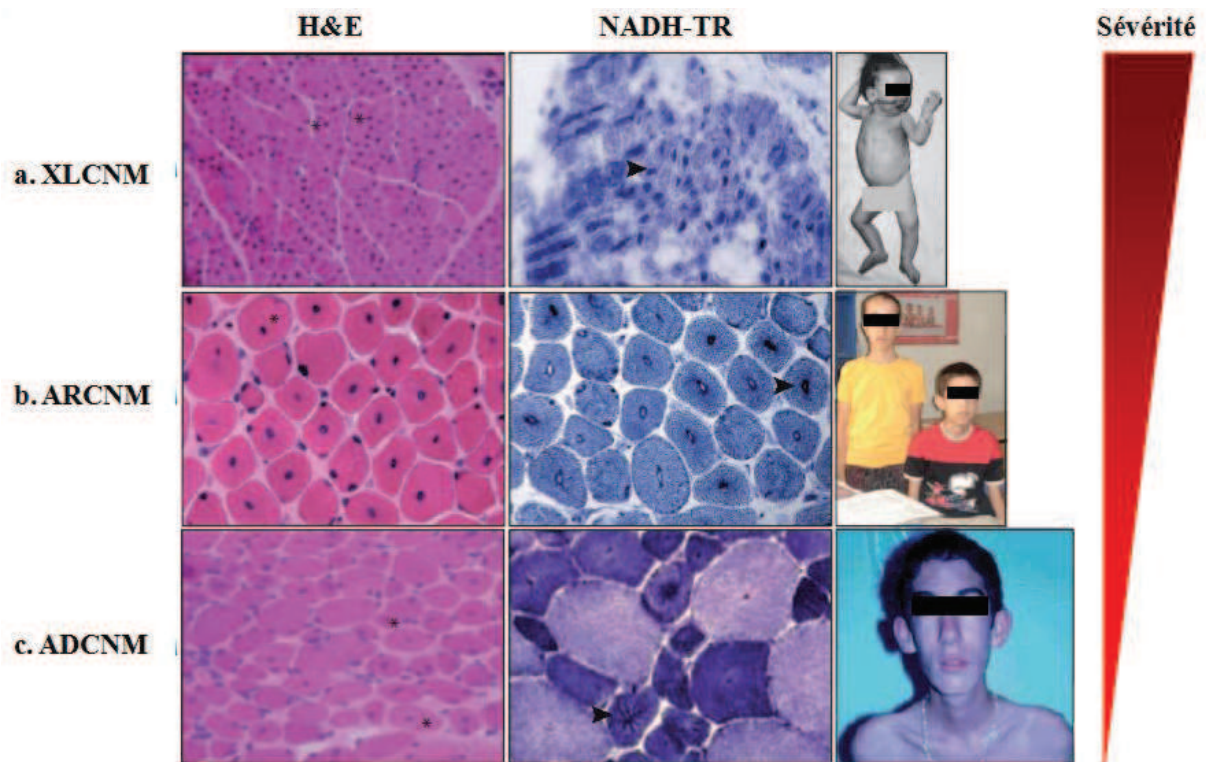
### c. Maturation des fibres musculaires : Myogenèse



**Figure 4 : Description générale des CNM**

- (a.) Les patients atteints de CNM montrent une faiblesse musculaire généralisée et progressive, dont l'apparition varie suivant la forme de CNM, ainsi qu'une hypotonie généralisée.
- (b.) Marquage hématoxyline-éosine. Les fibres musculaires des patients myopathes présentent des noyaux centraux tandis que chez des individus sains les noyaux se retrouvent à la périphérie de la fibre
- (c.) La myogenèse : pendant la maturation des fibres musculaires les myoblastes vont fusionner entre eux pour former des myotubes qui, après maturation, auront leurs noyaux qui migreront à la périphérie pour former la fibre musculaire. Dans le cas des patients myopathes les noyaux ont une position centrale dans la fibre musculaire.

(D'après Laporte et al, TIG, 2001)

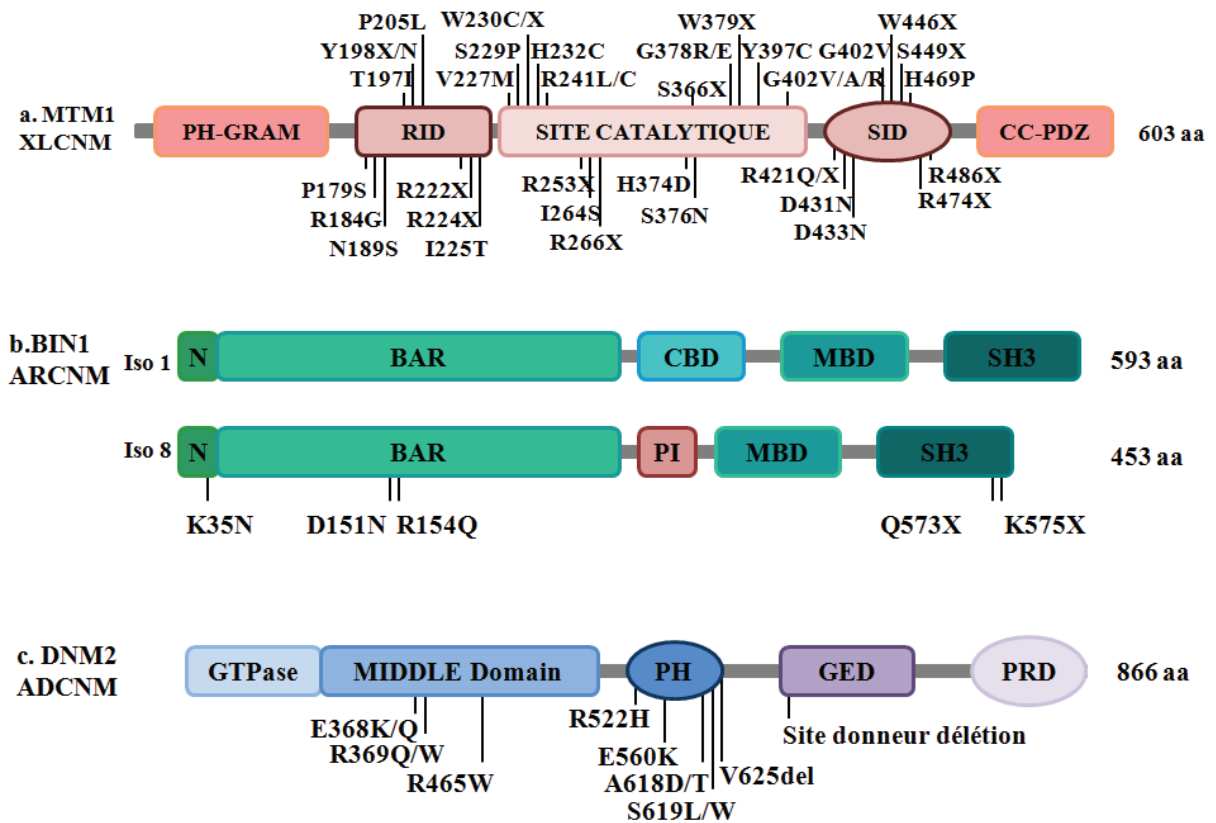


**Figure 5 : Descriptions histologiques et cliniques des différentes formes de CNM**

Dans les trois cas, XLCNM, ARCNM et ADCNM, le marquage hématoxyline-éosine révèle la présence inhabituelle de noyaux centraux. Le marquage NADH-TR montre une répartition anormale du réseau intermyofibrillaire pour les trois formes (têtes de flèche).

- (a.) Le marquage NADH-TR permet de voir que le matériel intermyofibrillaire est accumulé au centre des fibres dans les cas de XLCNM. Les patients myopathes présentent une faiblesse généralisée qui se développe dès la naissance dans les cas sévères de XLCNM.
- (b.) Le marquage NADH-TR montre un matériel intermyofibrillaire encerclant les noyaux centraux. La faiblesse généralisée apparaît à l'adolescence en générale dans le cas de patients atteints de la forme d'ARCNM.
- (c.) Enfin, le marquage intermyofibrillaire chez les patients ADCNM montre un réseau intermyofibrillaire formant un réseau en roue de charrette depuis les noyaux centraux. La faiblesse musculaire apparaît en générale à l'âge adulte chez les patients atteints de la forme d'ADCNM.

(D'après Pierson et al., 2005 ; Nicot et al., 2007 et Bohm et al., 2010)

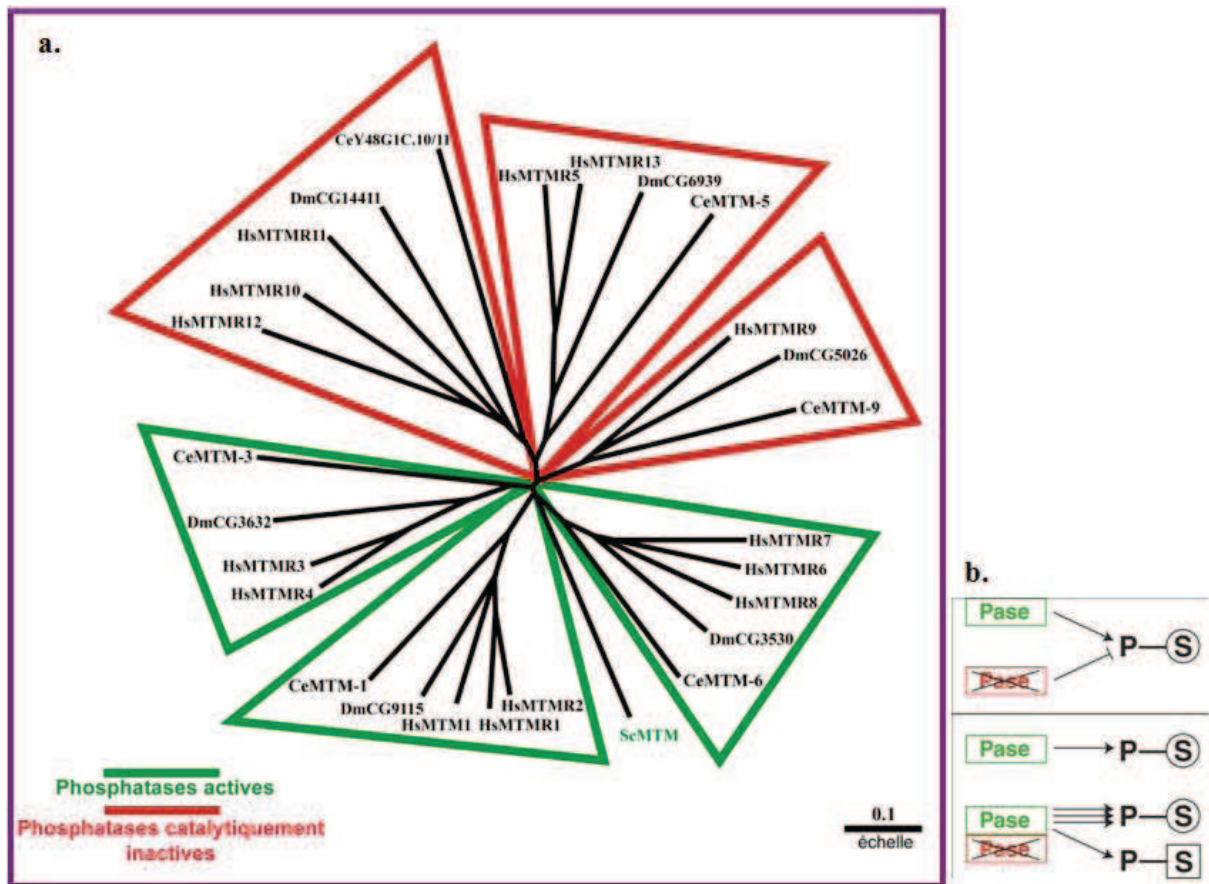


**Figure 6 : Les trois protéines impliquées dans les trois formes de myopathies centronucléaires et leurs mutations**

- Les mutations sur le gène de la myotubularine se retrouvent tout le long du gène et sont responsables de la forme liée au chromosome X
- Cinq mutations dans le gène BIN1 ont été identifiées dans l'équipe de Jocelyn Laporte et se situent dans les domaines N-BAR et SH3 et sont responsables de la forme autosomique récessive.
- Les mutations dans le gène de la dynamine 2 se retrouvent principalement dans le middle domaine et dans le domaine PH, elles sont responsables de la forme autosomique dominante de CNM.

PH-GRAM : pleckstrin homology-glycosyltransferase rab-like GTPase activators and myotubularins, RID : rac-induced recrutement domain, SID : SET-interacting domain, CC-PDZ : coiled-coil-PDZ binding motif, N : hélice amphipatique N-terminale, BAR : Bin/Amphiphysin/Rvs167, CDB : clathrine binding domain, MBD : myc binding domain, SH3 : Src homology 3, Middle domain : domaine intermédiaire, PH : pleckstrine homology, GED : GTPase effector domain, PRD : proline rich domain



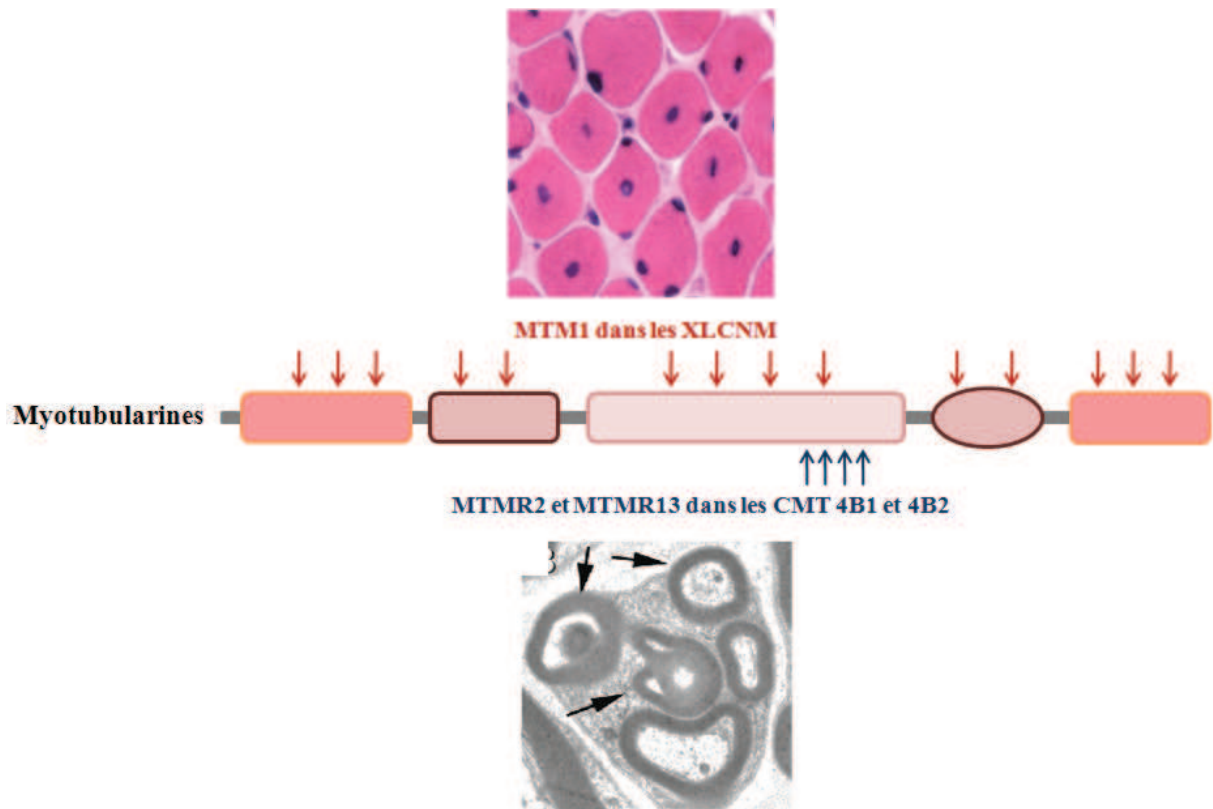


**Figure 7 : Arbre phylogénétique de la famille MTMs et hypothèse sur leur régulation**

- (a.) Il existe 14 membres dans la famille des myotubularines (MTM1, MTMR1 à MTMR13). Certaines de ces myotubularines sont dites actives car elles contiennent un site catalytique CX(5)R responsable de la déphosphorylation de certains phosphoinositides. Tandis que les autres myotubularines sont dites inactives car elles sont mutées au niveau du site actif ce qui ne leur permet plus de déphosphoryler les phosphoinositides.
- (b.) L'hypothèse de la présence des phosphatases inactives est qu'elles pourraient être capables d'activer les phosphatases actives en se liant à ces dernières.

Hs : gène de *Homo sapiens* ; Ce : gène de *Caenorhabditis elegans* ; Sc : gène de *Saccharomyces cerevisiae*

(D'après Laporte et al., 2003)



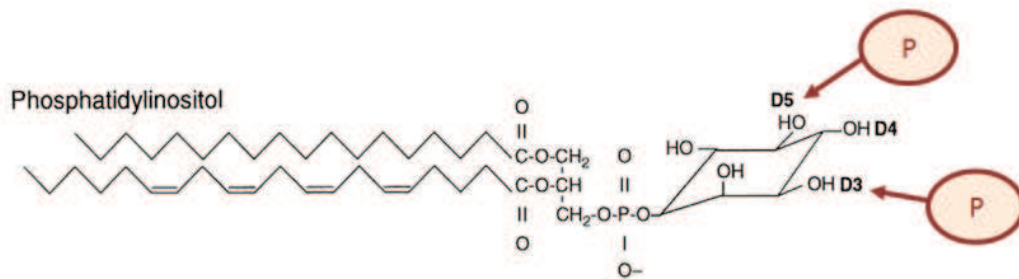
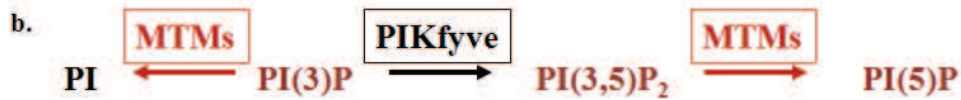
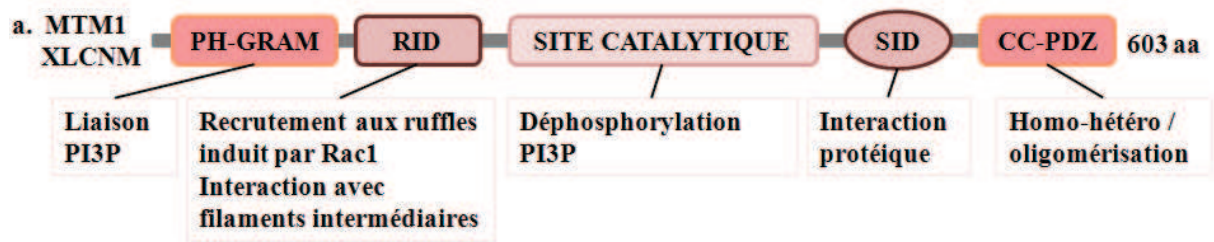
**Figure 8: Les maladies liées à des mutations dans les protéines de la famille des myotubularines**

Plusieurs membres de la famille des myotubularines sont mutés dans différentes pathologies humaines. En effet, le membre fondateur de cette famille, MTM1, est muté chez les patients atteints de la forme liée au chromosome X des myopathies centronucléaires. Jusqu'à aujourd'hui plus de 200 mutations, de tous types (faux-sens, non-sens, décalage du cadre de lecture,...) ont déjà été identifiées tout le long du gène.

D'autre part, deux membres de cette même famille, MTMR2 ainsi que MTMR13, sont mutés dans deux formes de neuropathies de Charcot-Marie-Tooth de type 4B1 et 4B2, respectivement. Dans ce cas, les mutations se retrouvent principalement dans la partie C-terminale du site actif et sont principalement des décalages du cadre de lecture.

(D'après Pierson et al., 2005 et Bolino et al., 2004)



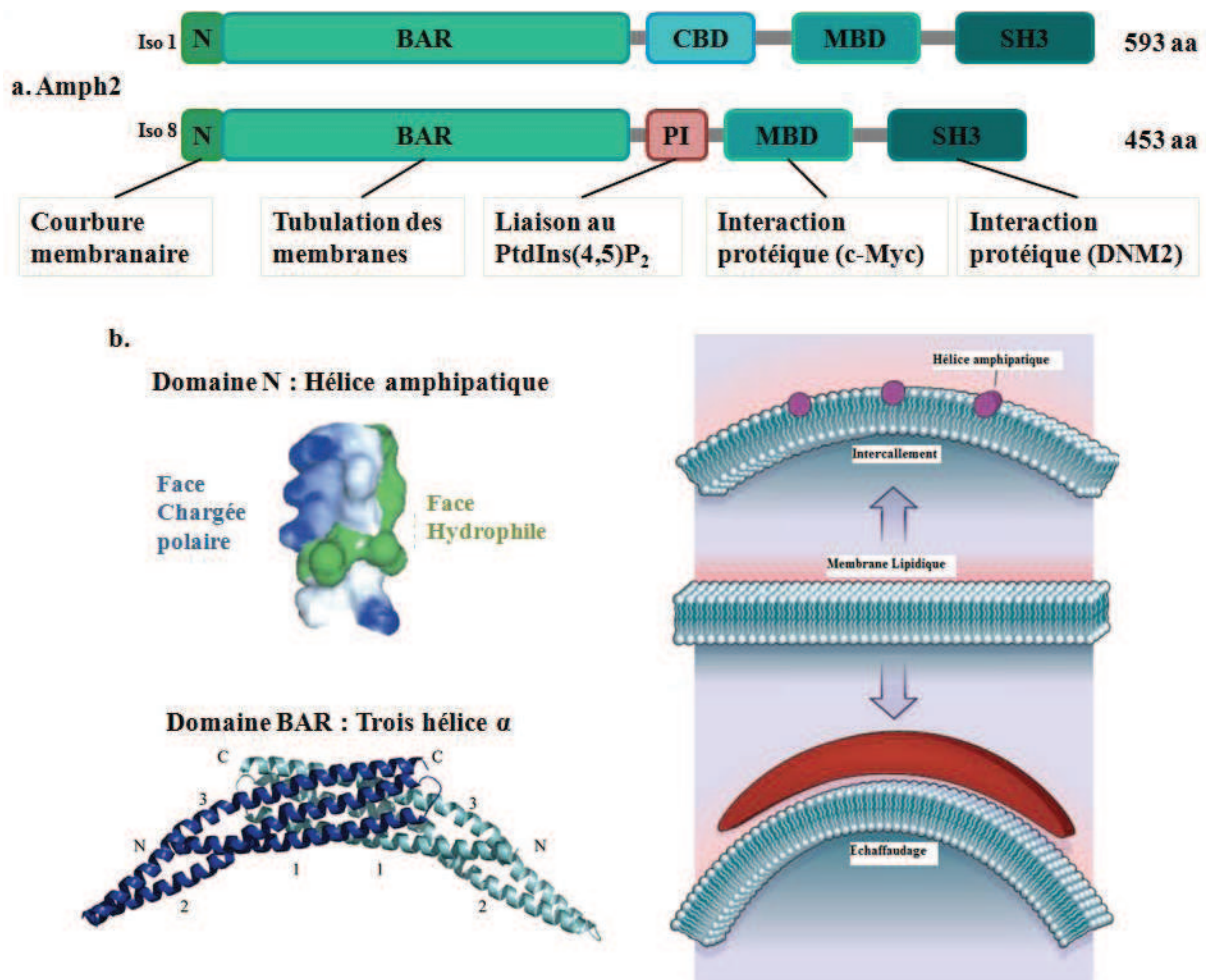


### Figure 9 : La myotubularine: une phosphatase à phosphoinositides

(a.) Les domaines de MTM1 et leurs rôles. La protéine déphosphoryle deux phosphoinositides endosomaux, grâce à son site catalytique. Pour cela, la myotubularine va se lier aux phosphoinositides via son domaine PH-GRAM. Elle est aussi capable de former des oligomères et de lier des protéines grâce à ces domaines coiled-coil/PDZ et SID respectivement.

Enfin, elle est capable d'être recrutée aux ruffles induit par Rac1 et d'interagir avec les filaments intermédiaires via son domaine RID.

(b.) La myotubularine est une phosphatase à phosphoinositides qui déphosphoryle plus particulièrement des phosphoinositides endosomaux : le PtdIns(3)P et le PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>



**Figure 10 : Le domaine N-BAR de l'amphiphysine 2/BIN1**

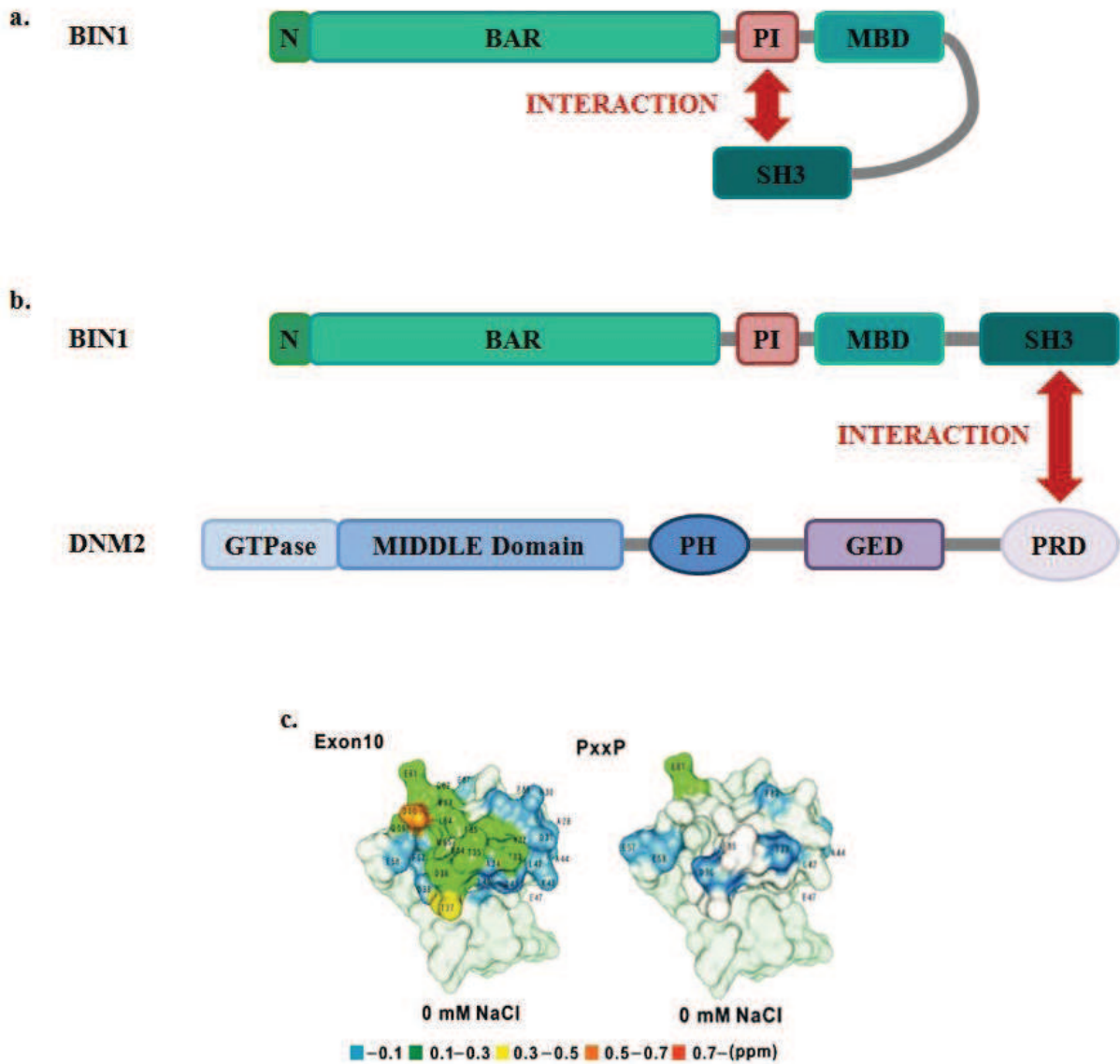
(a.) Deux isoformes de l'amphiphysine 2

Il existe plusieurs isoformes de l'amphiphysine 2 dont l'isoforme musculaire BIN1 (iso8). Ces isoformes partagent certains domaines en commun mais ont des domaines différents qui leur donnent parfois leur spécificité. Ainsi l'isoforme 8, BIN1 possède un domaine PI unique à cette isoforme et qui lui permet d'être spécifiquement exprimé dans le muscle.

(b.) Structure des domaines N-BAR.

BIN1 est capable de sentir et de courber les membranes plasmiques grâce à ses domaines N-terminal et BAR, respectivement. Le domaine N-terminal est une hélice amphipatique avec une face hydrophile et une face hydrophobe. Cette dernière face va donc pouvoir s'insérer dans les membranes et commencer à courber les membranes en s'intercalant entre les phospholipides. Le domaine BAR va pouvoir former des dimères en forme de banane incurvée, dont les extrémités (croisement des hélices 2 et 3) vont interagir avec les PtdIns de la membrane. Puis il va pouvoir courber les membranes grâce à son hélice 1 et échafauder ainsi la courbure de la membrane plasmique.

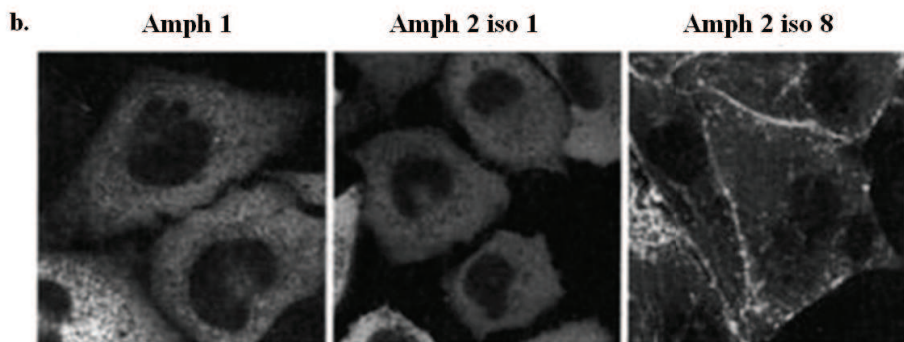
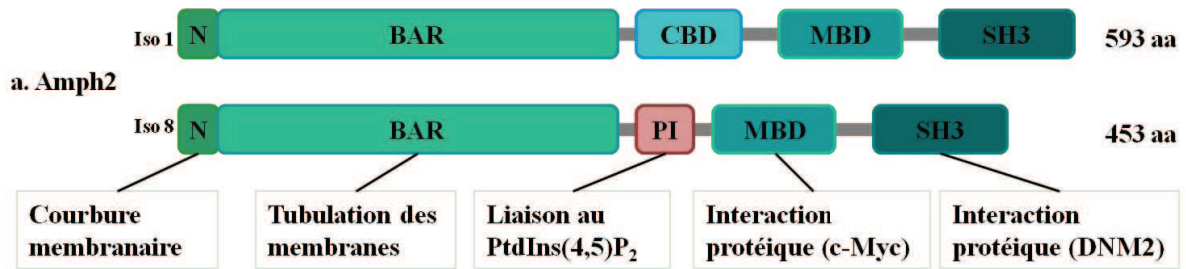
(D'après McMahon and Gallop, Nature, 2005; Casal et al., Biochemistry, 2006; Powell, Nature, 2009)



**Figure 11 : Le domaine SH3 de BIN1 et sa régulation**

- Le domaine SH3 de BIN1 est capable d'interagir avec le propre domaine PI de la molécule. Ce domaine PI est spécifique de l'isoforme musculaire de l'amphiphysine 2. Cette interaction se fait via des interactions électrostatiques.
- Le domaine SH3 est aussi capable de lier le domaine PRD de certaines protéines telles que la dynamine 2. Cette interaction se fait via des interactions hydrophobes.
- Le domaine de liaison du domaine SH3 au domaine PI chevauche partiellement celui du domaine PRD de la dynamine 2, ce qui empêche la liaison de la dynamine 2. Seul l'ajout de  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  est capable de lever cette inhibition en liant le domaine PI qui va alors libérer le domaine SH3.

(D'après Kojima et al., EMBO J, 2004)

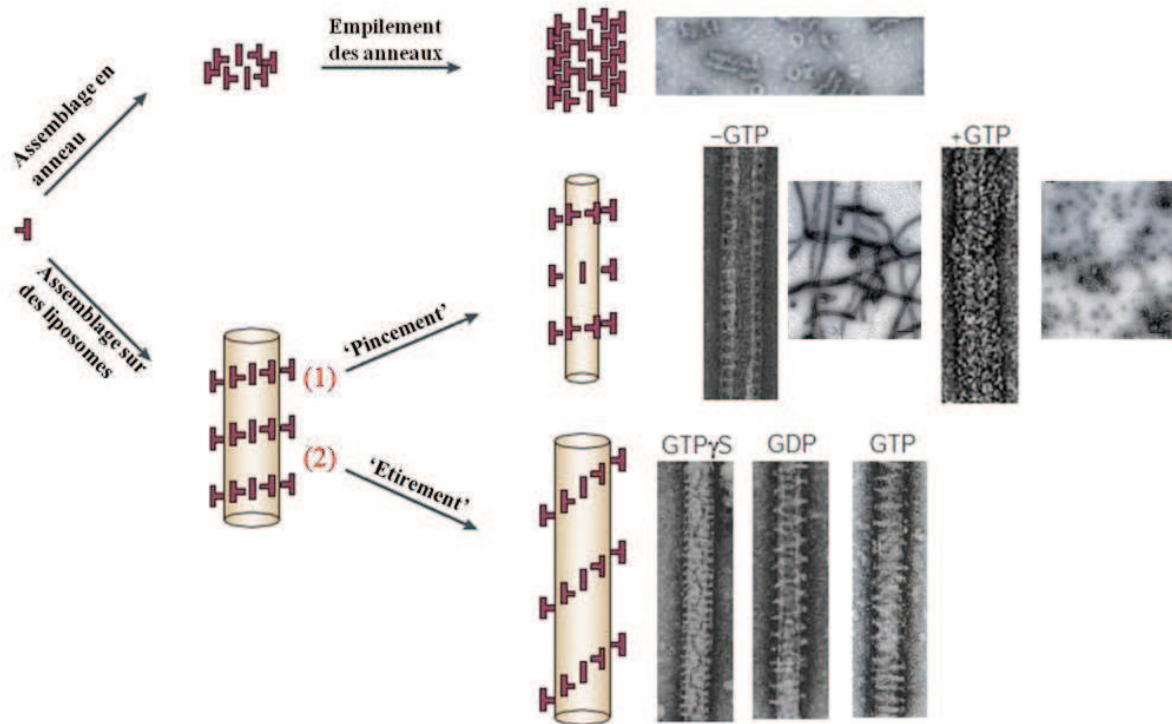
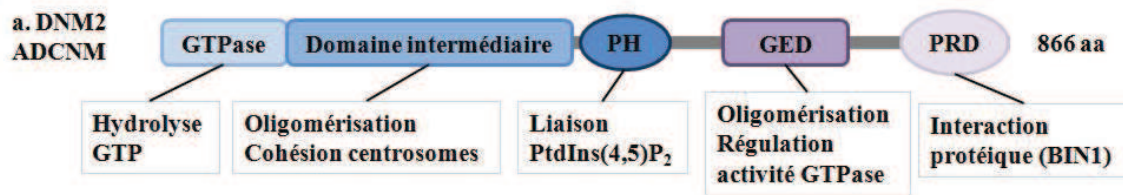


**Figure 12 : L'isoforme musculaire de l'amphiphysine 2, BIN1, tubule les membranes**

- (a) Les domaines des isoformes 1 et 8 de l'amphiphysine 2. Le domaine N-BAR permet de courber les membranes, tandis que le domaine SH3 peut interagir avec le domaine PI (spécifique de l'isoforme 8) et le domaine PRD de la dynamine 2. Le domaine PI est aussi capable de lier les phosphoinositides notamment le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. Ce domaine PI est absent dans les autres isoformes. Le domaine MBD est capable de lier la protéine c-Myc.
- (b) Surexpression de l'amphiphysine 1 et de deux isoformes de l'amphiphysine 2, isoforme 1 et 8, dans des cellules de mammifères. Seule l'isoforme 8 : BIN1, spécifique du muscle squelettique est capable de tubuler les membranes.

(D'après Lee et al., Science, 2002)





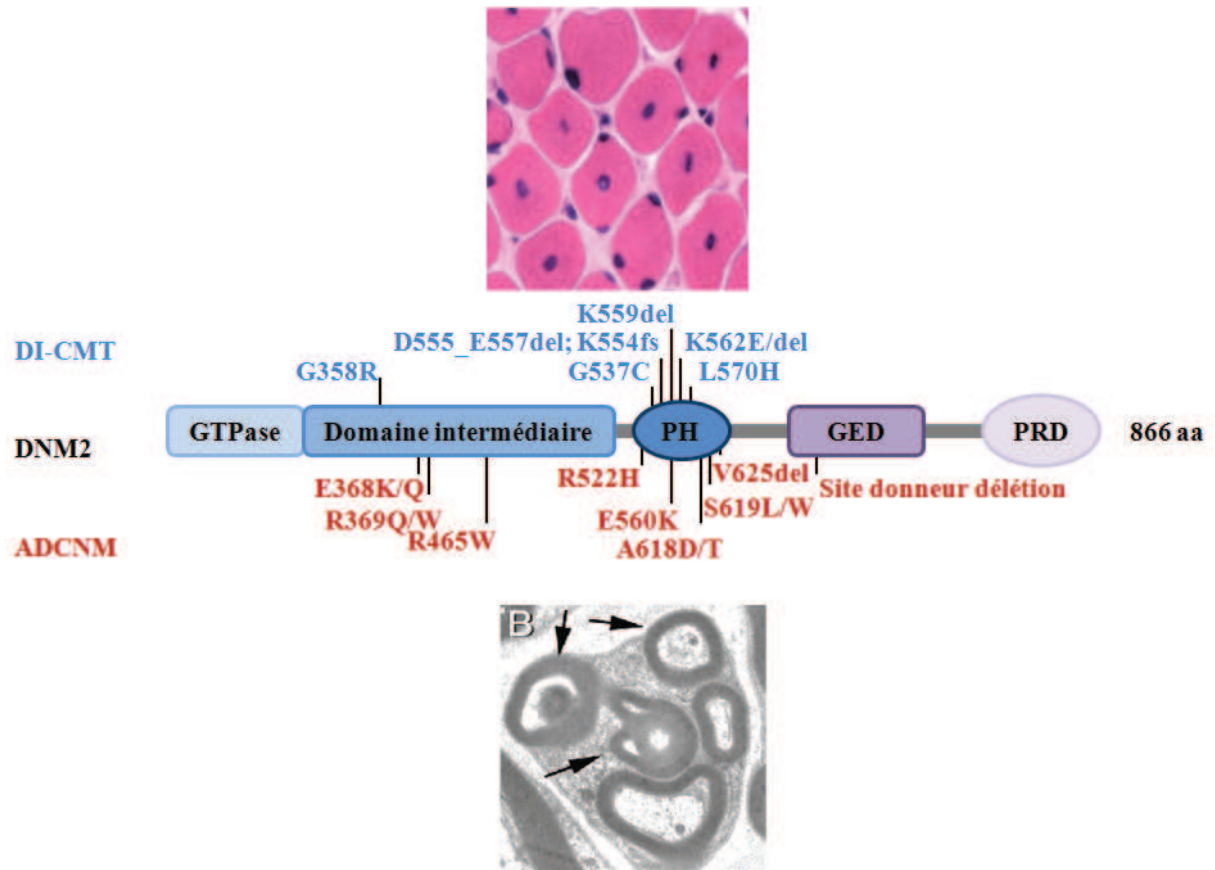
**Figure 13 : Action de la dynamine 2 suivant son activité GTPase**

(a) Les domaines de la dynamine 2.

La dynamine 2 est impliquée dans le remodelage des membranes et la formation de tubules ou de vésicules. En effet, via son domaine PH, la dynamine 2 est capable d'être dirigée à la membrane plasmique en interagissant avec le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. Elle pourra ainsi s'oligomériser via ces domaines GED et intermédiaire. Grâce à son oligomérisation elle pourra hydrolyser le GTP, ce qui va lui permettre de fissionner ou tubuler les membranes. Via son domaine PRD, elle pourra interagir avec des protéines contenant un domaine SH3 telle que l'amphiphysine 2/BIN1

(b) Des oligomères de dynamine peuvent se former grâce à l'action de ces domaines intermédiaires et GED. En présence de liposomes, ces oligomères peuvent soit pincer les tubules formés et ainsi fissionner ces tubules en vésicules en présence de GTP grâce à une activité GTPase forte (1), soit ils peuvent étirer les tubules en présence de GTP mais via une activité GTPase faible (2).

(D'après Praefcke and McMahon, Mol Cell Biol, 2004)

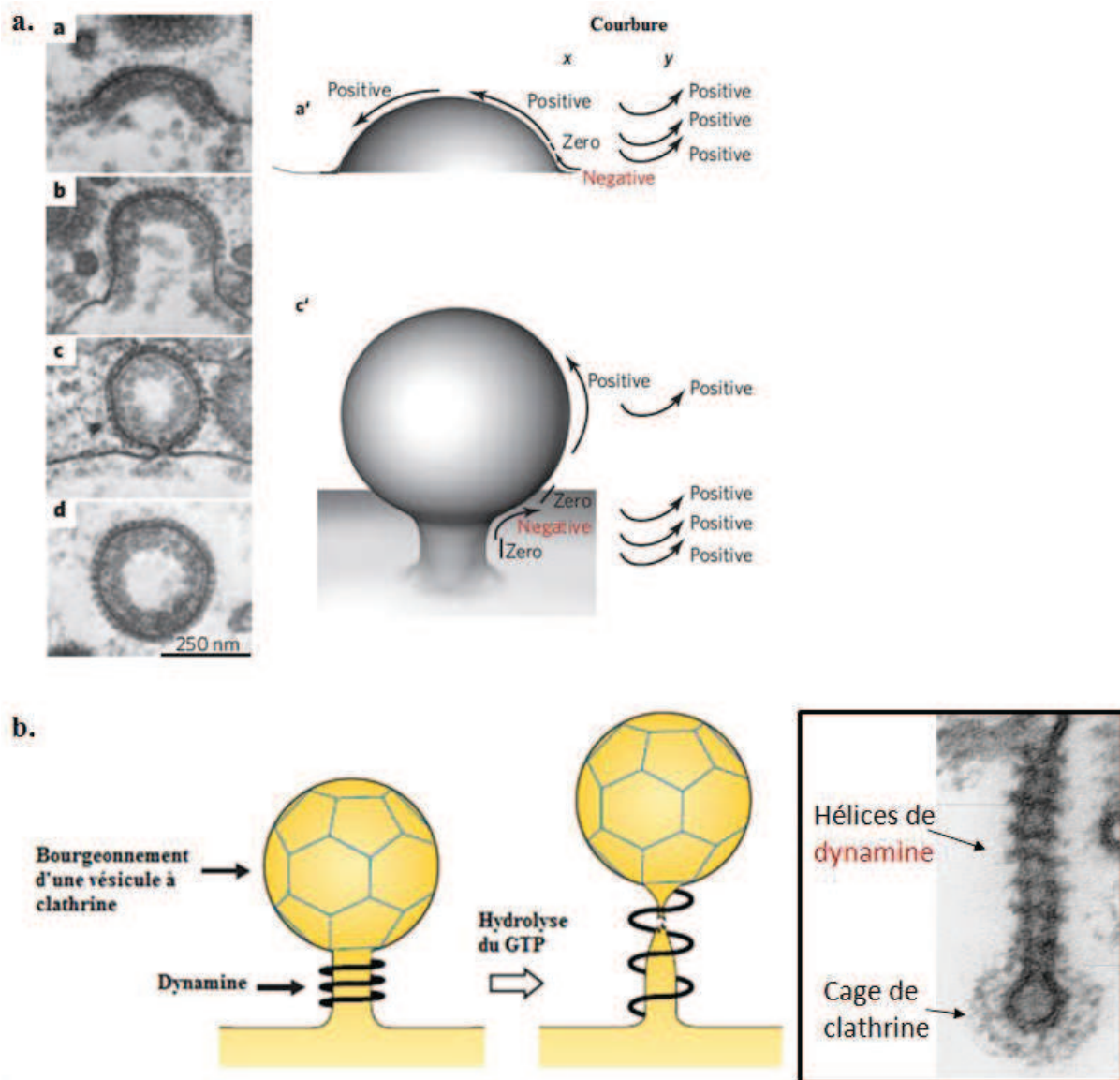


**Figure 14 : Mutations de la dynamine 2 dans les myopathies centronucléaires et dans les neuropathies de Charcot-Marie-Tooth**

La dynamine 2 fait partie de la famille des larges GTPases et est impliquée dans deux maladies humaines invalidantes : la forme autosomique dominante des myopathies centronucléaires et la forme intermédiaire dominante des neuropathies de Charcot-Marie-Tooth. Les mutations identifiées chez les patients CNM et CMT se retrouvent aussi bien dans les domaines intermédiaire, PH et GED. Ces mutations peuvent être des faux-sens, des délétions aussi bien pour les CNM que pour les CMT. La complexité de l'étude de la dynamine 2 réside donc dans le fait que ces deux domaines soient mutés et amènent soit à une anomalie au niveau des fibres musculaires soit à une anomalie au niveau des axones.

(D'après Pierson et al., 2005 et Bolino et al., 2004)

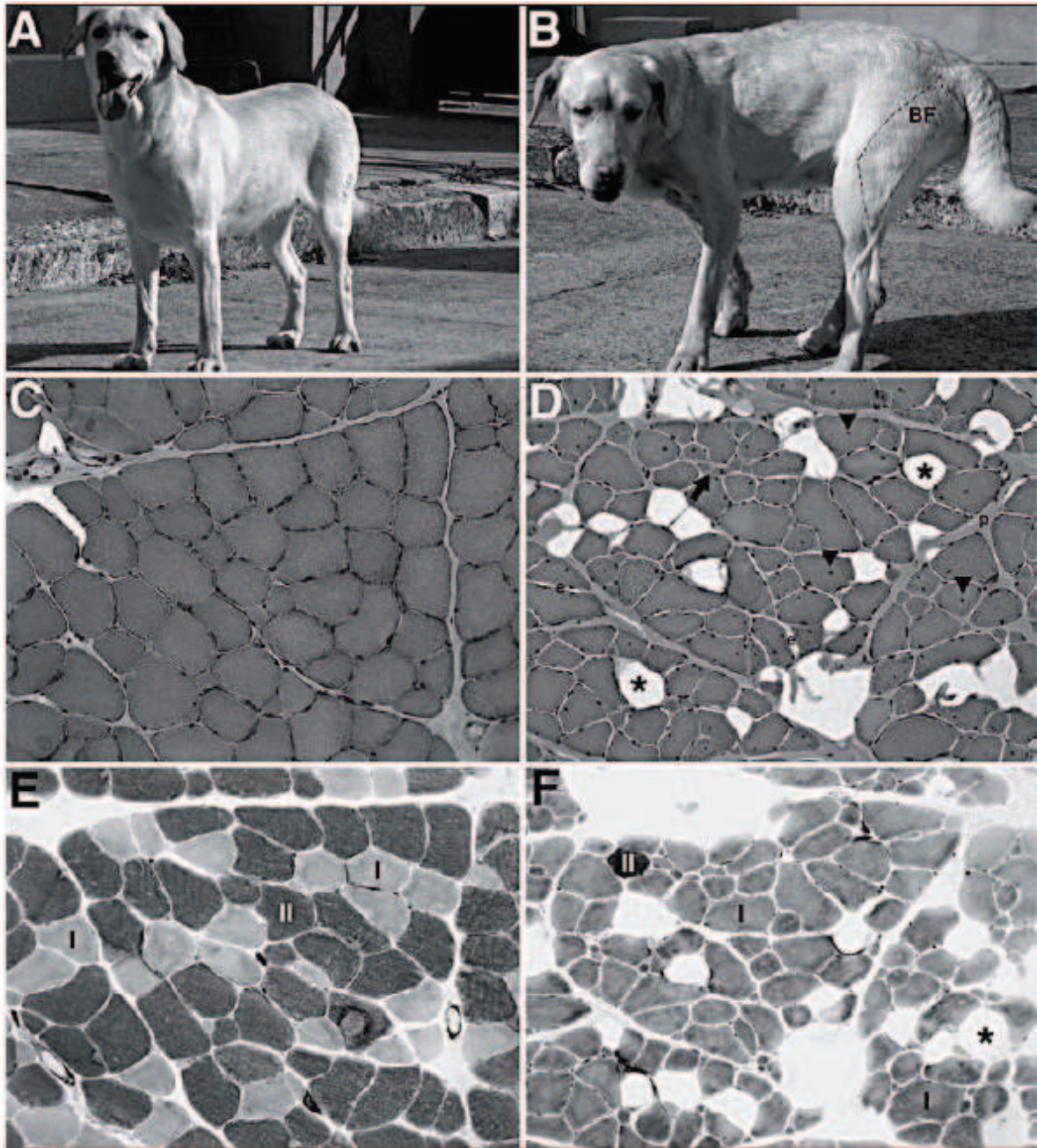




**Figure 15: La dynamine 2 dans l'endocytose des vésicules à clathrine**

- (a.) Les premières images des vésicules recouvertes de clathrine au microscope électronique.
- (b.) La dynamine 2 est capable d'être recrutée au niveau des vésicules à clathrine naissantes grâce aux phosphoinositides et aux protéines ayant un domaine SH3. Puis elle s'oligomérisse et est capable de fissionner les vésicules sous l'action de GTP.

(D'après McMahon et al., <http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/groups/hmm/Dynamin/>)



**Figure 16 : Cas spontanés de myopathie centronucléaire autosomique récessive chez le labrador**  
 (A)(B) L'examen clinique d'un chien (B) atteint de myopathie centronucléaire révèle une diminution générale du volume musculaire comparé à (A), un chien sain. La tête, le cou et le thorax sont étroits et la tête est souvent tombante à cause d'une déficience des muscles cervicaux. Les pattes sont déplacées rostralement sous le chien, conduisant à une posture anormale de l'animale. BF : Biceps fémoral.  
 (C-F) Coupes transversales d'un biceps fémoral (D,F) de chien myopathe comparé à (C, E), un chien sain.(C, D) une coloration hématoxyline-éosine montre la présence anormale de noyaux centraux (tête de flèche) dans les fibres musculaires du chien affecté, ainsi qu'une forme irrégulière et une atrophie des fibres (flèche). (E-F) Un marquage ATPase à pH 9,4 révèle une prédominance des fibres de type I chez le chien malade.  
 Les fibres sont jointives et certaines fibres sont remplacées par du tissu lipidique (astérisque).

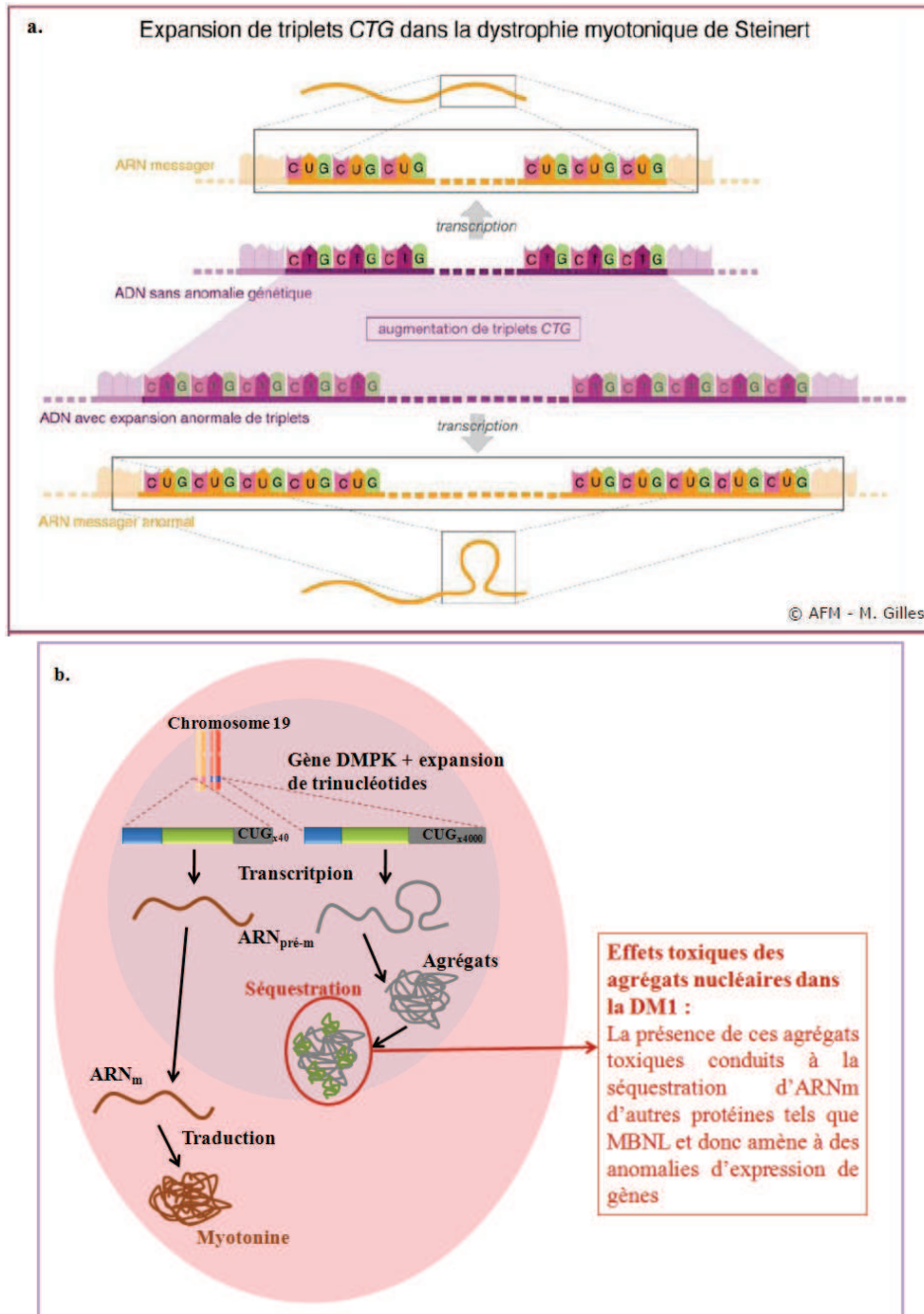
(D'après Tiret et al., 2003)

	<b>DM 1 (Steinert)</b>	<b>DM 2 (PROMM)</b>
<b>Epidémiologie</b>	Quasi-universelle	Surtout en Europe
<b>Age de début</b>	Tout âge	Adolescence à adulte tardif
<b>Anticipation</b>	+	-
<b>Forme congénitale</b>	+	-
<b>Faiblesse</b>	+	+/-
<b>  Faciale</b>	+	++
<b>  Proximale</b>	++	+
<b>  Distale</b>		
<b>Myalgies</b>	-	+
<b>Hypertrophie mollets</b>	-	+
<b>Cataracte</b>	+	+
<b>Calvitie</b>	+	+
<b>Troubles cardiaques</b>	++	+
<b>Hypogonadisme</b>	+	+
<b>Hyperglycémie</b>	+	+
<b>Hypersomnie diurne</b>	+	+
<b>Myotonie à l'EMG</b>	++	+
<b>Retard mental</b>	+	-
<b>Locus</b>	19q13.3	3q21
<b>Gène muté</b>	<i>DMPK</i>	<i>ZNF9</i>
<b>Expansion</b>	Triplets CTG	Quadruplets CCTG
<b>Taille expansion</b>	50 à 4 000	75 à 11 000 (moyenne 5 000)

**Tableau 2 : Comparaison entre les dystrophies myotoniques de type 1 (Steinert) et de type 2**

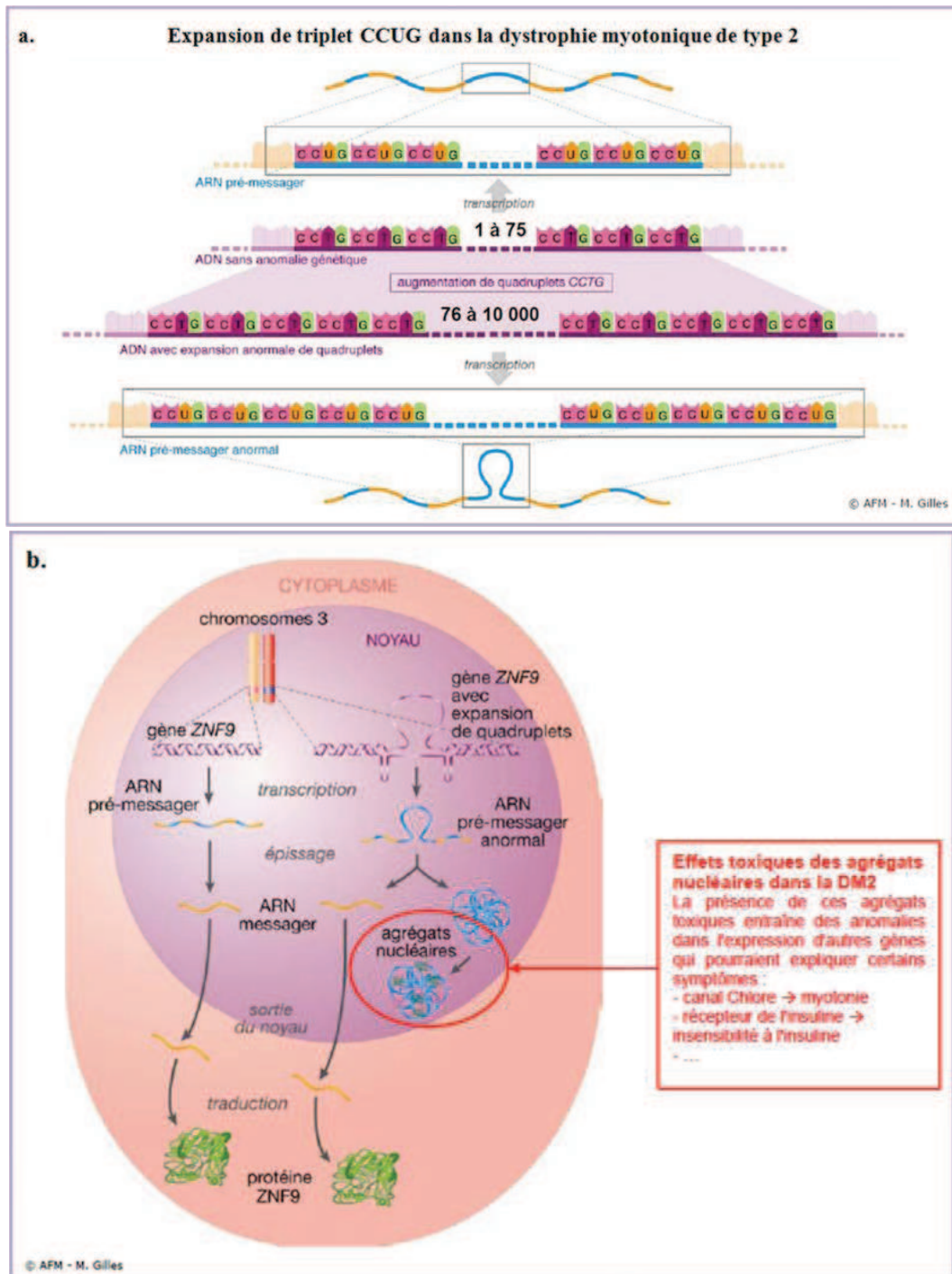
Les dystrophies myotoniques sont caractérisées par une myotonie et une faiblesse musculaire généralisée. Deux types de dystrophies myotoniques sont aujourd'hui bien décrits : la dystrophie myotonique de Steinert et celle de type 2. Des différences majeures existent entre ces deux formes et permettent de les distinguer telles que l'âge d'apparition des symptômes, l'anticipation des symptômes d'une génération à l'autre, et surtout les gènes et le type d'expansion impliqués.





**Figure 17 : Les dystrophies myotoniques de Steinert : implication du gène DMPK**  
 (a.) L'anomalie est due à une expansion CTG dans la région 3' non codante du gène DMPK, codant pour la myotonine. Cette expansion est transcrite lors de la phase de transcription.  
 (b.) Dans le noyau, le transcrit contenant l'expansion CUG anormale forme des agrégats toxiques qui vont séquestrer d'autres ARNm tels que MBLN, ce qui va alors altérer l'épissage d'autres ARNm.

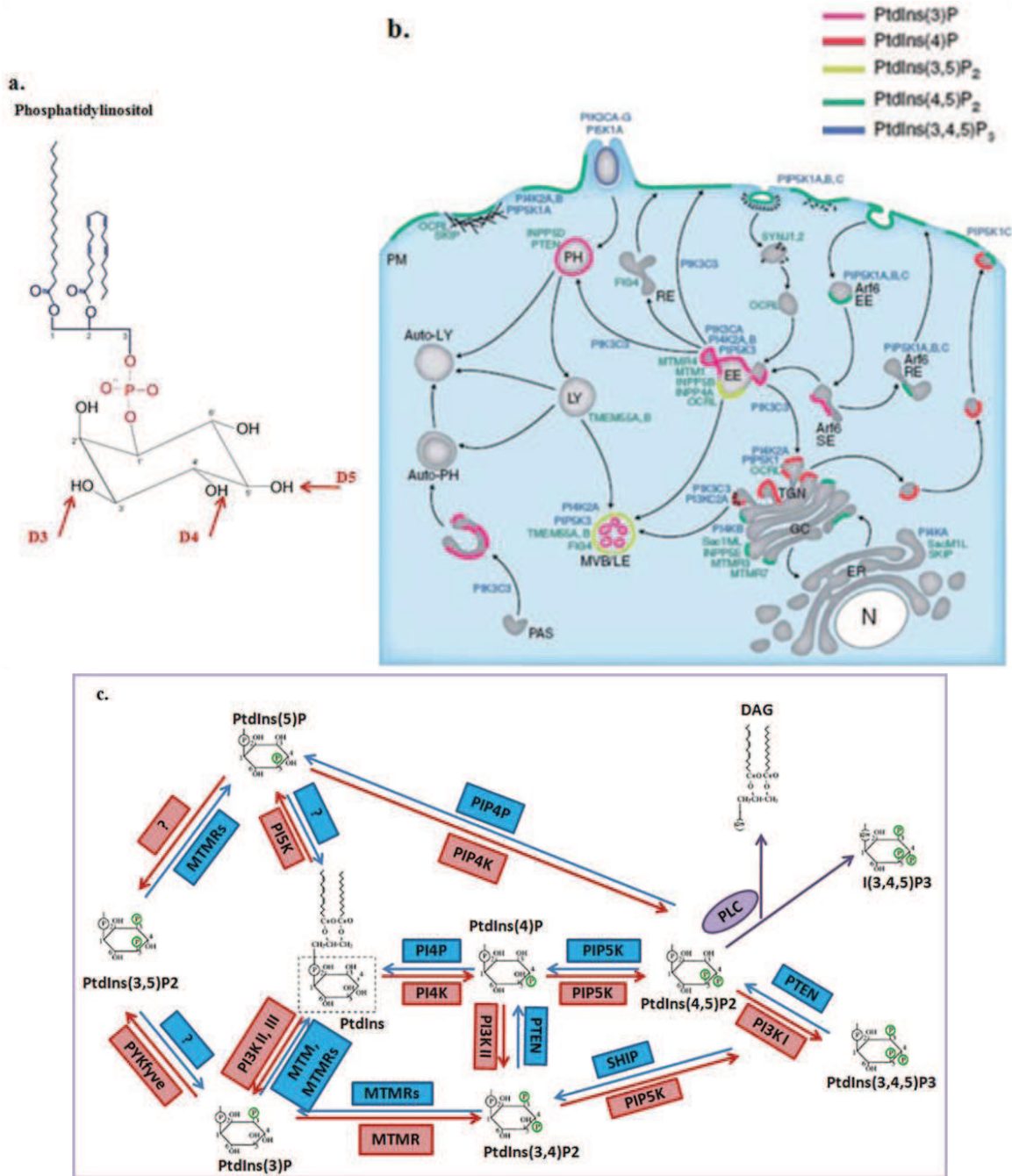
([http://www.afm-telethon.fr/resources/Media/225/file.zip/Z\\_Steinert\\_V2/index.htm](http://www.afm-telethon.fr/resources/Media/225/file.zip/Z_Steinert_V2/index.htm))



**Figure 18 : Les dystrophies myotoniques de type 2 : implication du gène ZNF9**

- (a.) L'anomalie est due à une expansion CCTG dans l'intron 1 du gène ZNF9, codant pour une protéine en doigt de zinc. Cette expansion est transcrite lors de la phase de transcription pour former le pré-ARN messager.
- (b.) Dans le noyau, le transcrit contenant l'expansion CCUG anormale est épissé mais l'expansion au lieu d'être dégradée, forme des agrégats toxiques qui vont séquestrer d'autres ARNm tels que MBNL, ce qui va alors altérer l'épissage d'autres ARNm

([http://www.afm-telethon.fr/resources/Media/220/file.zip/avancees2010\\_dm2/index.htm](http://www.afm-telethon.fr/resources/Media/220/file.zip/avancees2010_dm2/index.htm))



**Figure 19 : Les phosphoinositides, leur localisation et leur métabolisme**

- (a) Structure du phosphatidylinositol phosphate (PtdInsP). Le noyau inositol de ce PtdInsP peut être phosphorylé aux positions 3, 4 et 5 produisant ainsi l'ensemble des phosphoinositides (7 PIs au total)
- (b) Distribution subcellulaire des PIs et des enzymes qui les métabolisent. En bleu sont représentées les kinases, en vert les phosphatases. PM : plasma membrane, EE : early endosomes, Se : sorting endosome, RE : recycling endosome, LY : lysosome, MVB/LE : multivesicular body/late endosome, PAS : pre-autophagosomal structure, PH : phagosome, TGN : trans golgi network, GC : golgi complex, ER : endoplasmic reticulum, N : nucleus.
- (c) Le cycle des phosphoinositides. En rouge sont représentées les kinases et en bleu les phosphatases.

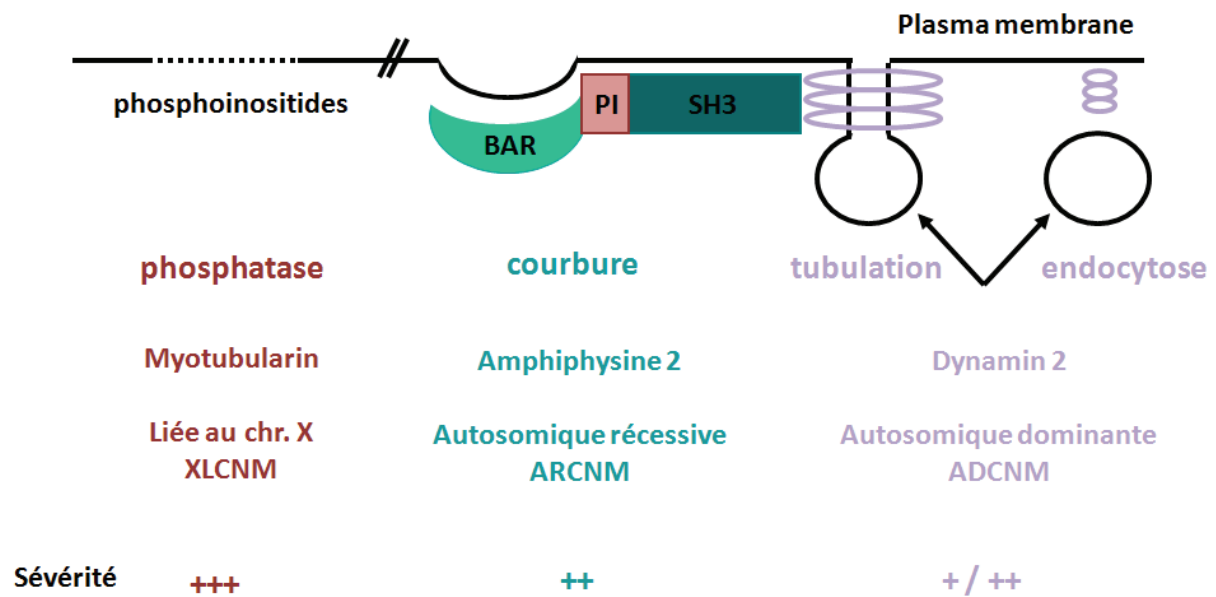
(D'après Vicinanza et al., 2008)



<b>Lipides</b>	<b>Domaines protéiques reconnus</b>	<b>Fonctions</b>	<b>Références</b>
<b>PtdIns</b>		<b>Précurseurs des PtdIns</b>	
<b>PtdIns(3)P</b>	<b>PX ; FYVE</b>	<b>Trafic vésiculaire ; endocytose</b>	<b>(Gillooly et al., 201)</b>
<b>PtdIns(4)P</b>	<b>PH ; ENTH/ANTH</b>	<b>Précurseur de PtdInsP2 Interaction avec la taline</b>	<b>(Godi et al., 2004 ; Heraud et al., 1998)</b>
<b>PtdIns(5)P</b>	<b>PX</b>	<b>Cytosquelette d'actine Apoptose</b>	<b>(Albi and Viola Magni, 2004 ; Sbrissa et al., 2004 ; Gozani et al., 2003)</b>
<b>PtdIns(3,4)P2</b>	<b>PH</b>	<b>Prolifération ; Survie ; Cytosquelette d'actine</b>	<b>(Janmey et al., 1999)</b>
<b>PtdIns(3,5)P2</b>	<b>PH</b>	<b>Trafic vésiculaire</b>	<b>(Cooke et al., 1998 ; Yamamoto et al., 1995)</b>
<b>PtdIns(4,5)P2</b>	<b>PH ; PX ; ENTH/ANTH ; FERM ; C2</b>	<b>Substrat des PLC (formation de DAG et de IP3) Précurseur de PtdInsP3 Endocytose ; Cytosquelette d'actine</b>	<b>(Berridge, 1984 ; Rhee and Bae, 1997) (Vanhaesebroeck et al., 2001) (Kanzaki et al., 2004 ; Botelho et al., 2000 ; Doughman et al., 2003)</b>
<b>PtdIns(3,4,5)P3</b>		<b>Prolifération ; Survie ; Cytosquelette d'actine</b>	<b>(Janmey et al., 1999)</b>

**Tableau 3 : Les domaines protéiques liant les phosphoinositides**

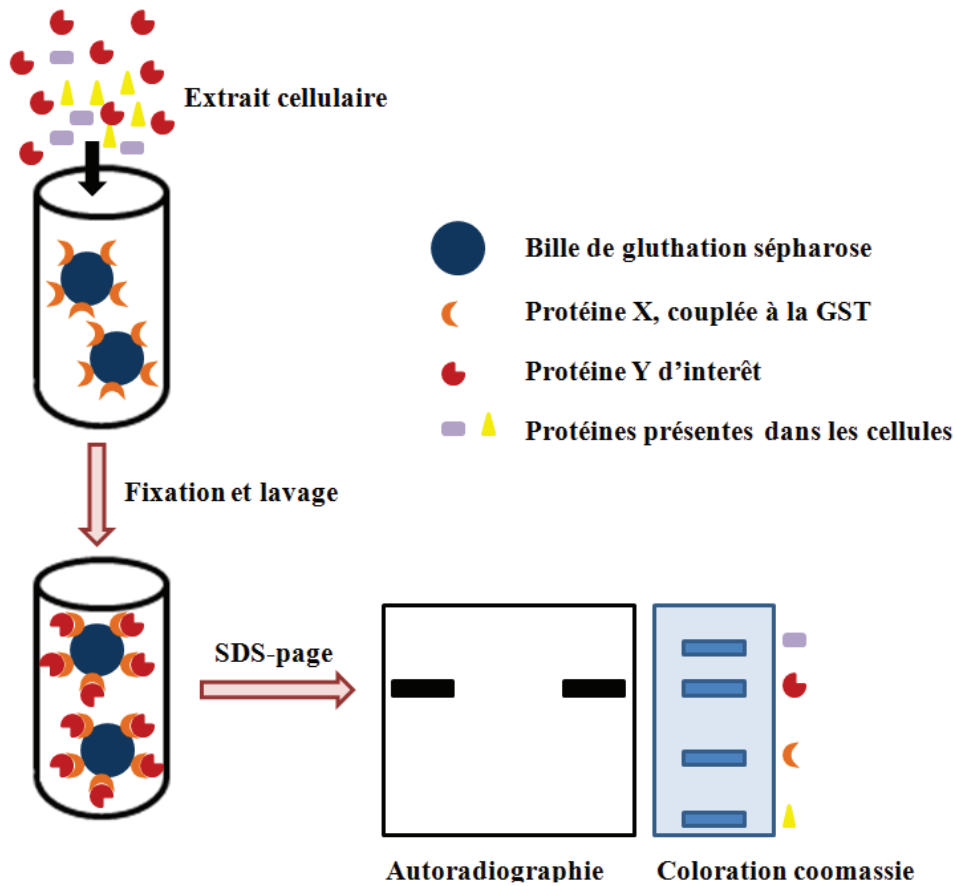
Les phosphoinositides ont des rôles centraux dans la cellule puisqu'ils sont au centre du trafic membranaire, de la prolifération et de la survie cellulaire, ainsi que d'autres mécanismes importants pour le bon fonctionnement de la cellule. Pour cela, ils doivent pouvoir être reconnus grâce à des domaines spécifiques, présents non seulement dans les phosphatases et les kinases qui les régulent mais aussi au niveau de protéines qui peuvent les lier afin d'être dirigée vers des compartiments spécifiques de la cellule.



**Figure 20 : Hypothèse sur un potentiel lien MAD (Myotubularine/Amphiphysine/Dynamine)**

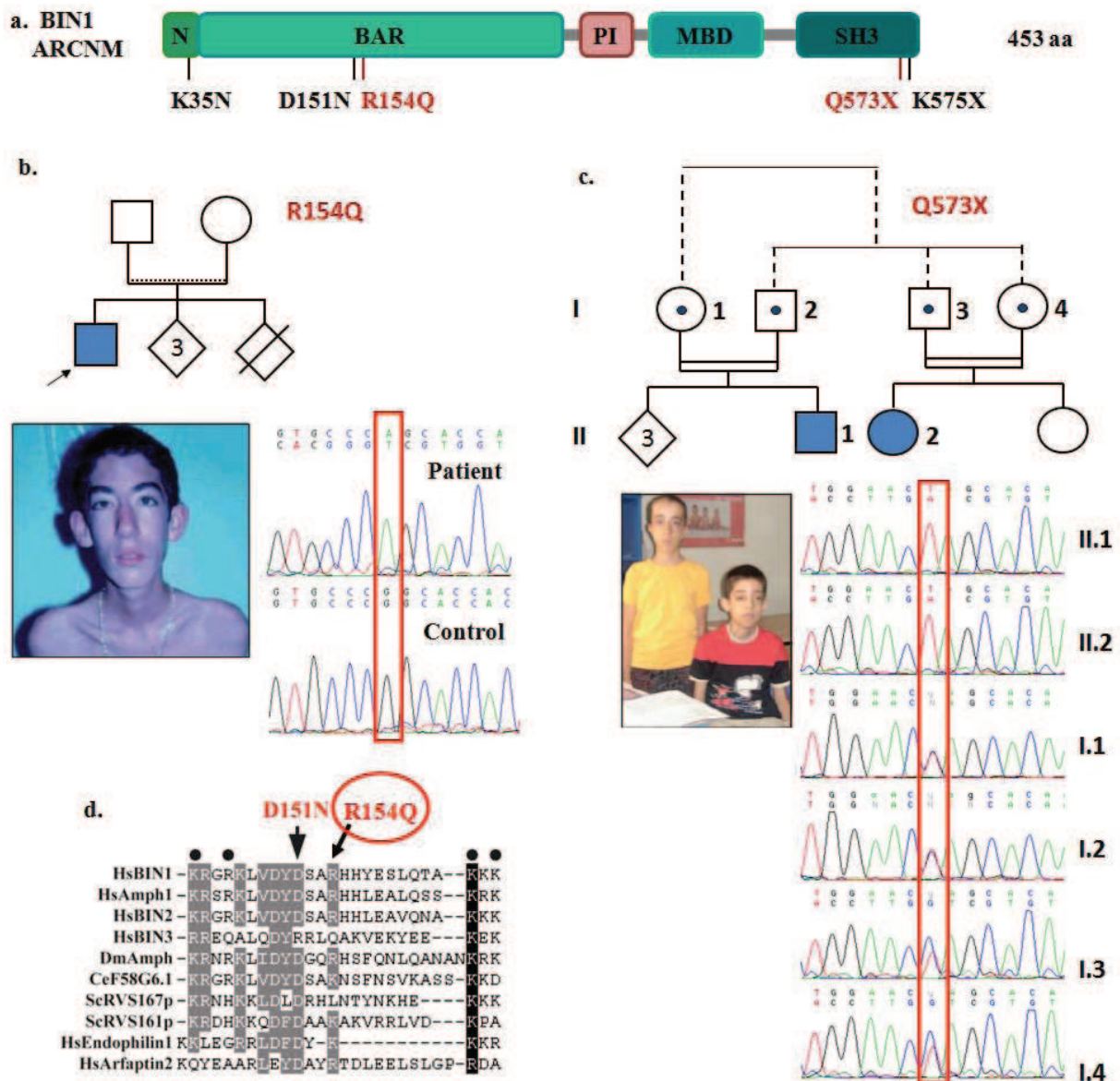
Les trois protéines mutées dans les myopathies centronucléaires sont toutes impliquées dans le trafic membranaire. En découvrant des mutations dans l'isoforme musculaire BIN1 de l'amphiphysine, nous avons émis l'hypothèse que ces trois protéines devaient participer à un même mécanisme déficient chez les patients. C'est à partir de cette hypothèse que se sont basés mes travaux de thèse.

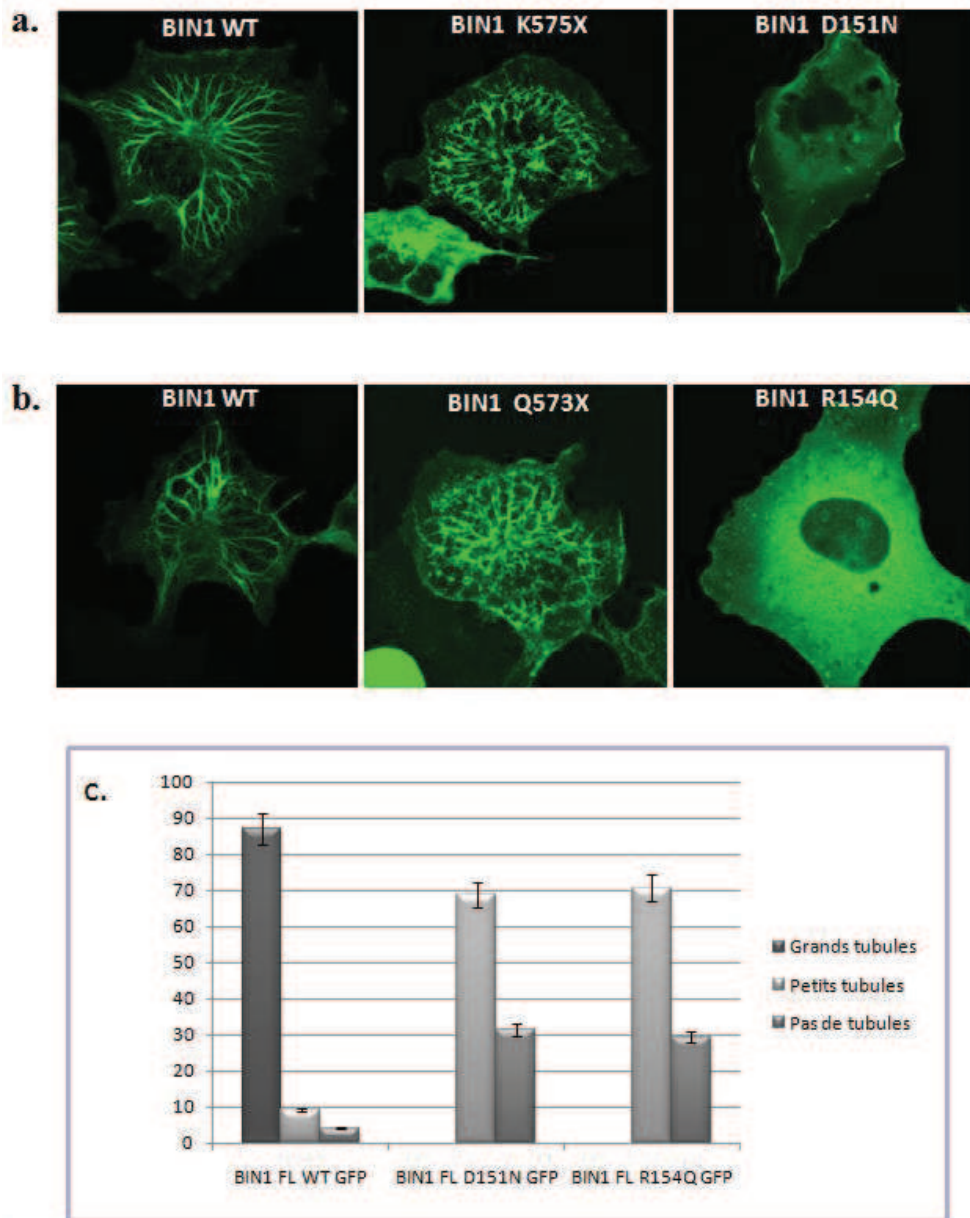
Dans cette hypothèse, la myotubularine serait la première protéine impliquée elle déphosphorylerait les phosphoinositides qui interagiraient avec BIN1. BIN1 pourrait alors se lier à la dynamine 2 afin de tubuler les membranes. La dynamine 2 serait donc la dernière protéine impliquée dans cette voie.



**Figure 21 : Principe de la technique de GST « pull down »**

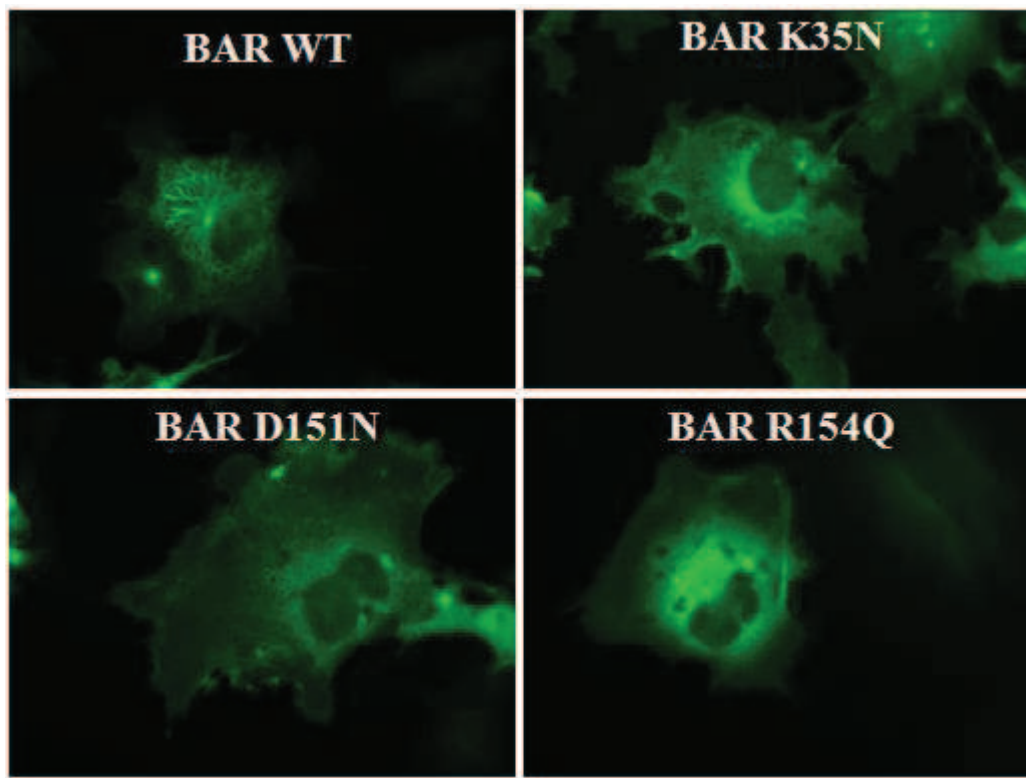
Lorsqu'on veut tester une interaction entre une protéine X et une protéine Y, on peut utiliser la technique de GST « pull down ». Dans ce test *in vitro*, la protéine X est fusionnée à la GST et fixée sur des billes de glutathion sépharose via l'interaction entre les billes et la GST. Des extraits cellulaires, surexprimant la protéine d'intérêt Y, sont alors passés sur ces billes. Après plusieurs lavages, l'analyse par western blot sur gel SDS-page et par coomassie est réalisé pour voir ou non l'interaction entre X et Y, en utilisant un anticorps dirigé contre Y.





**Figure 23 : Tests *in vivo* de localisation cellulaire des mutations de BIN1 identifiées chez des patients ARCNM**

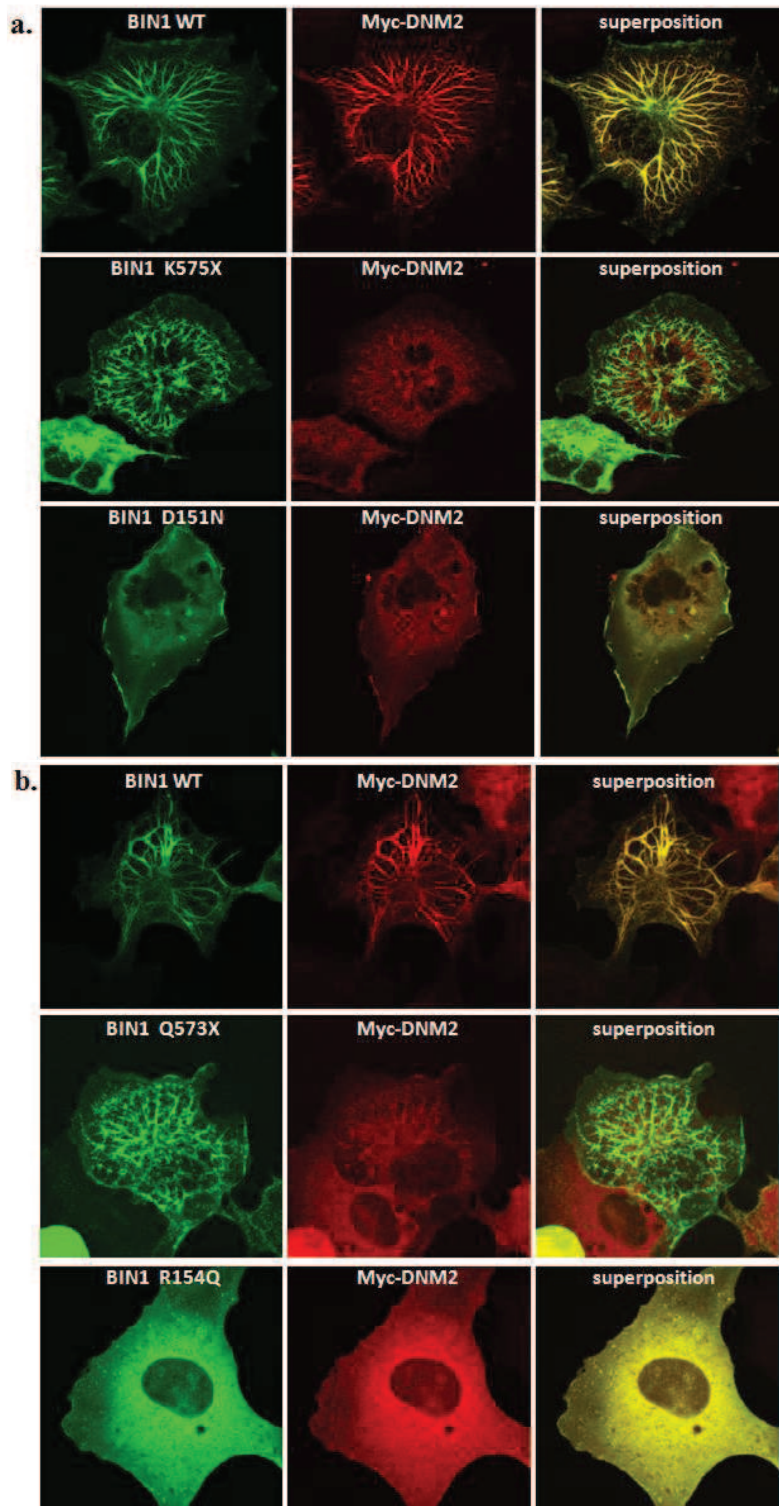
- (a) Surexpression dans des cellules COS de constructions d'ADN comportant les deux anciennes mutations : p.K575X et p.D151N fusionnées à la GFP. La mutation du domaine SH3 tout comme la protéine BIN1 sauvage est capable de tubuler les membranes contrairement à la mutation du domaine BAR qui ne forment soit aucun soit de petits tubules membranaires.
- (b) Surexpression dans des cellules COS des deux nouvelles mutations. Tout comme les anciennes mutations, la mutation p.Q573X, est capable d'induire la formation de tubules membranaires, contrairement à celle du domaine BAR, p.R154Q.
- (c) Quantification de trois expériences indépendantes. Pour chaque construction, nous avons analysé le pourcentage de cellules avec des grands (noir), des petits tubules membranaires (gris clair) et aucun tubule membranaire (gris foncé) Les mutants p.D151N et p.R154Q ne forment pas de grands tubules membranaires, mais uniquement des petits (40 à 50% des cellules) voir pas de tubules membranaires.



**Figure 24 : Tests *in vivo* sur la tubulation membranaire du domaine BAR seul**

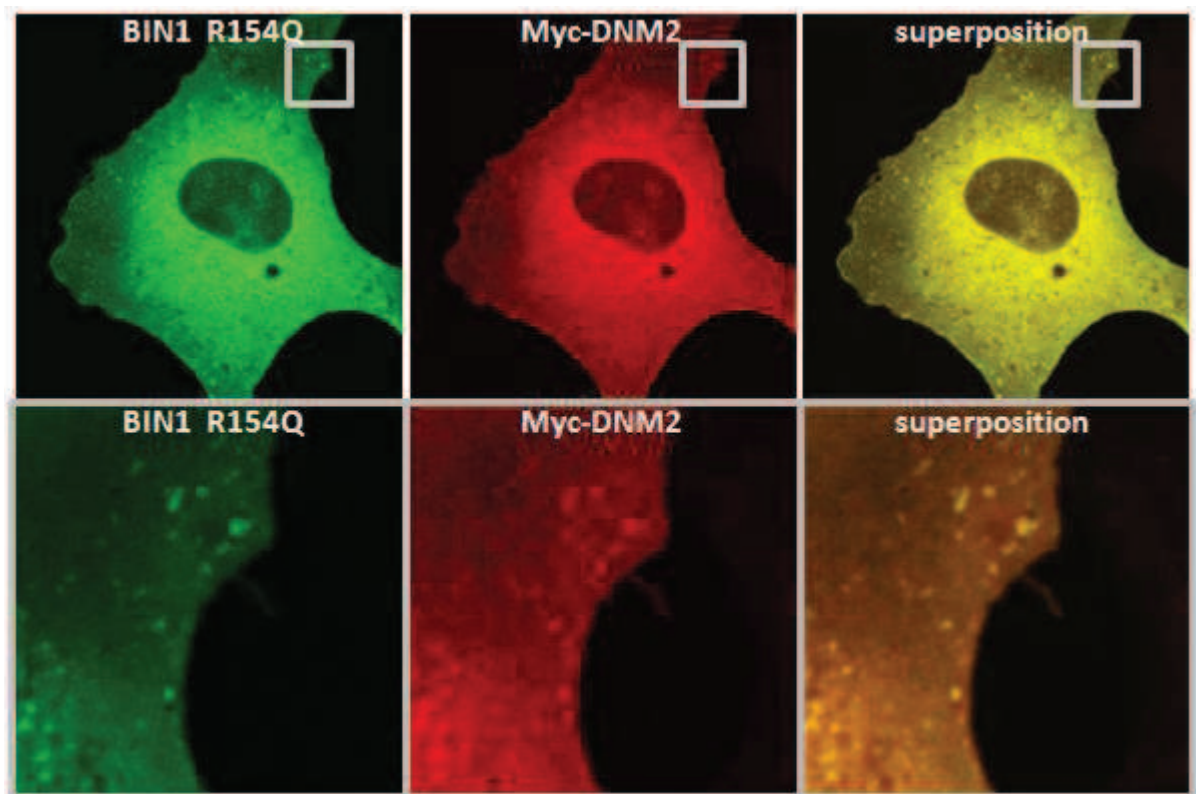
Les cellules COS ont été transfectées avec des constructions d'ADN codant pour le domaine BAR seul (BAR WT) et pour les mutants de ce domaine (BAR K35N, D151N et R154Q), fusionnés à la GFP. Le domaine BAR sauvage seul est capable d'induire des tubules membranaires en surexpression dans des cellules COS en culture, tandis que les mutants du domaine N-BAR : K35N, D151N et R154Q, ne sont plus capables de former de grands tubules membranaires.





**Figure 25 : Interaction et recrutement de DNM2 aux tubules membranaires formés par BIN1**

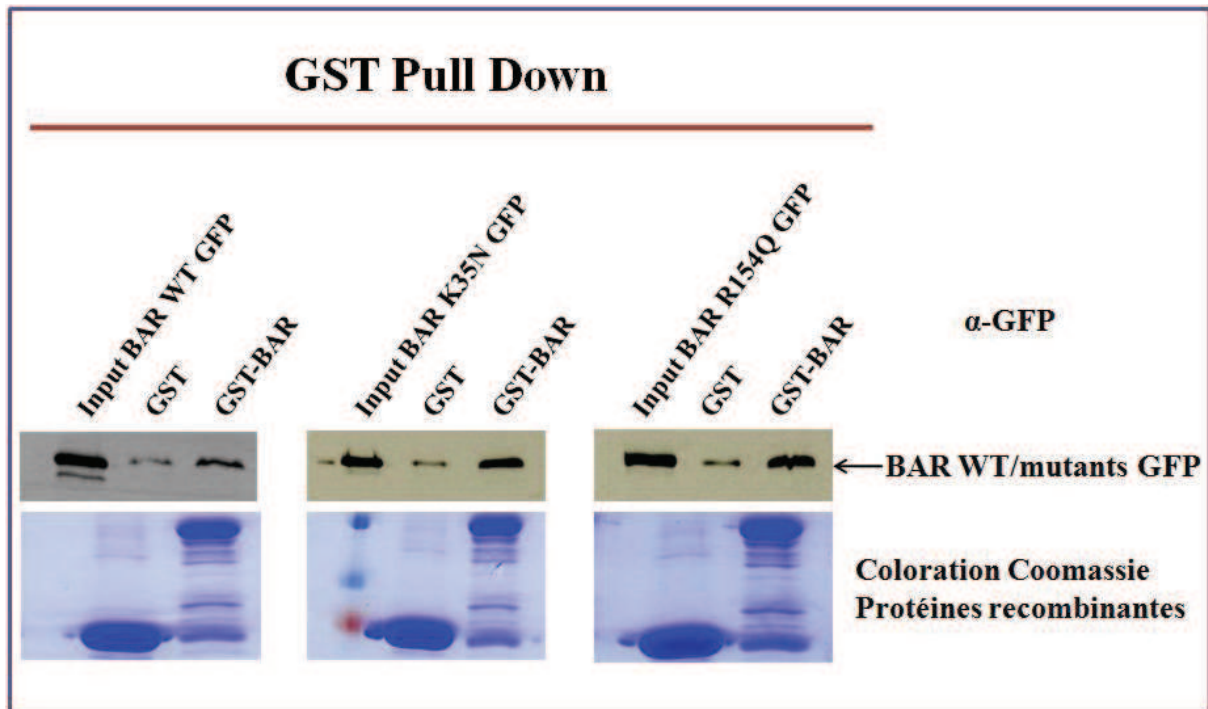
- (a) La surexpression de BIN1 sauvage est capable de recruter la dynamine 2 au niveau des tubules membranaires formés. Les cellules COS ont été transfectées avec la DNM2 sauvage fusionnée à Myc et BIN1 sauvage ou mutantes fusionnées à la GFP. La surexpression du mutant p.K575X diminue fortement ce recrutement de la dynamine 2.
- (b) La surexpression du nouveau mutant p.Q573X du domaine SH3 de BIN1 diminue aussi fortement le recrutement de la dynamine 2 au niveau des tubules formés.



**Figure 26 : Recrutement de la DNM2 aux petits tubules formés par un mutant du domaine BAR**

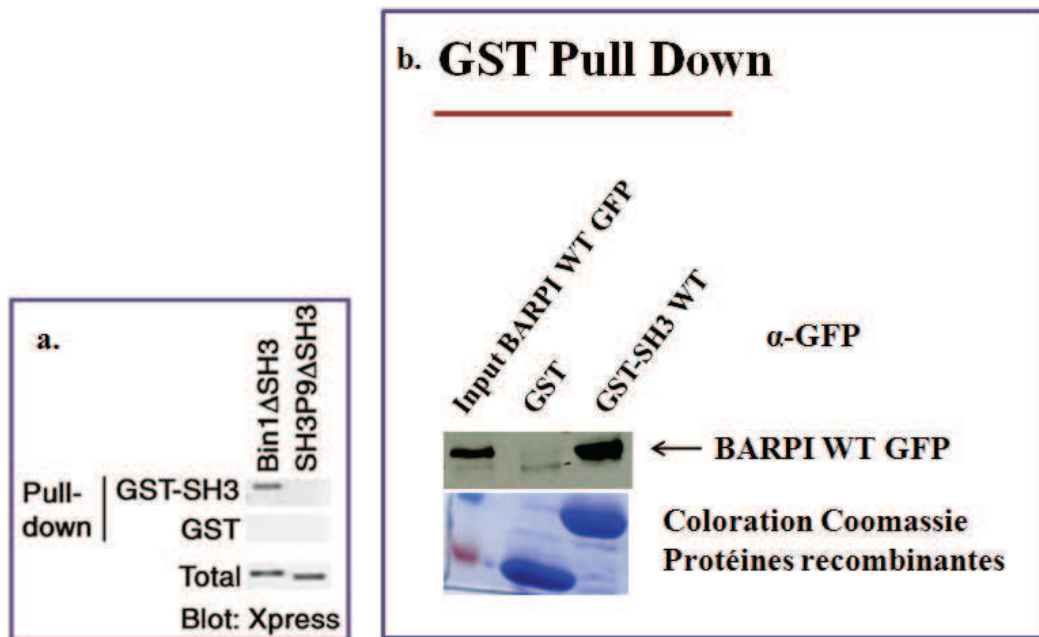
La dynamine 2 sauvage est capable d'être recrutée au niveau des petits tubules formés par la surexpression du mutant p.R154Q dans des cellules en culture. Les cellules COS ont été transfectées avec la DNM2 sauvage fusionnée à Myc et BIN1 mutant p.R154Q fusionné à la GFP.

Le recrutement de la dynamine 2 par BIN1 étant dépendante du domaine SH3, les mutations du domaine BAR n'ont donc pas d'impact sur cette interaction.



**Figure 27 : Homodimérisation du domaine BAR de BIN1**

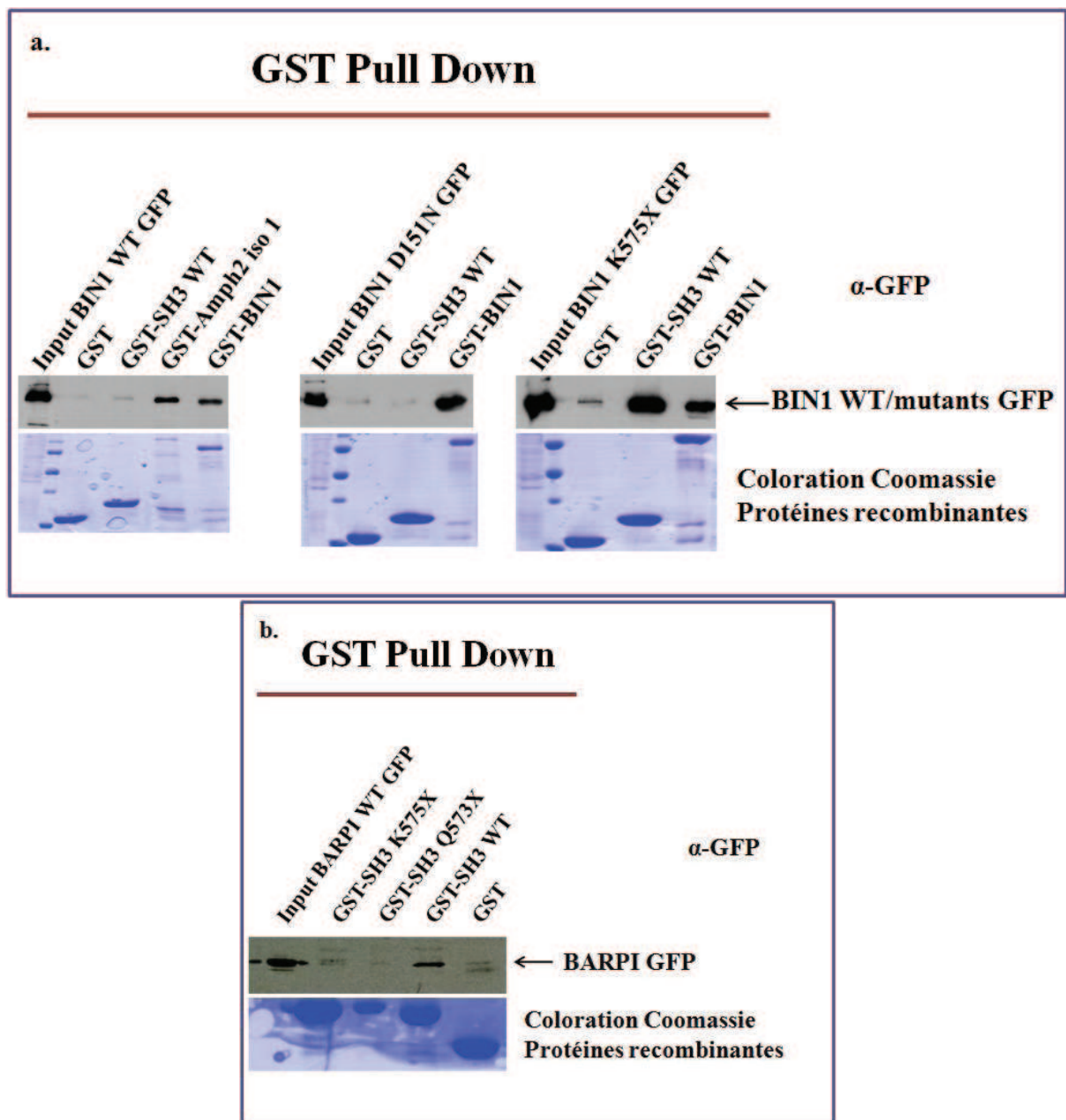
Le domaine BAR de BIN1 recombiné à la GST a été utilisé pour vérifier l'homodimérisation de ce domaine avec le même domaine BAR sauvage (BAR WT) ou mutants (BAR K35N et R154Q) fusionnés à la GFP et surexprimé dans des cellules COS. Les résultats du haut montrent le western blot final hybridé avec un anticorps anti GFP. Les résultats du bas montrent le gel de coomassie marquant les protéines recombinantes du même gel d'acrylamide.



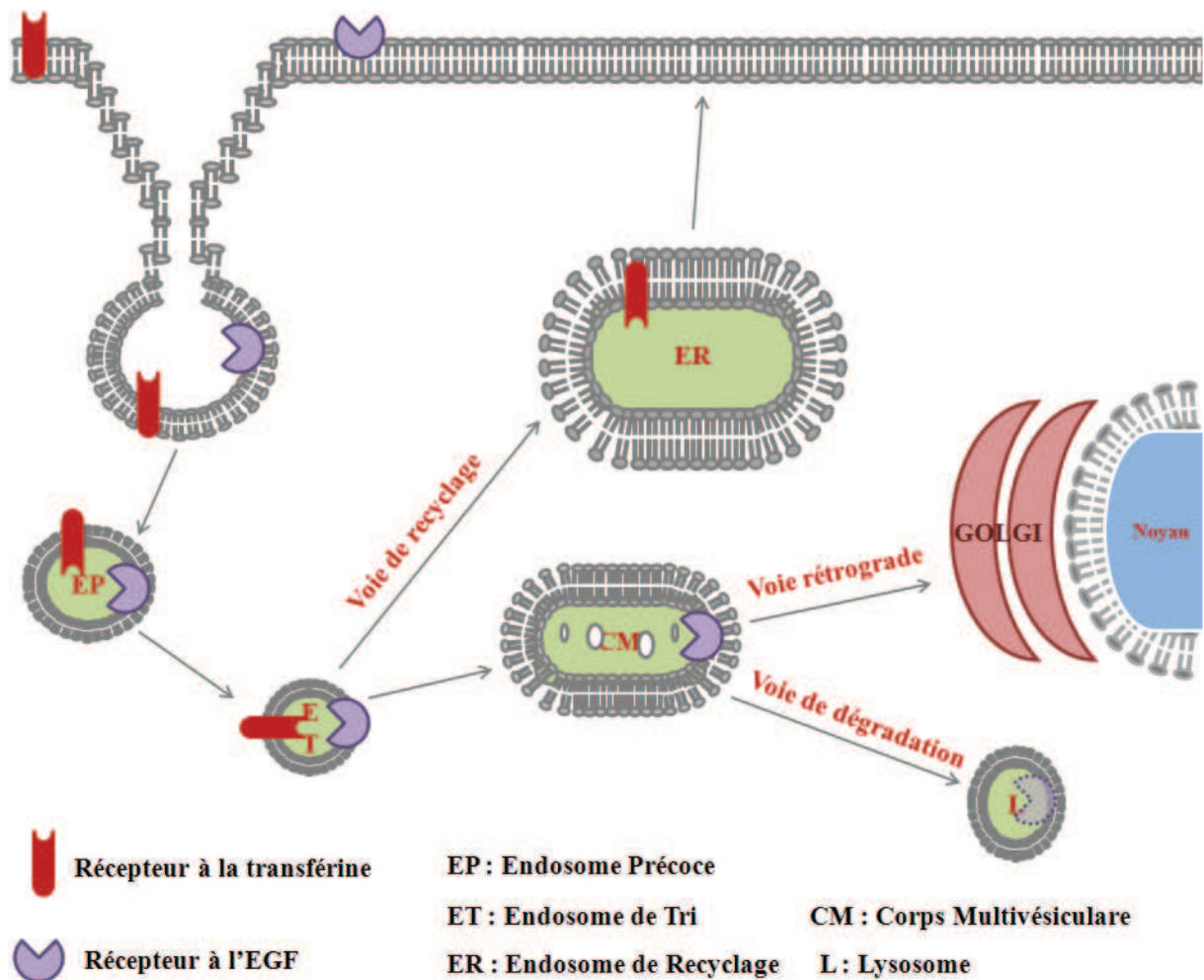
**Figure 28 : Interaction intra et/ou intermoléculaire du domaine SH3 avec le domaine PI de BIN1**

- (a) Résultats de Kojima et collègues, 2004. Le domaine SH3 de BIN1 recombiné à la GST a été utilisé pour vérifier l'interaction de ce domaine avec la protéine BIN sauvage déléetée de son domaine SH3 (BIN1ΔSH3) et la protéine BIN1 déléetée de son domaine SH3 et PI (SH3P9ΔSH3), fusionnées à la GFP et surexprimées dans des cellules COS. Les résultats montrent que le domaine SH3 est capable de lier le domaine PI.
- (b) Résultats que j'ai obtenus lors de la reproduction de la même expérience. Le domaine SH3 recombiné à la GST a été utilisé pour vérifier cette interaction avec une protéine BIN1 déléetée de son domaine SH3 (BARPI), fusionnée à la GFP et surexprimée dans des cellules COS. Mes résultats sont en accord avec ceux de Kojima et collègues, puisque le domaine SH3 semble bien capable de lier le domaine PI.

(D'après Kojima et al., EMBO J, 2004)





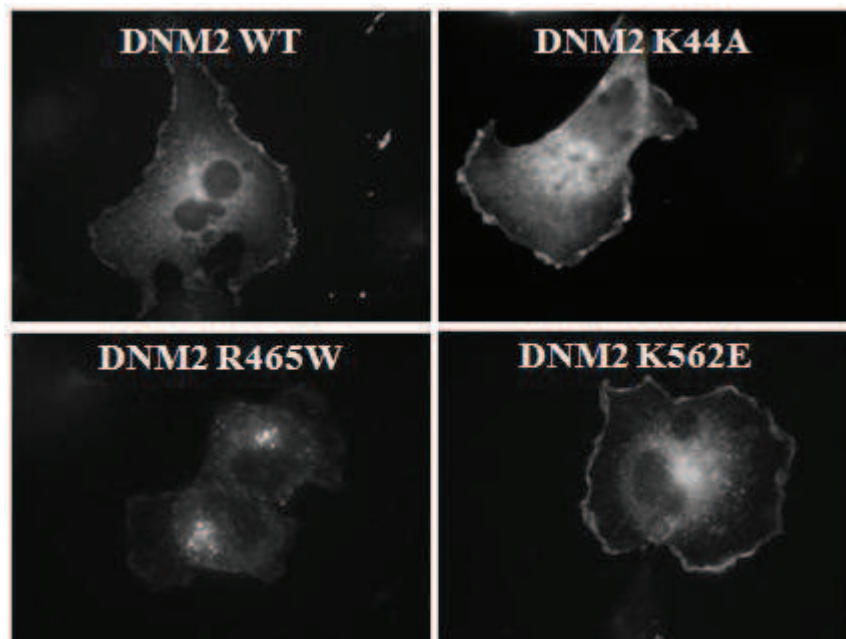


**Figure 30 : La voie d'endocytose de la transférine**

La transférine est capable de se lier à son récepteur qui va alors être internalisé par la voie d'endocytose des vésicules à clathrine impliquant la DNM2. Ce récepteur suit ensuite la voie d'endocytose classique via les endosomes précoces puis tardifs où il va être dirigé vers la voie de recyclage et des endosomes de tri pour être recyclé à la membrane plasmique. Cette endocytose de la transférine permet à la cellule d'endocyter en même temps du fer qui sera libéré du complexe récepteur-ferotransférine dans le compartiment endosomal tardif acide. L'apotransférine qui en résulte reste liée à son récepteur à ce pH et ils seront recyclés ensemble à la membrane plasmique, où le pH extérieur provoque le dégagement de l'apotransférine.

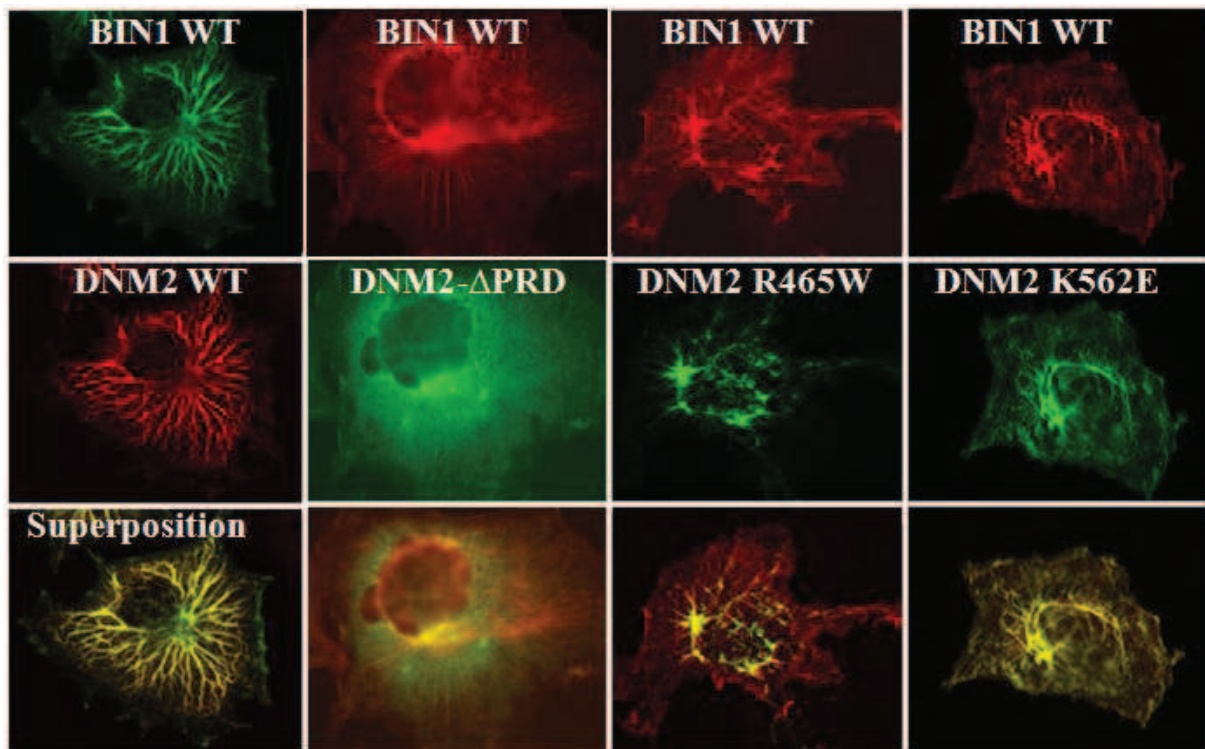
L'endocytose de l'EGF emprunte aussi la voie d'endocytose des vésicules de clathrine et donc implique le DNM2 mais l'EGF et son récepteur l'EGFR vont être dégradés dans les lysosomes via la voie de dégradation. Il y aura donc une diminution des EGFR à la surface de la cellule et une diminution de la sensibilité de la cellule à l'EGF, le temps pour la cellule de resynthétiser des EGFR.





**Figure 31 : Tests *in vivo* de localisation de la dynamine 2 et des mutants**

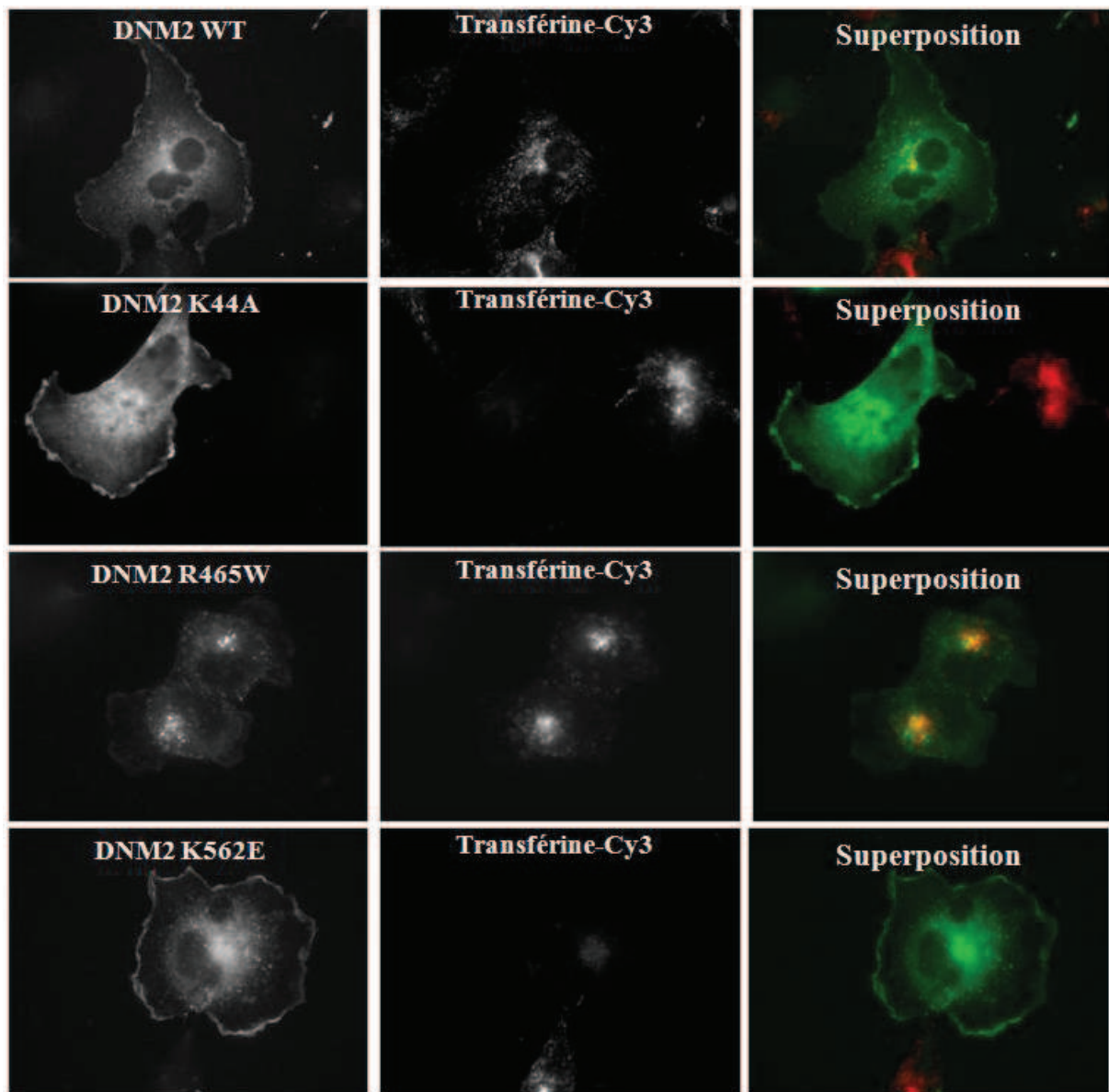
Les cellules COS ont été transfectées avec des constructions d'ADN codant pour la dynamine 2 sauvage (DNM2 WT) et pour les deux mutants de cette protéine (DNM2 R465W et K562E), fusionnés à la GFP. La dynamine 2 sauvage ainsi que le mutant p.K562E identifié chez un patient DI-CMT ont une localisation cytoplasmique et un marquage des ruffles de la cellule, contrairement au mutant p.R465W, qui semble avoir une localisation cytoplasmique en points et une concentration très proche du noyau.



**Figure 32 : Recrutement *in vivo* de la DNM2 aux tubules membranaires formés par BIN1**

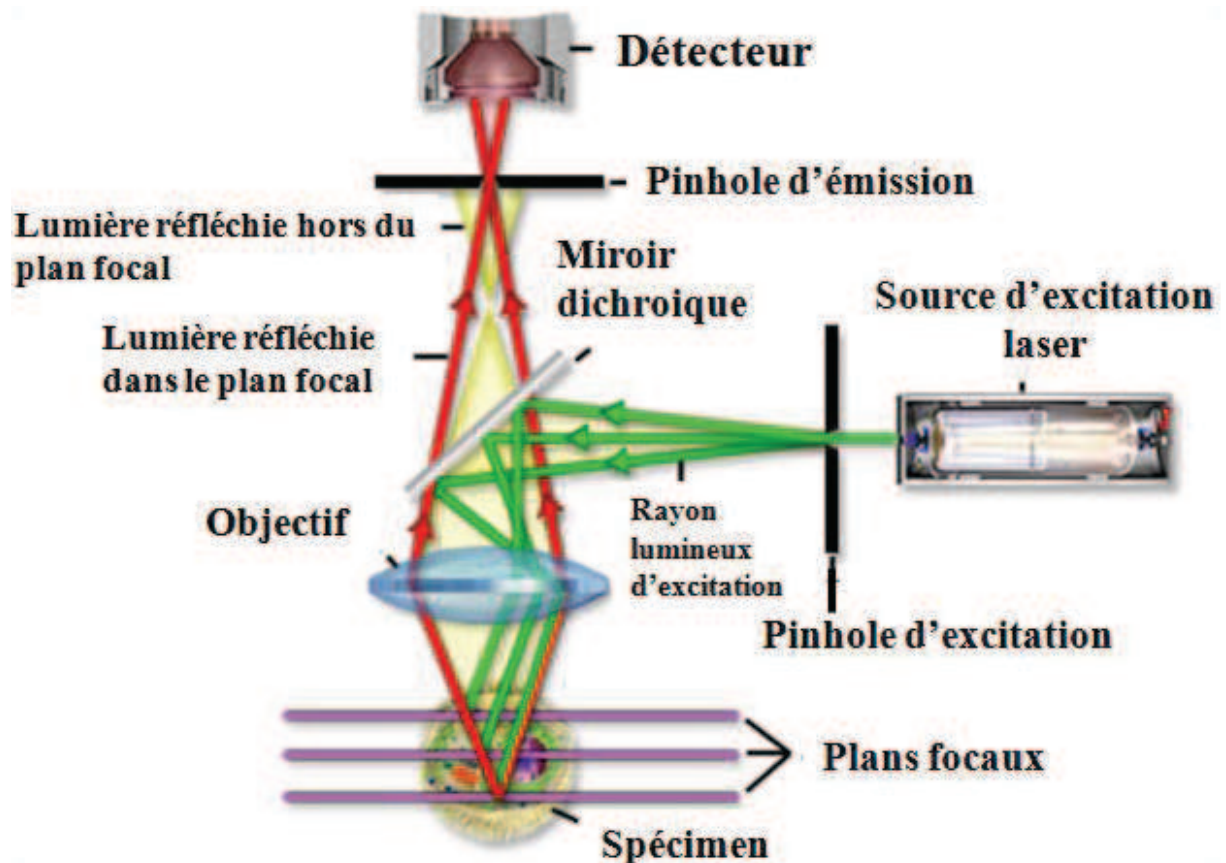
Les cellules COS ont été co-transfectées avec des constructions d'ADN codant pour la dynamine 2 sauvage (DNM2 WT) fusionnée à Myc, pour les deux mutants de cette protéine (DNM2 R465W et K562E) et pour un contrôle négatif (DNM2  $\Delta$ PRD), tous fusionnés à la GFP, avec une construction d'ADN de BIN1 sauvage (BIN1 WT), fusionnée soit à la GFP soit au Ds-Red.

L'isoforme BIN1 sauvage via son domaine SH3 est capable de recruter la Dynamine 2 sauvage via son domaine PRD et ce recrutement est toujours possible avec les mutants DNM2, contrairement à la dynamine déléetée de son domaine PRD.



**Figure 33 : Tests *in vivo* d'endocytose de la transférine avec la dynamine 2**

Les cellules COS ont été transfectées avec des constructions d'ADN codant pour la dynamine 2 sauvage (DNM2 WT), mutantes (DNM2 R465W et K562E) et pour un contrôle négatif (DNM2 K44A), fusionnées à la GFP et ont été incubées pendant 15 min avec la transférine-Cy3. La dynamine sauvage est capable d'internaliser la transférine tout comme le mutant p.R465W identifié chez un patient ARCNM, contrairement au contrôle négatif et au mutant p.K562E identifié chez un patient DI-CMT.

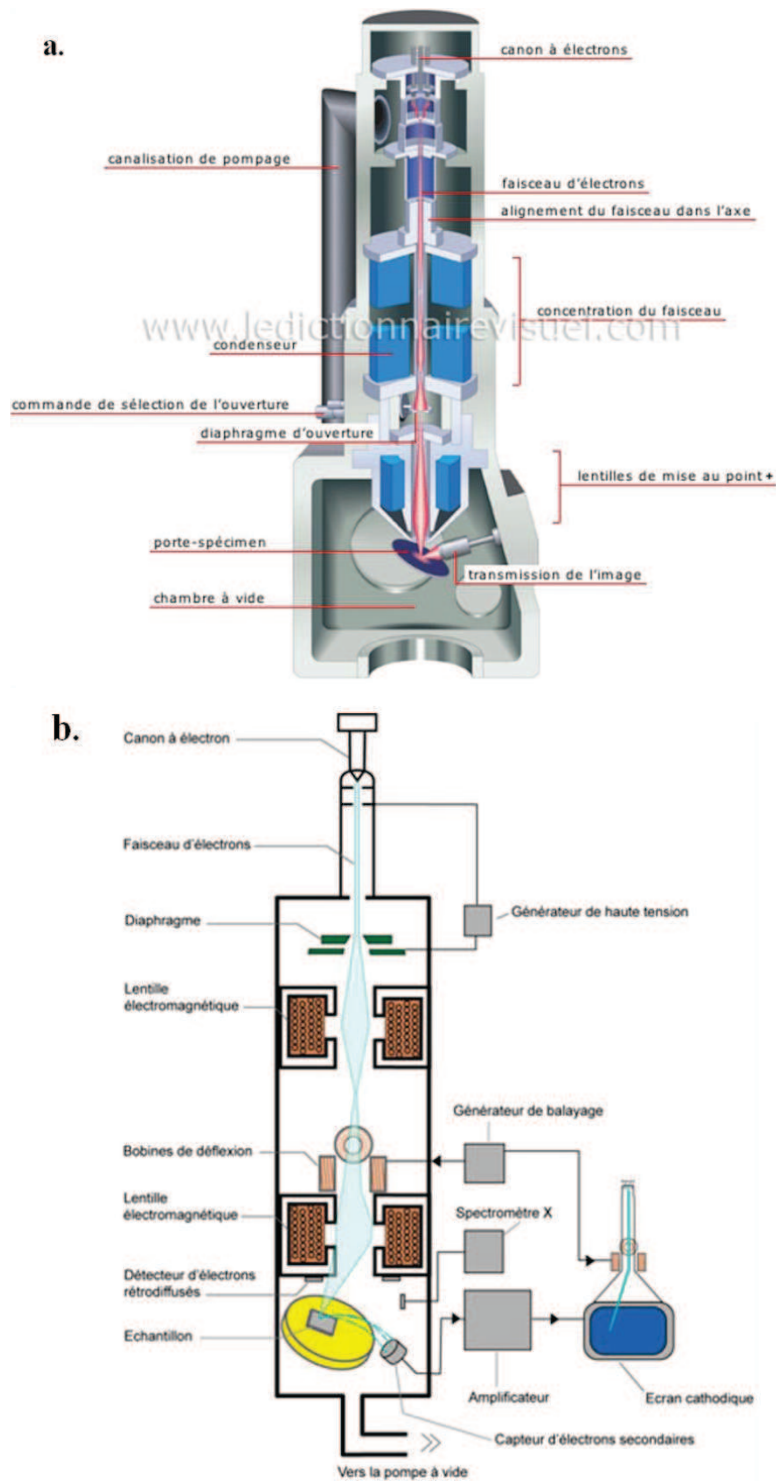


**Figure 34 : Principe de la microscopie confocale**

Un microscope confocale est un microscope optique qui peut fonctionner en lumière réfléchie ou en fluorescence. Il a la propriété de réaliser des images de très faible profondeur de champ, appelées sections optiques. Il est possible de réaliser des séries d'images à partir desquelles on peut obtenir une représentation tridimensionnelle de l'objet.

Les rayons d'un faisceau laser sont réfléchis, par un miroir dichroïque, en direction du spécimen. Ce faisceau balaie point par point un plan du spécimen. Les photons diffractés traversent un diaphragme situé dans le plan focal du système optique : les photons parasites sont donc éliminés tandis que ceux qui traversent le diaphragme gagnent un détecteur de photons reliés à un ordinateur. Un moniteur permet de voir l'image numérisée du plan balayé par le faisceau laser. Il est possible de balayer plan par plan et d'obtenir une reconstructions 3D.

[http://serc.carleton.edu/images/microbelife/research\\_methods/microscopy/confocal\\_microscopy.jpg](http://serc.carleton.edu/images/microbelife/research_methods/microscopy/confocal_microscopy.jpg)

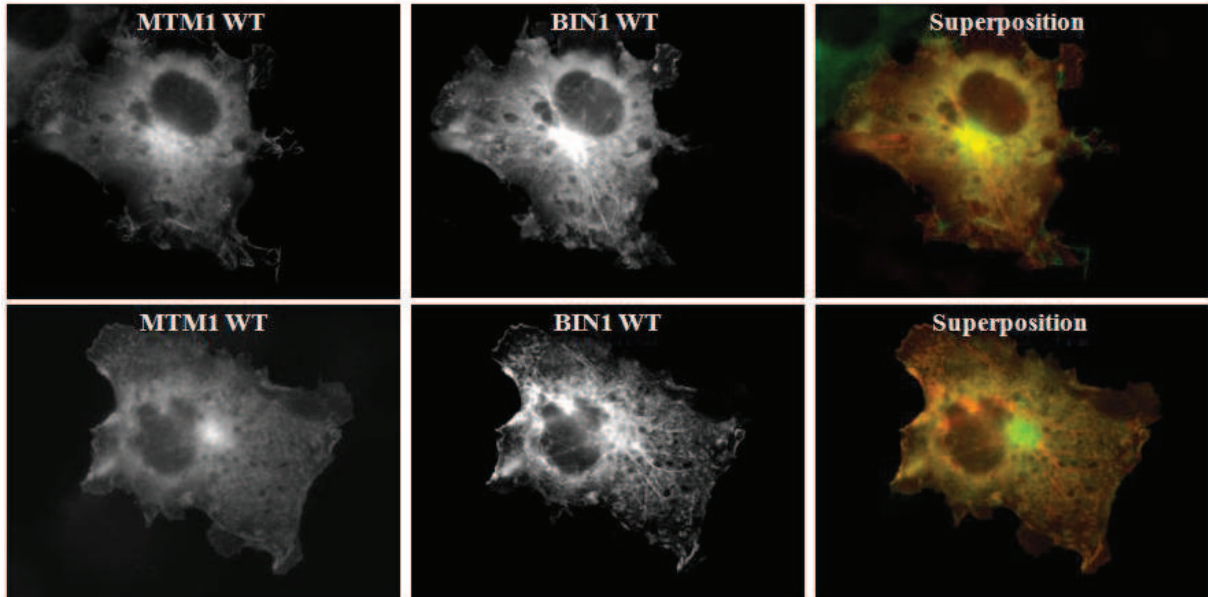


**Figure 35 : Principe de la microscopie électronique en transmission et à balayage**

- La microscopie électronique en transmission où un faisceau d'électron est « transmis » à travers un échantillon très mince, les interactions électrons-échantillon donnent naissance à une image dont la résolution peut atteindre 0,8 Ångström
- La microscopie électronique à balayage : basée sur le principe des interactions électrons-matière, et capable de produire des images en haute résolution de la surface d'un échantillon

(<http://www.ikonet.com/fr/ledictionnairevisuel/science/physique-optique/loupe-et-microscopes/coupe-un-microscope-electronique.php>,  
[http://www.cea.fr/var/cea/technologies/Microscopes/schema\\_principe\\_optique.jpg](http://www.cea.fr/var/cea/technologies/Microscopes/schema_principe_optique.jpg))

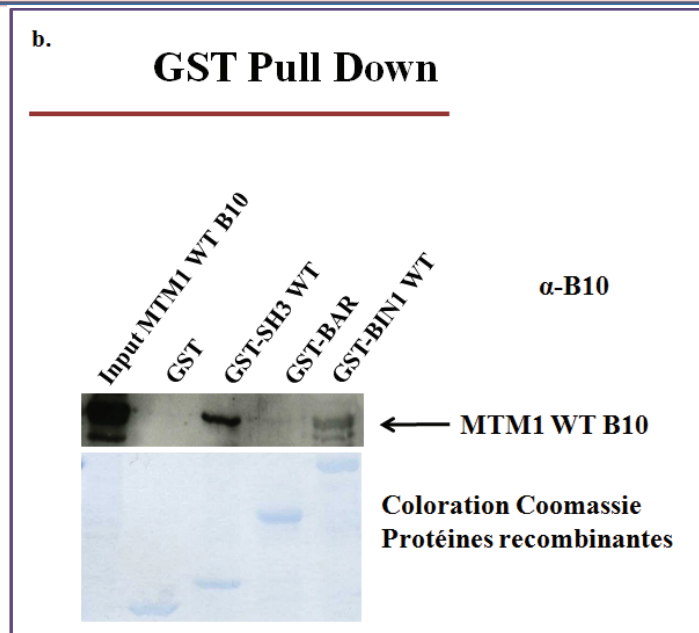
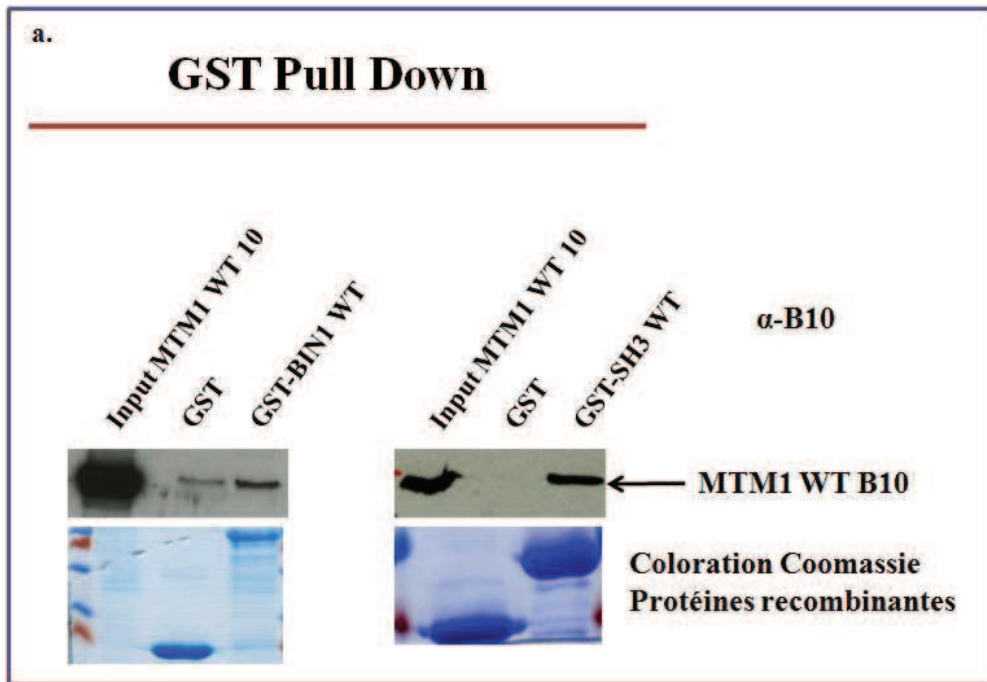




**Figure 36 : Tests *in vivo* de localisation cellulaire de MTM1 et de BIN1**

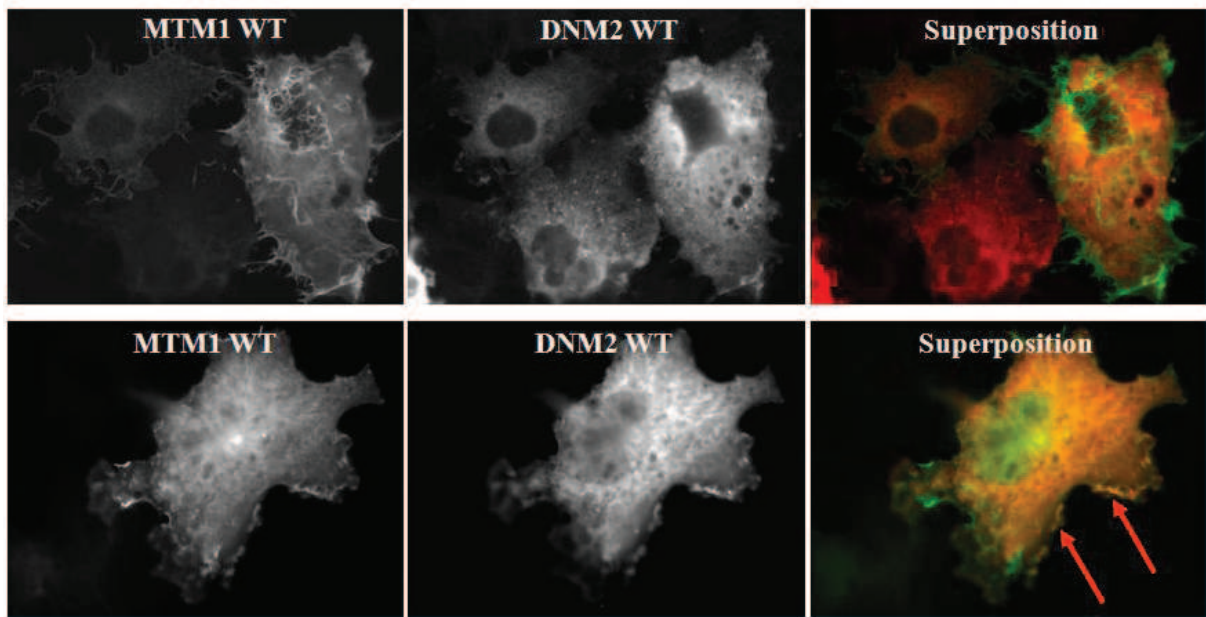
Les cellules COS ont été co-transfectées avec des constructions d'ADN codant pour la myotubularine sauvage (MTM1 WT) et BIN1 sauvage (BIN1 WT), fusionnées à la GFP et au Ds-Red respectivement. Il ne semble pas y avoir de recrutement de MTM1 aux tubules membranaires formés par la surexpression de BIN1 sauvage, tout comme il ne semble pas y avoir de recrutement de BIN1 par MTM1.





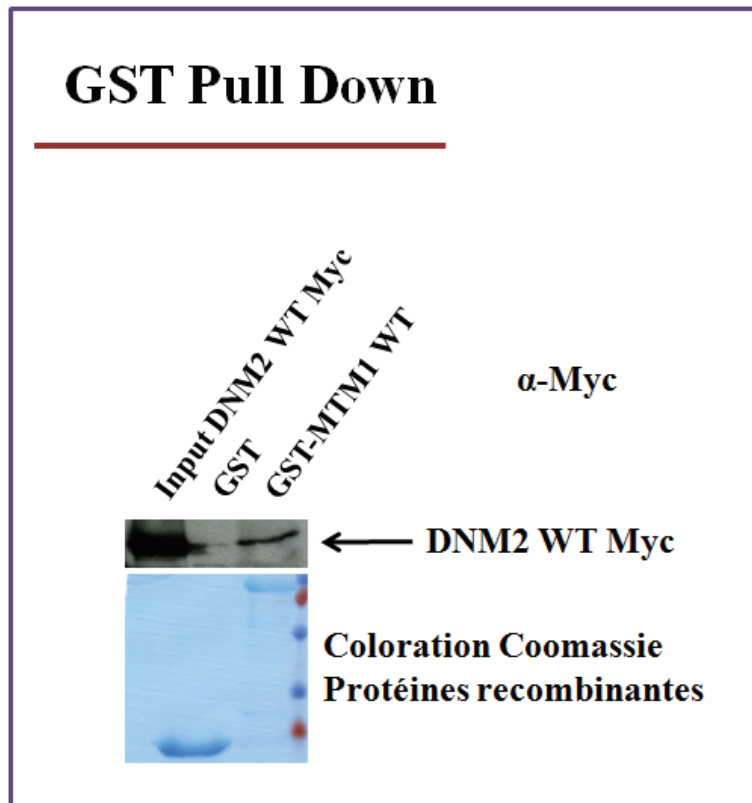
**Figure 37 : Test *in vitro* d'interaction fonctionnel entre MTM1 et BIN1**

- (a) Le domaine SH3 de BIN1 et la protéine BIN1 sauvage (GST-BIN1 WT) recombinés à la GST ont été utilisés pour vérifier l'interaction avec la protéine MTM1 sauvage (MTM1 WT), fusionnée à B10 et surexprimée dans des cellules COS. Les résultats montrent que BIN1 sauvage est capable d'interagir avec MTM1 et plus particulièrement via son domaine SH3.
- (b) Les domaines SH3 et BAR de BIN1 et la protéine BIN1 sauvage (GST-BIN1 WT) recombinés à la GST ont été utilisés pour vérifier l'interaction avec la protéine MTM1 sauvage (MTM1 WT), fusionnée à B10 et surexprimée dans des cellules COS. Les résultats montrent que le domaine SH3 seul est capable d'interagir fortement avec MTM1 contrairement au domaine BAR. Tandis que BIN1 entière semble interagir mais plus faiblement avec MTM1.



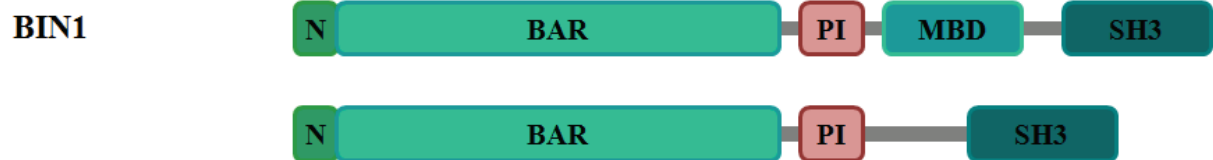
**Figure 38 : Tests *in vivo* de localisation cellulaire de MTM1 et DNM2**

Les cellules COS ont été co-transfectées avec des constructions d'ADN codant pour la myotubularine sauvage (MTM1 WT) et DNM2 sauvage (DNM2 WT), fusionnées à la GFP et à Myc respectivement. Il ne semble pas y avoir de recrutement de DNM2 par MTM1 sauf à quelques ruffles de la membrane plasmique.



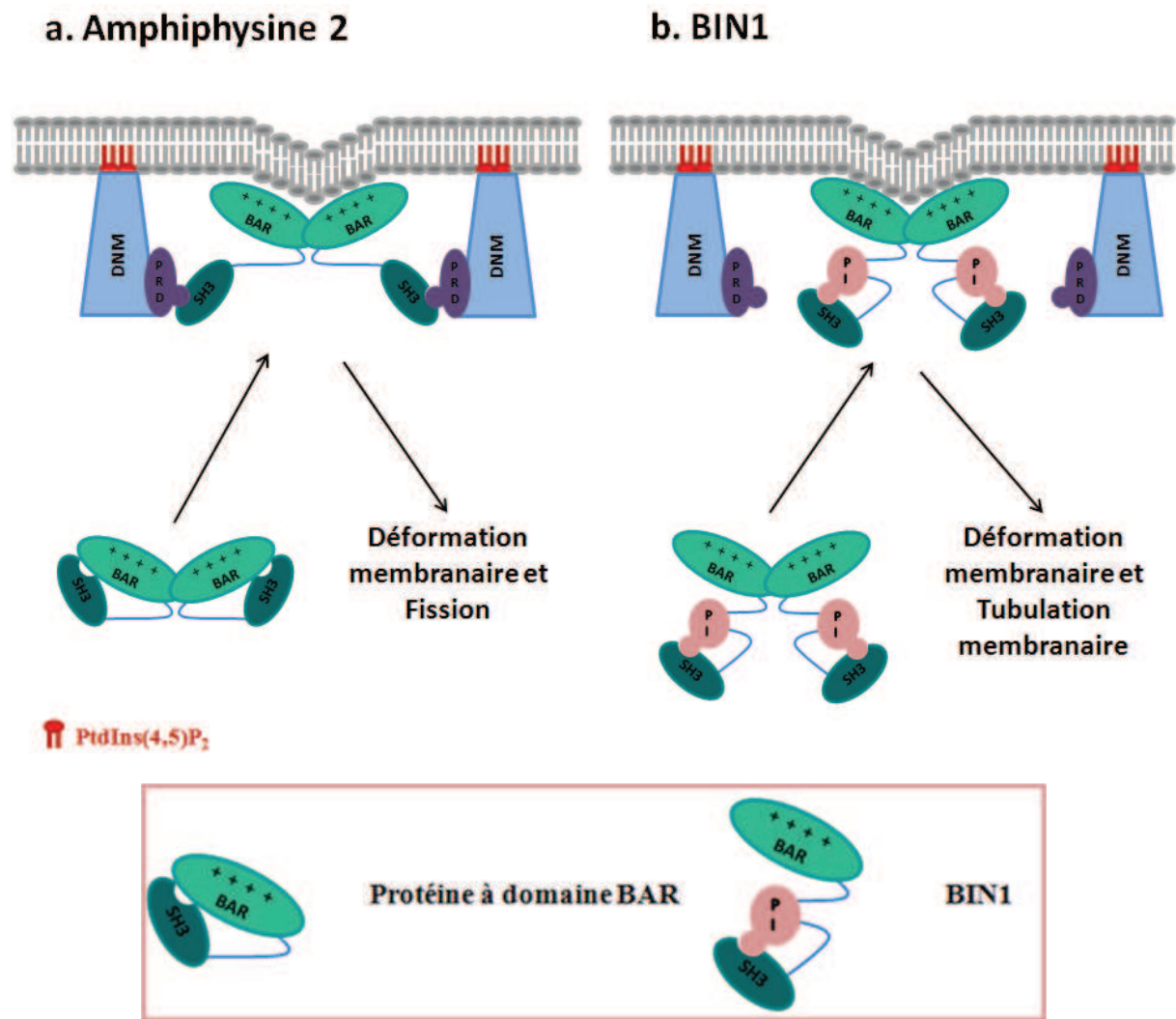
**Figure 39 : Tests *in vitro* d'interaction fonctionnelle entre MTM1 et DNM2**

La protéine MTM1 sauvage (GST-MTM1 WT) recombinée à la GST a été utilisée pour vérifier l'interaction avec la protéine DNM2 sauvage (DNM2 WT), fusionnée à Myc et surexprimée dans des cellules COS. Les résultats montrent que MTM1 sauvage est capable d'interagir avec DNM2 mais très faiblement.



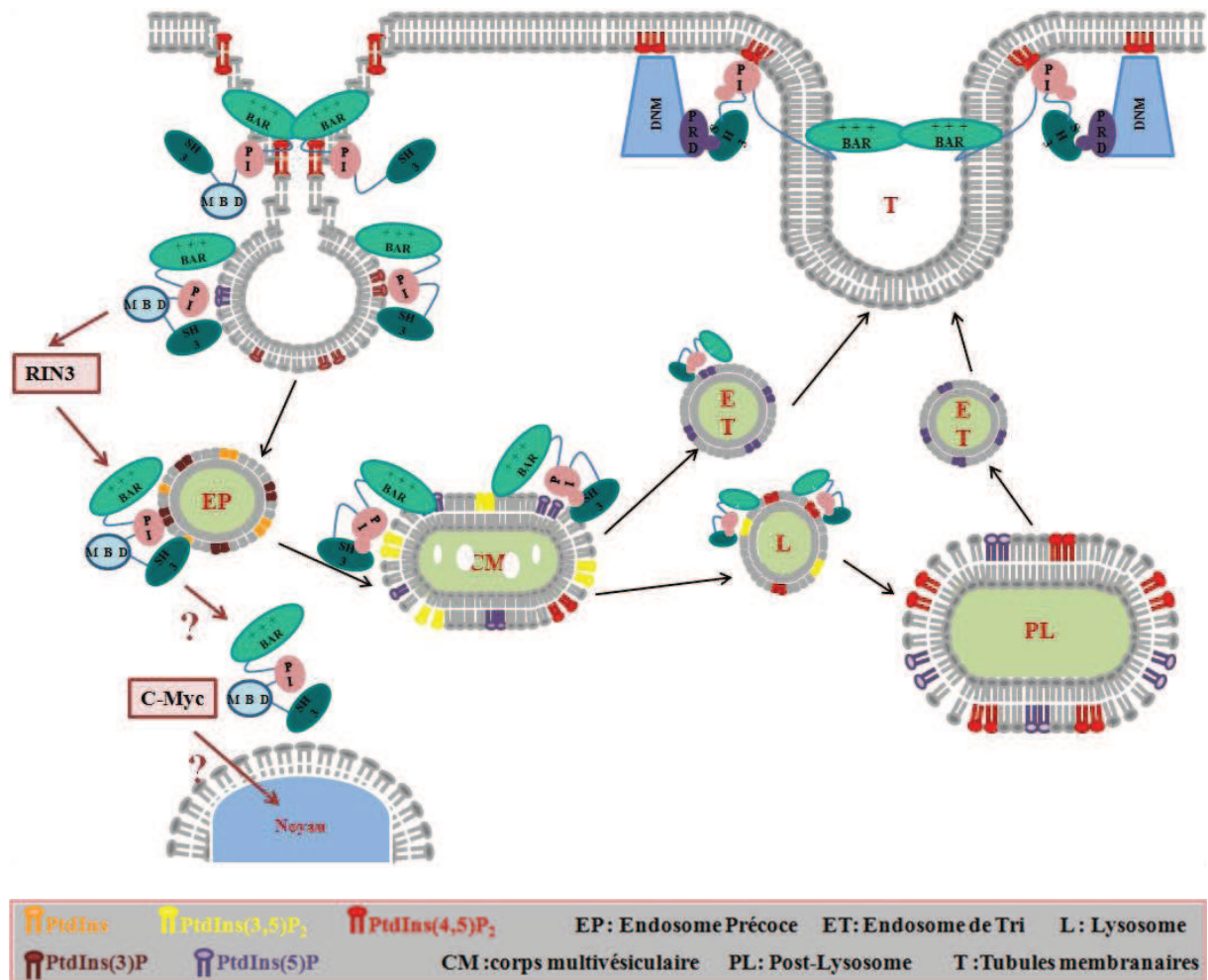
**Figure 40 : Deux isoformes de BIN1 dans le muscle squelettique**

L'isoforme musculaire de l'amphiphysine 2, BIN1, contient un domaine spécifique du muscle squelettique, le domaine PI. Ce domaine est codé par l'exon 11 spécifique de cette isoforme. En utilisant un anticorps spécifique dirigé contre cet exon, Anne Toussaint a identifié cinq isoformes de BIN1 dans le muscle squelettique. Belinda Cowling a, par la suite, pu identifier deux de ces isoformes par RT-PCR. Ces deux isoformes diffèrent par la présence ou non de l'exon 17 qui avec l'exon 18 peut former un domaine MBD de liaison à la protéine c-Myc.



**Figure 41 : Hypothèse d'interaction intramoléculaire dans l'amphiphysine 2 et dans l'isoforme musculaire BIN1**

- (a.) Les isoformes non spécifiques du muscle squelettique de l'amphiphysine 2 ne contiennent pas le domaine PI. Ces isoformes, malgré la présence du domaine BAR ne sont pas capables de tubuler les membranes *in vivo*. Par contre, leurs domaines BAR seuls en sont capables *in vitro*. L'explication vient du fait que le domaine SH3 de ces isoformes non musculaires régule l'activité de tubulation du domaine BAR en se liant à ce dernier.
- (b.) L'isoforme musculaire de l'amphiphysine 2 : BIN1 contient l'exon 11 spécifique codant pour un domaine PI. Ce domaine PI est capable de lier le domaine SH3 de la protéine. Ce dernier est alors incapable de lier le domaine BAR et n'induit pas d'inhibition de son activité de tubulation membranaire.

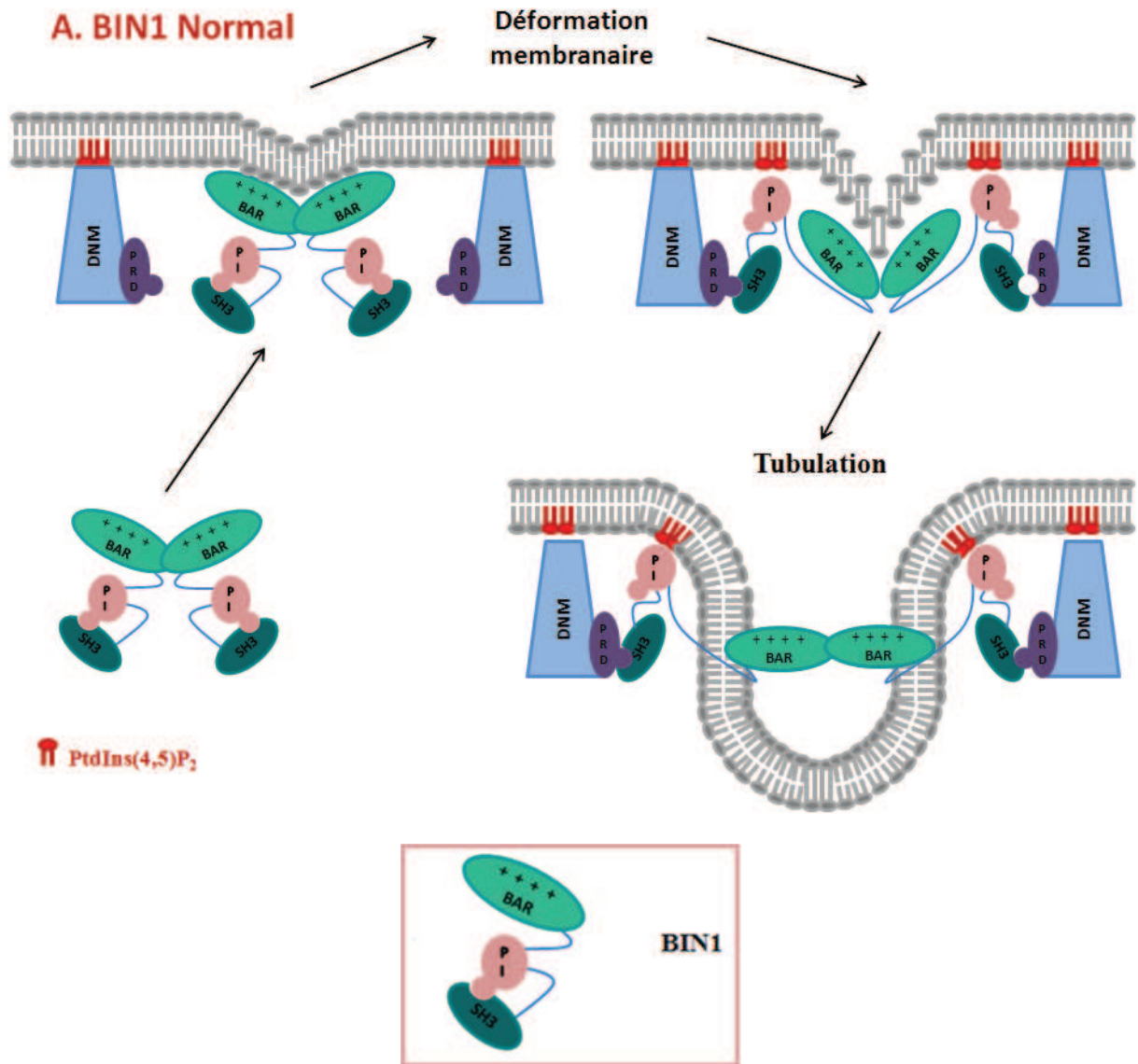


**Figure 42 : Les différentes interactions possibles des deux isoformes de BIN1 dans le muscle squelettique**

L'isoforme BIN1 semble capable de lier différents pools de phosphoinositides ainsi que différentes protéines. Cette habilité lui permettrait d'être recrutée au niveau de différents compartiments cellulaires.

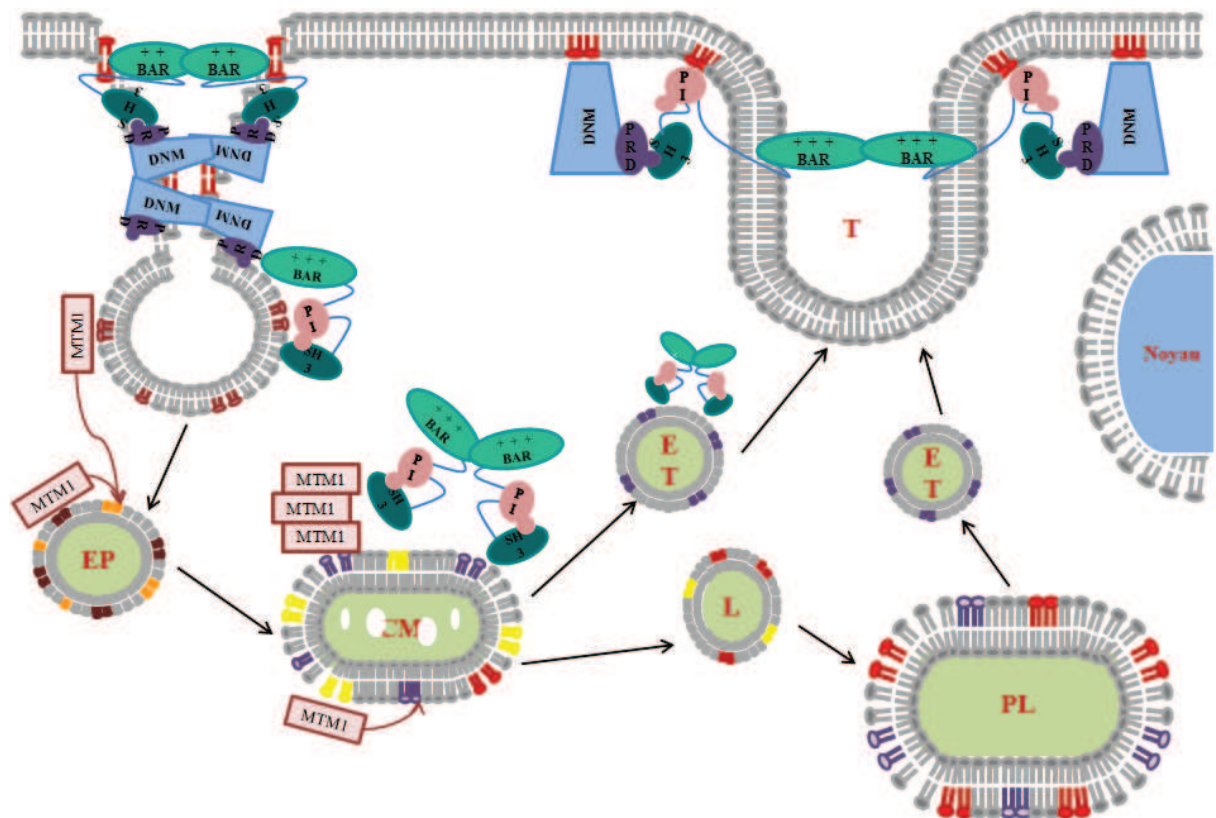
En effet, via leurs domaines PI, les deux isoformes musculaires de BIN1 sont capables de lier le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> à la membrane plasmique, le PtdIns(3)P des vésicules d'endocytose naissantes et des endosomes précoces, afin d'être internalisées. Elles sont aussi capables d'interagir avec le PtdIns(5)P des corps multivésiculaires et des lysosomes et peuvent ainsi emprunter la voie de recyclage vers la membrane plasmique via les endosomes de tri. Ces deux isoformes peuvent aussi être transloquées de la vésicule d'endocytose naissante vers l'endosome précoce par l'intermédiaire de la protéine RIN3, une protéine jouant le rôle de GEF pour Rab5. Enfin, l'isoforme de BIN1 contenant l'exon 17 pourrait être transloquée dans le noyau des cellules via son interaction avec la protéine c-Myc et son domaine MBD.


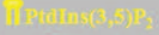
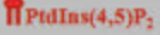






**Figure 43 : La régulation intramolécule de BIN1**

L'isoforme musculaire BIN1 via l'interaction de son domaine SH3 avec son domaine PI est capable de déformer les membranes grâce à son domaine BAR libre. Ce domaine via l'hélice amphipatique va s'insérer dans les membranes puis les courber grâce à ce domaine BAR. Le domaine PI va alors interagir avec le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> de la membrane plasmique, ce qui permettra la libération du domaine SH3. Ce dernier va alors pouvoir interagir avec la dynamine 2 et le complexe BIN1/DNM2 va alors stabiliser et allonger les tubules membranaires préalablement formés par BIN1 seule.



 PtdIns   
  PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>   
  PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>   
 EP: Endosome Précoce    ET: Endosome de Tri    L: Lysosome  
 PtdIns(3)P   
  PtdIns(5)P   
 CM: corps multivésiculaire    PL: Post-Lysosome    T: Tubules membranaires



**Figure 44 : L'interaction MTM1-BIN1 dans le muscle squelettique sain**

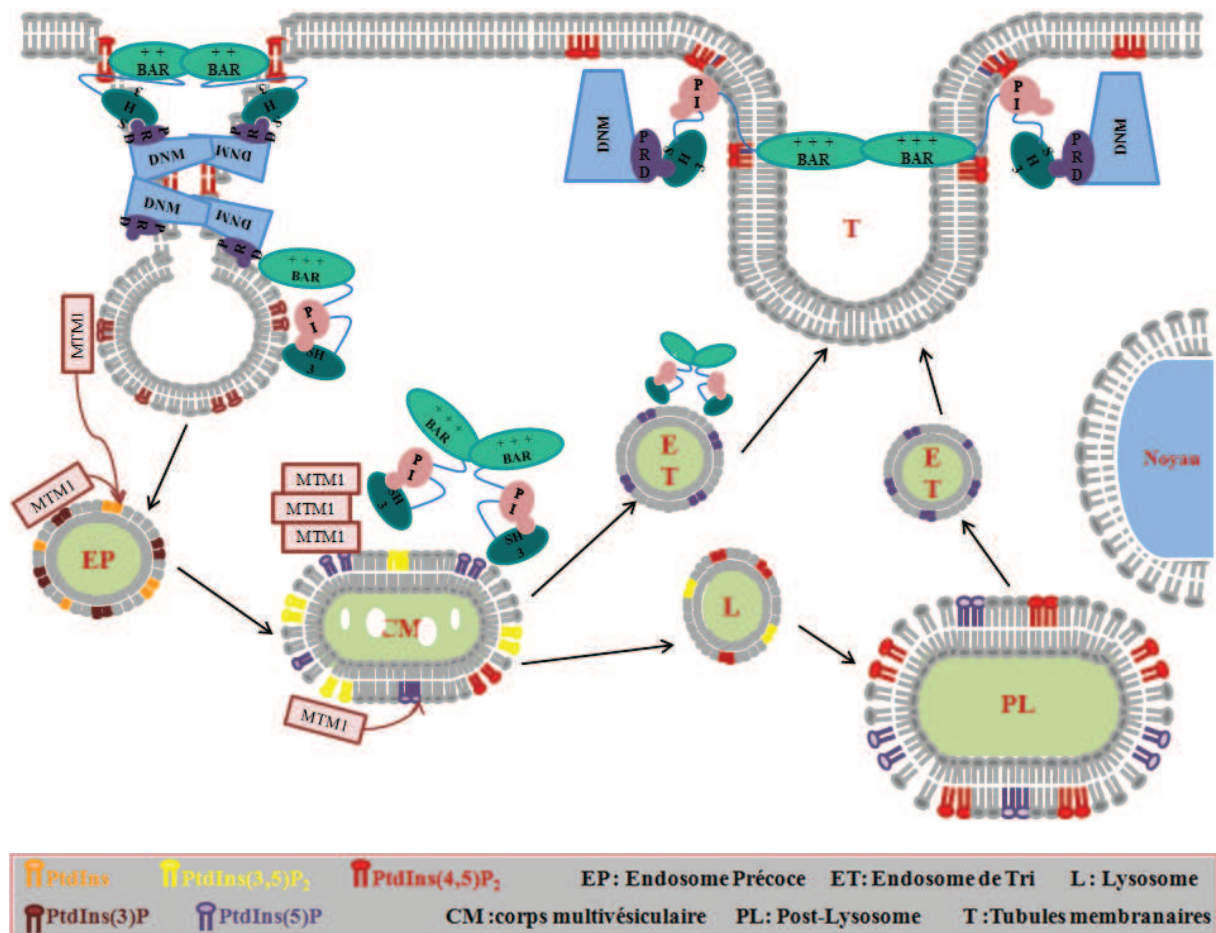
BIN1 est capable de lier le PtdIns(3)P via son domaine PI au niveau des vésicules à clathrine naissantes et des endosomes précoces. Elle sera libérée de ces endosomes précoces par la déphosphorylation du PtdIns(3)P par MTM1. Puis BIN1 sera concentrée au niveau des corps multivésiculaires par la liaison de son domaine PI au PtdIns(5)P mais aussi via son interaction à MTM1 via son domaine SH3. Puis BIN1 sera recyclée grâce au PtdIns(5)P et aux endosomes de tri à la membrane plasmique, où son domaine N-BAR va initier la formation des tubules-T. L'interaction de son domaine PI avec le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> présent à la membrane plasmique va permettre la libération du domaine SH3 qui pourra alors interagir avec le domaine PRD de la dynamine 2 afin de stabiliser ces tubules-T.

1 MASASTSKYN SHSLENESIK RTSRDGVNRD **LTEAVPRLPG** ETLITDKEVI  
 51 YICPFNGPIK GRVYITNYRL YLRSLETDSS LILDVPLGVI **SRIEKMGGAT**  
 101 SRGENSYGLD ITCKDMRNLK FALKQEGHSR RDMFEILTRY **AFPLAHSPL**  
 151 **FAFLNEEKFN** VDGWTVYNPV EEYRRQGLPN HHWRITFINK CYELCDTYPA  
 201 LLVVPYRASD DDLRRVATFR SRNRIPVLSW IHPENKTVIV RCSQPLVGMS  
 251 GKRNKDDEKY LDVIRETNKQ ISKLTIIDAR PSVNAVANKA TGGGYESDDA  
 301 YHNAELFFLD IHNIHVMRES LKKVKDIVYP NVEESHWLSS LESTHWLEHI  
 351 KLVLTGAIQV ADKVSSGKSS VLVHCSDGWD RTAQLTSLAM LMLDSFYRSI  
 401 EGFEILVQKE WISFGHKFAS RIGHGDKNHT DADRSPIFLQ FIDCVWQMSK  
 451 QFPTAFEFNE QFLIILDHL YSCRFGTFLF NCE SARERQK VTERTVSLWS  
 501 LINSNKEKFK NPFYTKEINR VLYPVASMRH LELWVNYIR WNPRIKQQQP  
 551 NPVEQRYMEL LALRDEYIKR LEELQLANSA **KLSDPPTSPS** **SPSQMMPHVQ**  
 601 THF

**Figure 45 : Séquence montrant les différents domaines de MTM1**

MTM1 possèdent différents domaines :

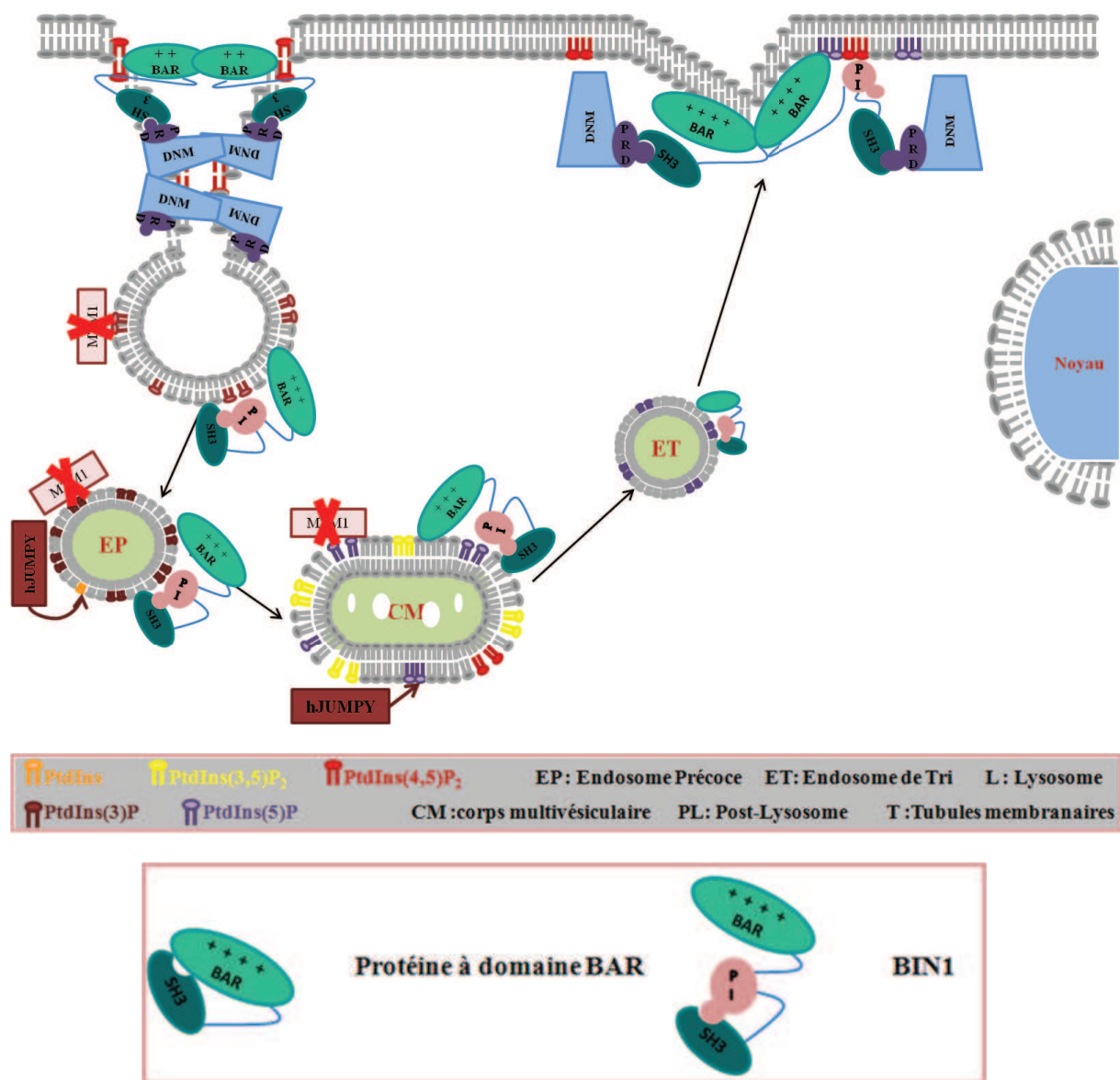
- un domaine GRAM : 34-149
- un domaine de liaison :150-161
- un domaine RID 162-265
- un autre domaine de liaison : 266-273
- un domaine PTP : 274-434, comportant le motif caractéristique : CX5R
- un domaine coiled-coil : 552-585
- un potentiel domaine PRD : 586-592
- un domaine PDZ : 601-603



**Figure 46 : Interaction MTM1-BIN1 dans le muscle squelettique sain : plusieurs voies ?**

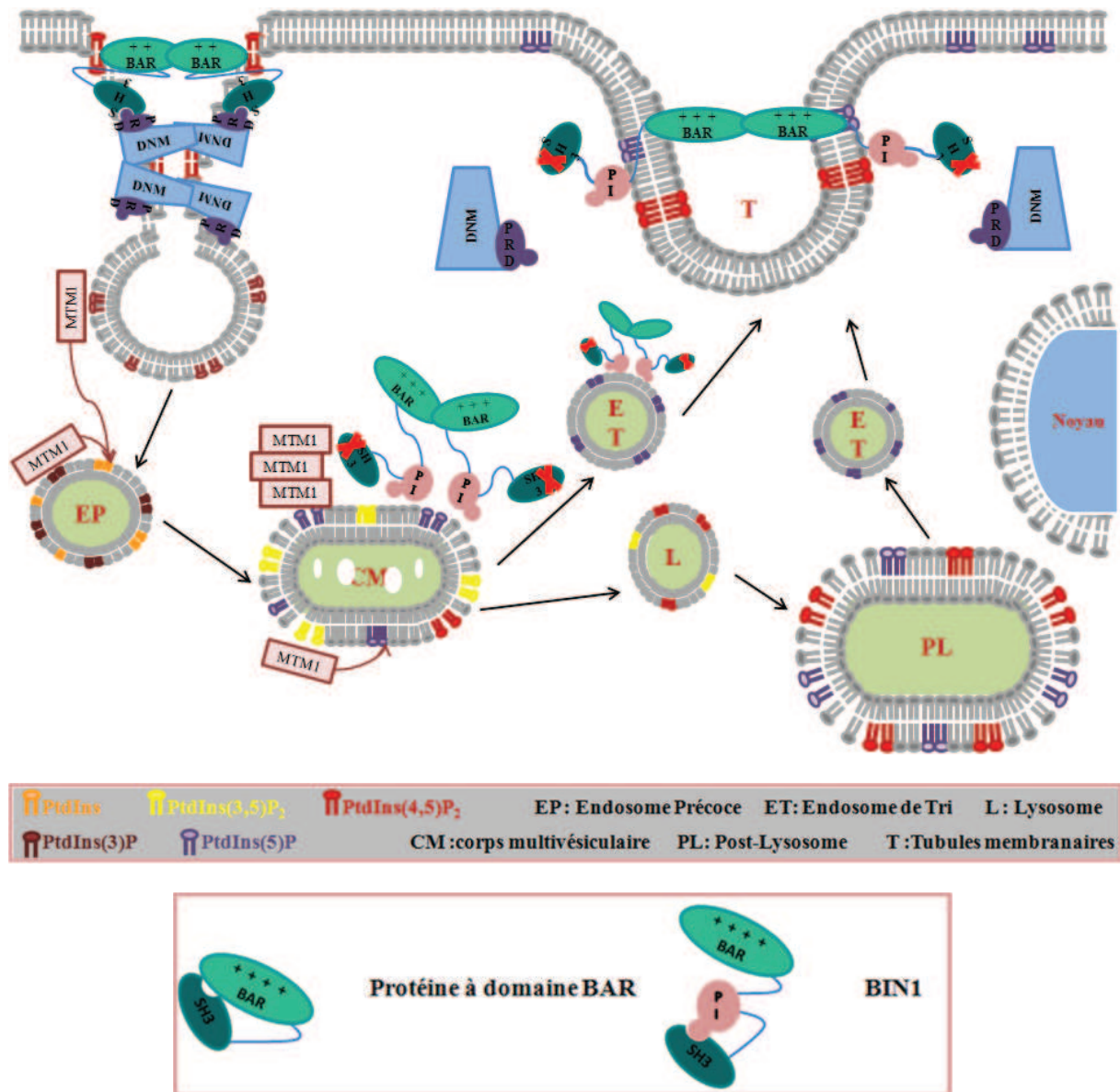
Dans le muscle squelettique sain, BIN1 pourra être endocytée via la formation des vésicules en interagissant avec le PtdIns(3)P présent au niveau de ces vésicules. Au niveau des endosomes précoces, la myotubularine va alors déphosphoryler le PtdIns(3)P et former du PtdIns, cette étape va alors permettre de libérer BIN1 des endosomes précoces. La formation de PtdIns(5)P par cette même myotubularine au niveau des corps multivésiculaires et des post-lysosomes va permettre de recruter BIN1 via son domaine PI. De plus, ce phosphoinositide va concentrer la myotubularine au niveau de ces compartiments, cela permettra de recruter encore plus facilement BIN1 grâce à l'interaction de MTM1 au domaine SH3 de BIN1. Finalement, cette dernière protéine va être redirigée vers la membrane plasmique via les endosomes de tri et pourra alors interagir avec le PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> pour sentir et courber les membranes. La stabilisation de ces tubules en formation sera alors assurée par BIN1 qui interagira via son domaine SH3 avec le domaine PRD de la dynamine 2.





**Figure 47 : Impact des mutations de MTM1 sur le modèle d'interaction des trois protéines impliquées dans les myopathies centronucléaires**

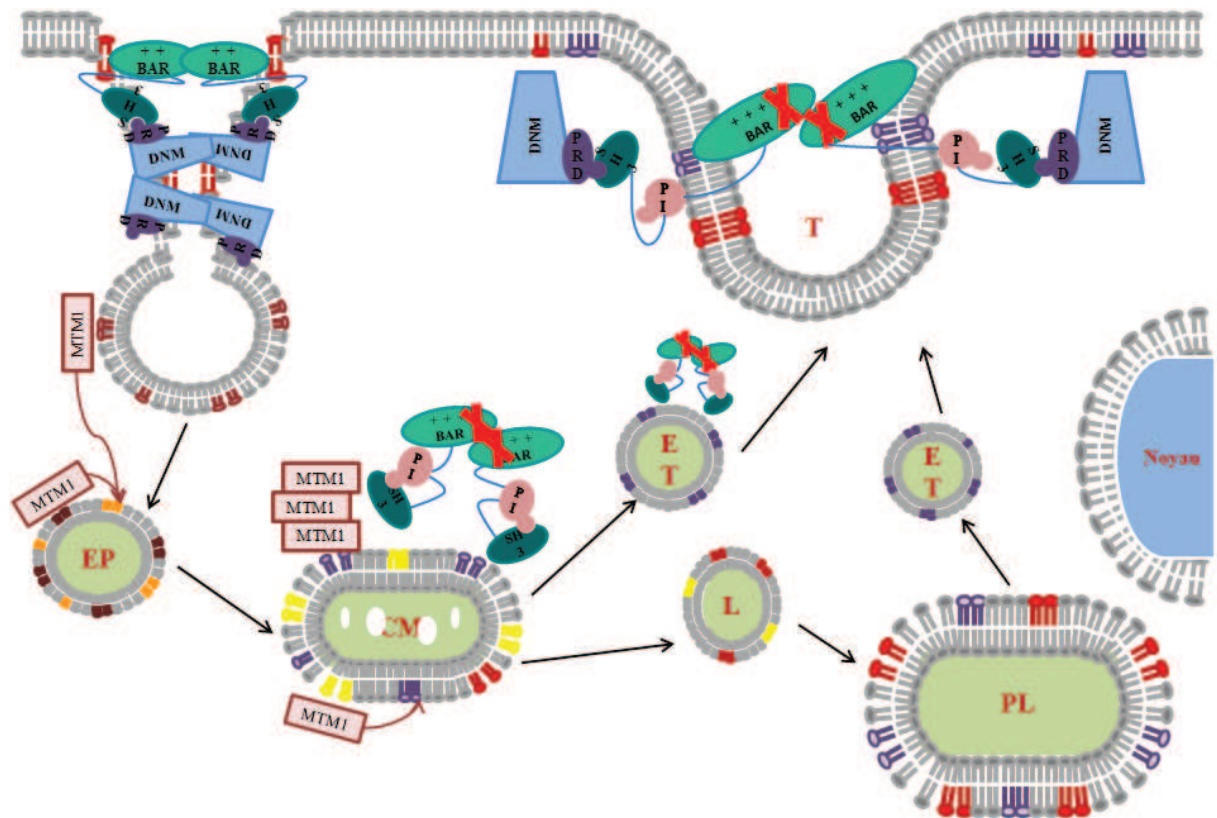
La majorité des mutations dans MTM1 provoque une perte de l'expression de la protéine. En absence de MTM1, le PtdIns(3)P sera alors accumulé au niveau des vésicules à clathrine naissantes et des endosomes précoces alors que le PtdIns(5)P sera peu formé (il pourrait l'être un peu via la phosphatase à phosphoinositides hJUMPY). Ainsi BIN1 sera excessivement internalisée dans la fibre et peu recyclée vers la membrane plasmique. En s'associant à d'autres protéines à domaine BAR telle que l'endophiline, BIN1 pourrait être capable de former des tubules-T mais ces tubules-T pourraient ne pas être aussi stables.








**Figure 48 : Impact des mutations du domaine SH3 de BIN1 sur le modèle d'interaction dans le muscle squelettique**

Les mutations STOP du domaine SH3 de BIN1 sont responsables d'une ouverture de la conformation de la protéine. En effet, elles empêchent la liaison du domaine SH3 avec le domaine PI de BIN1. Elles pourraient donc être responsables de l'interaction en continu de BIN1 avec des protéines à domaine PRD, mais cela n'est pas le cas pour la dynamine 2 car cette interaction est quasiment totalement abolie par ces mutations. En revanche, elles pourraient augmenter la liaison entre BIN1 et MTM1 et l'empêcheraient donc de se « décrocher » de BIN1 lors de l'étape de stabilisation des tubules-T. Ou encore elles pourraient interagir avec d'autres protéines à domaine PRD telles que la synaptojanine mais cette dernière ne pourrait pas stabiliser ces tubules-T de la même façon que la dynamine 2.



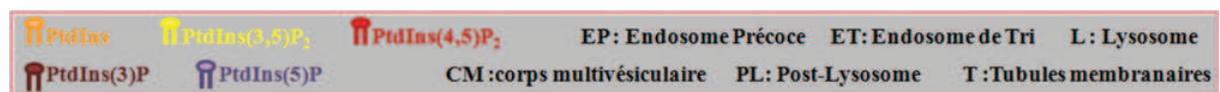
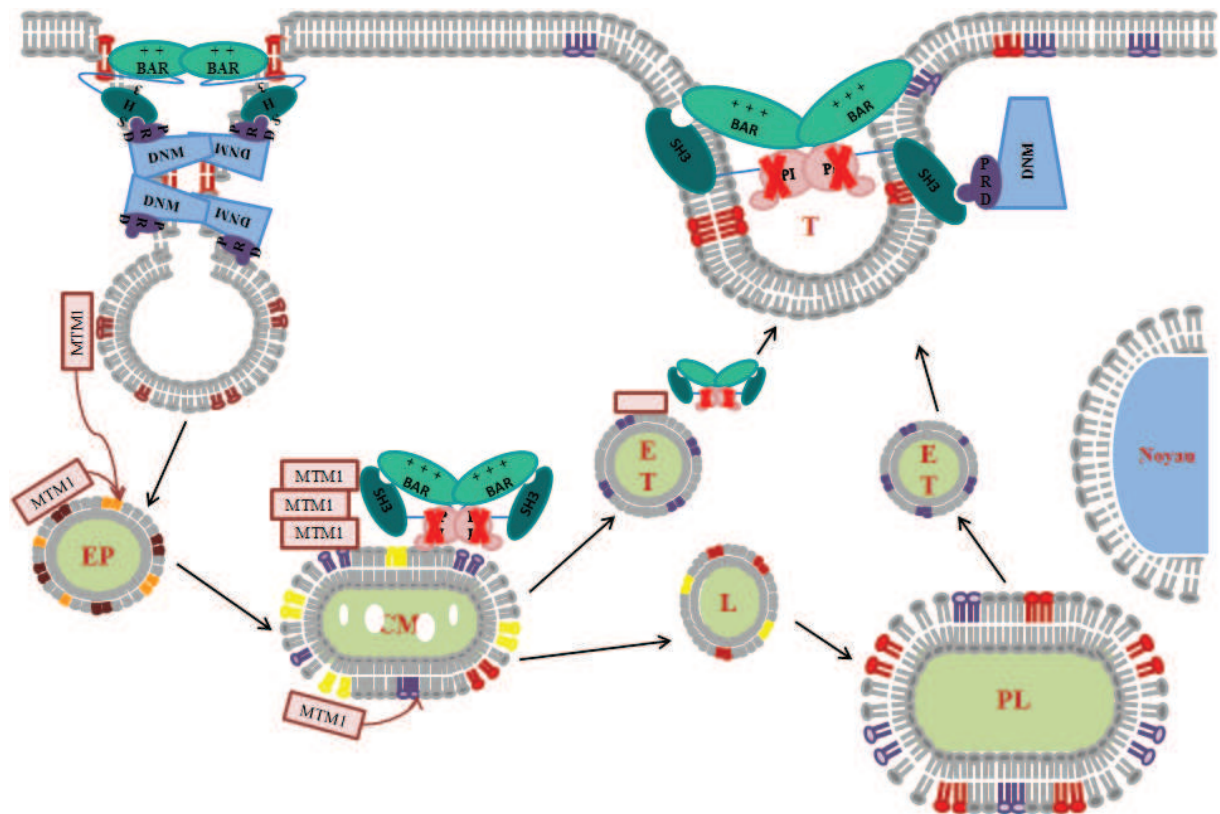


 PtdIns   
  PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>   
  PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>   
 EP: Endosome Précoce    ET: Endosome de Tri    L: Lysosome  
 PtdIns(3)P   
  PtdIns(5)P   
 CM: corps multivésiculaires    PL: Post-Lysosome    T: Tubules membranaires



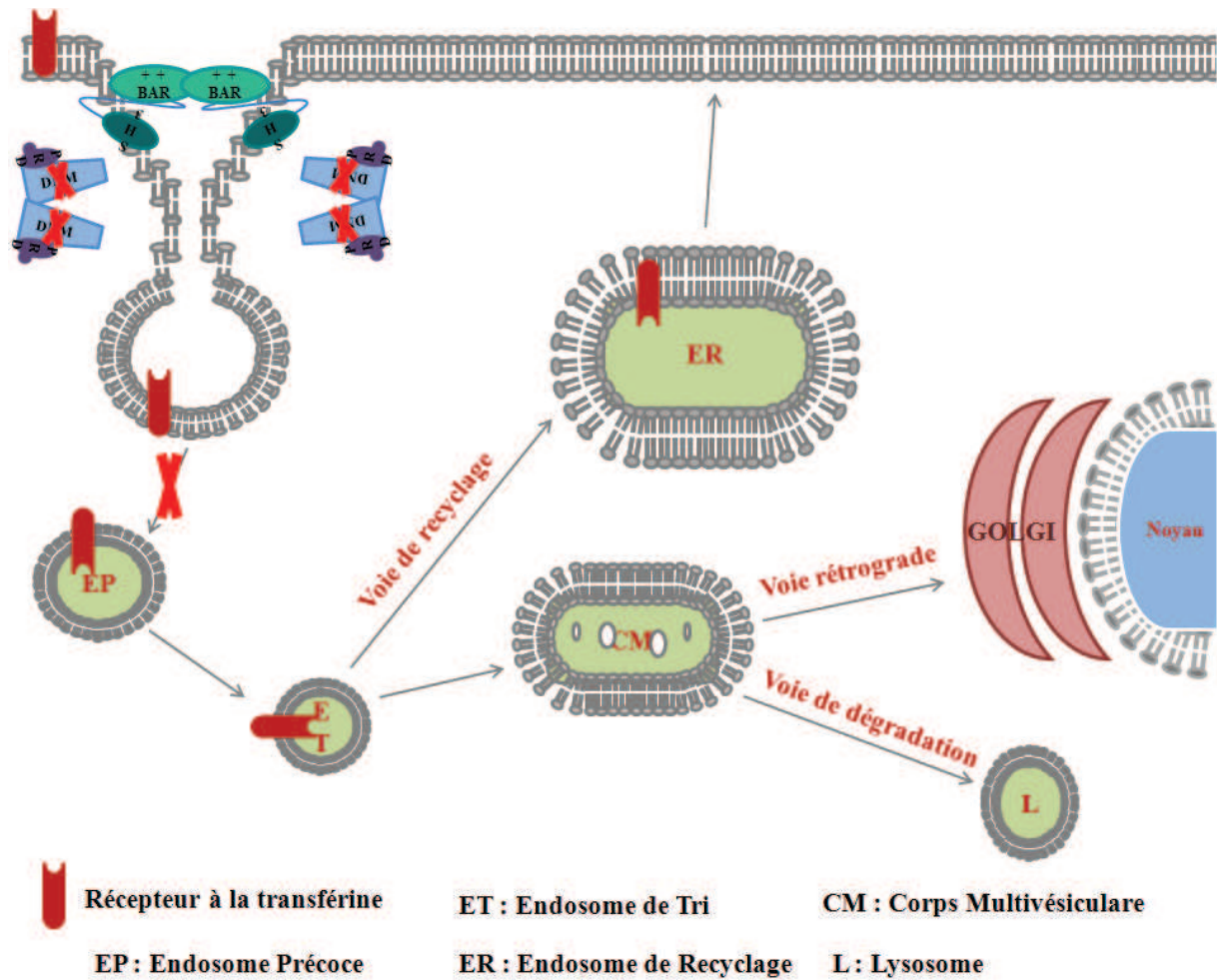
**Figure 49 : Impact des mutations du domaine BAR de BIN1 sur le modèle d'interaction dans le muscle squelettique**

Les mutations dans le domaine N-BAR n'empêchent pas l'homodimérisation de la protéine. En revanche, elles pourraient être responsables d'un défaut de positionnement de ces domaines le long de la membrane et ainsi former des tubules-T mais dans une mauvaise orientation.



**Figure 50 : Impact de l'épissage alternatif déficient dans les dystrophies myotoniques sur le modèle d'interaction dans le muscle squelettique**

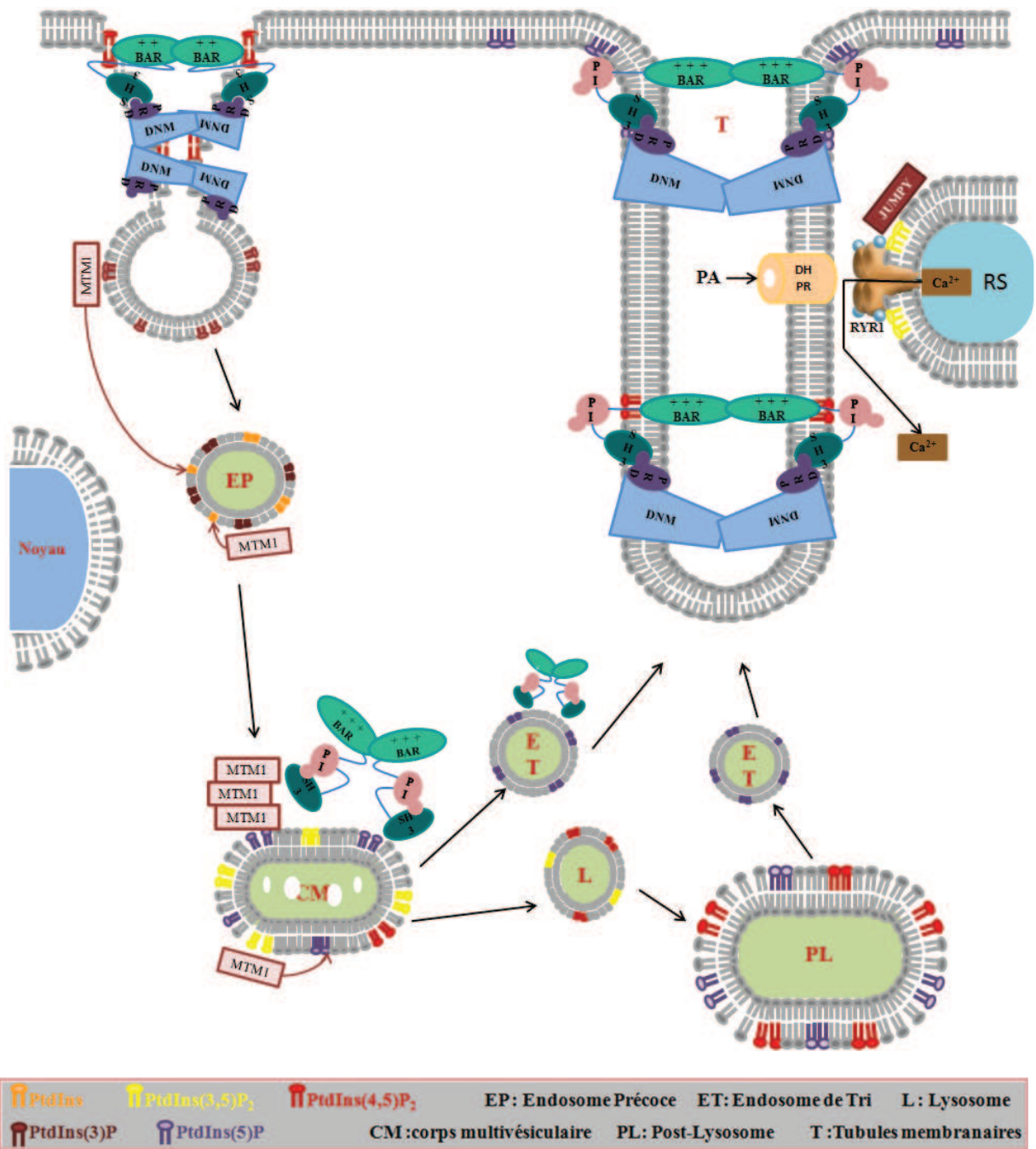
Dans le cas des dystrophies myotoniques, la liaison entre BIN1 et le PtdIns(5)P et les autres phosphoinositides ne peut plus se faire du fait de la disparition du domaine PI. La protéine BIN1 pourrait donc être moins bien recyclée. Dans un premier temps elle pourrait être moins bien recrutée au niveau des corps multivésiculaires et des lysosomes, ce recrutement se faisant alors uniquement via son interaction avec MTM1. De plus, BIN1 pourrait se retrouver sous la conformation dite « fermée » et son ouverture ne se ferait que lorsqu'elle interagirait avec le domaine PRD de la dynamine 2. La dynamine 2 pourrait alors moins bien exercer son rôle de stabilisateur des tubules-T.



**Figure 51 : Impact des mutations dans le domaine PH de la dynamine 2 chez les patients atteints de neuropathie de Charcot-Marie-Tooth sur l'endocytose**

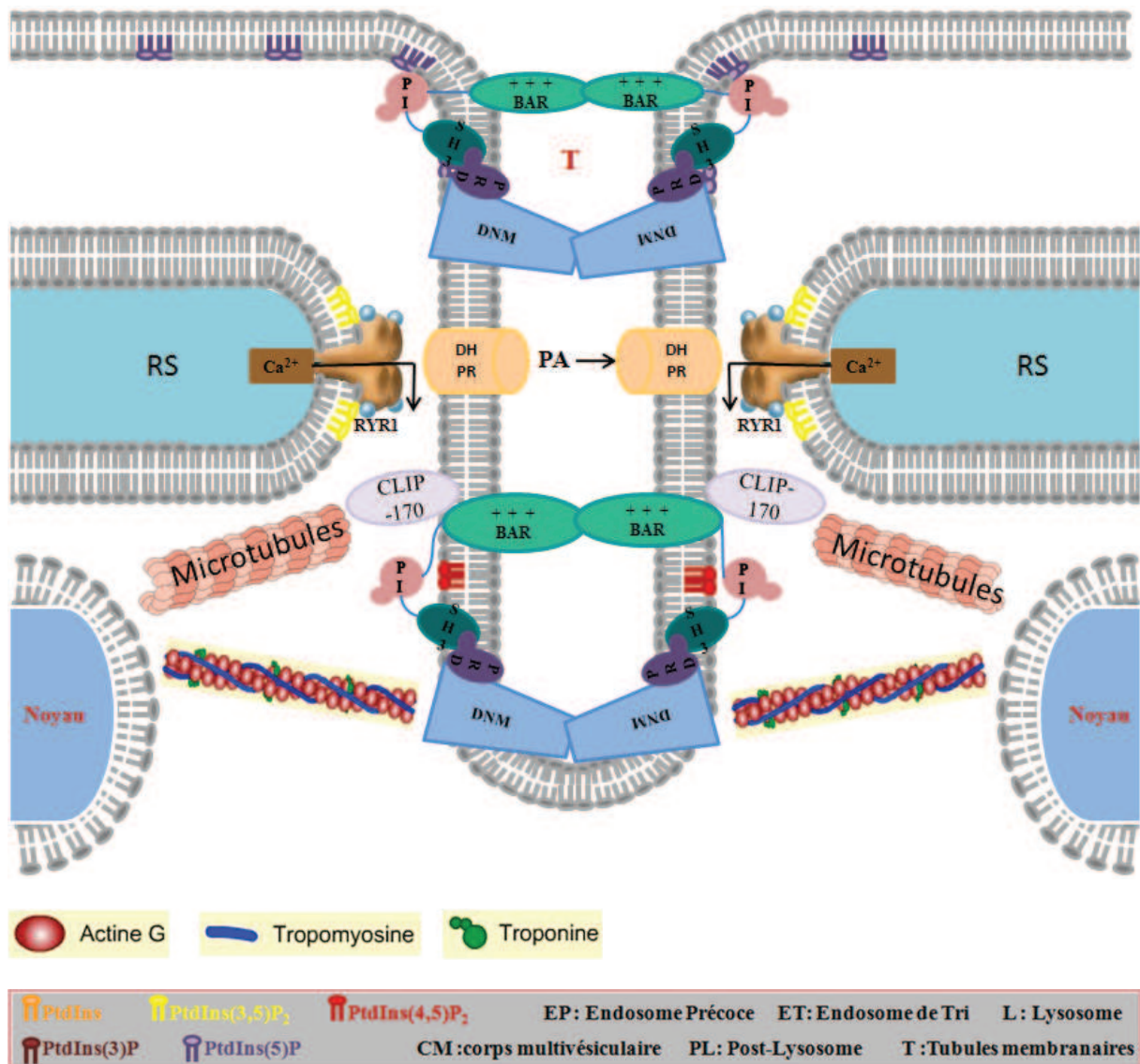
Chez les patients atteints de neuropathies de Charcot-Marie-Tooth, il semblerait que des anomalies d'endocytose aient lieu dans leurs neurones. Ces anomalies semblent toucher l'endocytose médiée par les vésicules à clathrine et pourraient donc être responsables de nombreux défauts cellulaires, dont une mauvaise internalisation du fer dans ces tissus, via l'internalisation de la transférine. De plus, ces défauts pourraient avoir un impact sur le recyclage des membranes à la membrane plasmique, ce qui pourrait expliquer les défauts observés par microscopie électronique au niveau de ces tissus.





**Figure 52 : Modèle d'interaction des protéines impliquées dans les myopathies à centralisation des noyaux dans le muscle squelettique sain**

Toutes les protéines impliquées dans les myopathies à centralisation des noyaux (MTM1, BIN1, DNM2, RYR1 et hJUMPY) semblent avoir un rôle dans le mécanisme de couplage excitation-contraction. Les mutations dans ces protéines auraient donc un impact sur ce mécanisme ce qui pourrait donc expliquer la faiblesse musculaire observée chez tous ces patients atteints de ces pathologies invalidantes.



**Figure 53 : Hypothèse sur le positionnement des noyaux à la périphérie des fibres musculaires saines**

La protéine BIN1 est capable d'interagir via son domaine BAR avec la protéine CLIP170. Cette dernière fait partie de la famille des +TIP (+ end microtubules interacting proteins) car elle interagit avec l'extrémité + des microtubules. Cette interaction pourrait permettre le positionnement des noyaux à la périphérie des fibres musculaires lors de l'étape finale de la myogenèse.

La dynamine 2 est capable de lier l'actine en favorisant son alignement pour former des faisceaux et permet ainsi de relier directement la dynamine 2 aux noyaux des fibres musculaires.